

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**



TESIS DOCTORAL

**FISIOPATOLOGÍA Y VALOR PRONÓSTICO
DE LOS PRODUCTOS DE GLICACIÓN
AVANZADA Y SU RECEPTOR SOLUBLE EN
LA INSUFICIENCIA CARDIACA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Sergio Raposeiras Roubín

DIRECTORES:

**José Ramón González Juanatey
Ezequiel Álvarez Castro
Lilian Grigorian Shamagian**

Santiago de Compostela, 2012

El Doctor Ezequiel Álvarez Castro, Investigador Contratado del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, la Doctora Lilian Grigorian Shamagian, Médico del Complejo Hospitalario Universitario de Vigo y el Profesor Doctor José Ramón González Juanatey, Catedrático de Cardiología de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral “Fisiopatología y valor pronóstico de los productos de glicación avanzada y su receptor soluble en la insuficiencia cardíaca” del Licenciado en Medicina y Cirugía D. Sergio Raposeiras Roubín, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, considerándola en condiciones para optar al Grado de Doctor y autorizándola para su defensa ante el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, se expide el presente certificado en Santiago de Compostela, a 11 de Marzo de 2012.

Fdo. Dr Ezequiel Álvarez Castro

Fdo. Dra. Lilian Grigorian Shamagian

Fdo. Dr José R. González Juanatey

A “Tita”

Agradecimientos

En lo profesional:

- A mi jefe, el profesor Dr. José Ramón González-Juanatey, por mis primeros aprendizajes en cardiología y por la confianza que siempre ha depositado en mi.
- A Lilian, por haberme introducido ya desde estudiante en el mundo de la investigación.
- A Ezequiel y Bruno, compañeros de viaje en esta bonita aventura de AGE-RAGE.
- A Alejandro Virgós, mi maestro clínico.
- A Emad, por su estímulo y confianza.
- A Ray, por ser su “raposón”.
- A Montse, auxiliar de la planta, por los cafés de los fines de semana. A Mercedes, por el año de “eco”. A Manolo y Mary, por los buenos días de cada mañana. A Mari (auxiliar), por guardarme día tras día los pijamas.
- A todo el personal del servicio de cardiología que me ha apoyado -y lo sigue haciendo- en mi aprendizaje clínico.

En lo personal:

- A mis padres, por su enorme cariño y el esfuerzo invertido en mi formación.
- A mis abuelos Francisco y Maruja, por cuidarme y enseñarme a ser persona.
- A mis suegros, por todo su apoyo y comprensión.
- A mis amigos de Ponte (inolvidables e imprescindibles), por todos los buenos momentos, y por estar siempre ahí, a pesar de mis desapariciones temporales.

En todo:

- A CRIS, por ser la persona más importante de mi vida.

LISTA DE ABREVIATURAS

- **AGE:** Productos de glicación avanzada (Advanced Glycation End-products).
- **ALE:** Productos de lipoperoxidación avanzada (Advanced Lipoperoxidation End-products).
- **BNP:** Péptido natriurético cerebral (Brain Natriuretic Peptide).
- **CML:** Carboximetil-lisina.
- **c-RAGE:** Receptor fragmentado de AGE (Cleaved Receptor for AGE).
- **DLP:** Dislipemia.
- **DM:** Diabetes Mellitus.
- **ERO:** Enfermedad Renal Oculta.
- **es-RAGE:** Receptor de AGE secretado endógenamente por las células (Endogenous Secretory Receptor for AGE).
- **FA:** Fibrilación Auricular.
- **FEVI:** Fracción de Eyección Ventricular Izquierda.
- **HbA1c:** Hemoglobina Glicada.
- **HDL:** Lipoproteína de alta densidad (High-density lipoprotein).
- **HMGB1:** Proteínas nucleares de alta movilidad del grupo B1 (High Mobility Group of protein B1).
- **HTA:** Hipertensión Arterial.
- **IC:** Insuficiencia Cardíaca.
- **ICAM:** Molécula de adhesión intercelular (Intercellular Adhesion Molecule).
- **IKK:** Kinasas del inhibidor del factor de transcripción NF-KB.
- **IKK β :** Inhibidor del factor de transcripción NF-KB.
- **IMC:** Índice de Masa Corporal.
- **LDL:** Lipoproteínas de baja densidad (Low-density lipoprotein).
- **MBG:** Membrana Basal Glomerular.
- **MDRD-4:** Ecuación de estimación de la tasa de filtrado glomerular procedente del estudio Modification of Diet in Renal Disease.
- **MEC:** Matriz extracelular.
- **NF-K β :** Factor nuclear Kappa B (Nuclear Factor-Kappa B).
- **NT-proBNP:** Fragmento N-terminal del BNP (N-terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide).
- **NYHA:** Clasificación de la asociación de cardiología de Nueva York (New York Heart Association classification).
- **MG-H:** hidroximidazolona derivada del metilglioxal (Methylglyoxal-derived Hydroximidazolone)
- **MMP:** Metaloproteinasas.
- **RAGE:** Receptor para AGE (Receptor for AGE).
- **RIQ:** Rango Intercuartílico.
- **sRAGE:** Receptor soluble para AGE (Soluble Receptor for AGE).
- **TFG:** Tasa de Filtrado Glomerular.
- **TFG- β :** Factor de crecimiento transformante β (Transforming Growth Factor- β).
- **TLR:** Receptores tipo Toll (Toll Like Receptors).
- **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor-alpha).
- **VCAM:** Molécula de adhesión a células vasculares (Vascular Cell Adhesion Molecule).
- **VEGF :** Factor de crecimiento del endotelio vascular (Vascular Endothelial Growth Factor).

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN: REVISIÓN CRÍTICA DEL PROBLEMA	13
1.1. RELEVANCIA ACTUAL DE LA INSUFICIENCIA CARDIACA	15
1.1.1. CUESTIONES CLÍNICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS	15
1.1.2. ETIOPATOGENIA Y FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD	18
1.2. PROCESO DE GLICACIÓN AVANZADA	24
1.2.1. PRODUCTOS DE GLICACIÓN AVANZADA (AGE): FORMACIÓN	25
1.2.2. RECEPTORES DE AGE	31
1.2.3. IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LOS AGE	38
1.3. GLICACIÓN AVANZADA E INSUFICIENCIA CARDIACA	44
1.3.1. DISFUNCIÓN DIASTÓLICA	47
1.3.2. DISFUNCIÓN SISTÓLICA	49
1.3.2. DISFUNCIÓN VASCULAR	51
2. HIPÓTESIS y OBJETIVOS	55
2.1. HIPÓTESIS	57
2.2. OBJETIVOS	58
2.2.1. OBJETIVO GENERAL	58
2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
3. MATERIAL y MÉTODOS	59
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	61
3.2. POBLACIÓN A ESTUDIO	61
3.2.1. CALCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL.	61
3.2.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	62
3.2.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	62
3.2.4. CARACTERÍSTICAS BASALES	63
3.3. PROTOCOLO DE ACTUACIÓN	77
3.3.1. RECOGIDA DE MUESTRAS	77
3.3.2. MEDICIÓN DE AGEs	77
3.3.3. MEDICIÓN DE sRAGE	78
3.3.4. OTRAS MEDICIONES	78
3.4. SEGUIMIENTO CLÍNICO	79
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	79
4. RESULTADOS	83
4.1. ARTÍCULOS PUBLICADOS	85

4.1.1. VALOR PRONÓSTICO DEL EJE AGE-RAGE EN LA IC	87
▪ Relation of soluble receptor for advanced glycation end products to predict mortality in patients with chronic heart failure independently of Seattle Heart Failure Score	
4.1.2. VÍAS PATOLÓGICAS ASOCIADAS A LA GLICACIÓN EN LA IC	103
▪ Soluble receptor of advanced glycation end products levels are related to ischaemic aetiology and extent of coronary disease in chronic heart failure patients, independent of advanced glycation end products levels	
▪ Advanced glycation end-products: new markers of renal dysfunction in patients with chronic heart failure	
▪ Evidence for a role of advanced glycation end products in atrial fibrillation	
4.2. OTROS RESULTADOS	157
4.2.1. IMPLICACIONES DEL EJE AGE-RAGE EN LA DISFUNCIÓN DIASTOLICA.	157
4.2.2. IMPLICACIONES DEL EJE AGE-RAGE EN LA DISFUNCIÓN SISTÓLICA.....	158
▪ Implicaciones clínicas de la glicación avanzada en el desarrollo de insuficiencia cardíaca post-infarto	
4.2.3. IMPLICACIONES DEL EJE AGE-RAGE EN LA DISFUNCIÓN VASCULAR.....	179
5. DISCUSIÓN GENERAL	183
5.1. CONSIDERACIONES GENERALES	185
5.2. IMPLICACIONES CLÍNICAS DEL EJE AGE-RAGE EN LA IC	186
5.2.1. VALOR PRONÓSTICO DE LOS AGE	186
5.2.2. VALOR PRONÓSTICO DEL sRAGE	190
5.2.3. GLICACIÓN AVANZADA Y DIABETES MELLITUS	192
5.2.4. EJE AGE-RAGE Y ETIOLOGÍA ISQUÉMICA.....	198
5.2.5. EJE AGE-RAGE Y FIBRILACIÓN AURICULAR.....	204
5.2.6. EJE AGE-RAGE E INSUFICIENCIA RENAL	207
5.3. GLICACIÓN AVANZADA Y DISFUNCIÓN MIOCÁRDICA	210
5.5. GLICACIÓN AVANZADA Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL	212
6. LIMITACIONES.....	215
7. CONCLUSIONES	219
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	223
9. ANEXOS	249
• ANEXO 1.....	251
• ANEXO 2.....	277
• ANEXO 3.....	281

INTRODUCCIÓN: REVISIÓN CRÍTICA DEL PROBLEMA

1.1. RELEVANCIA ACTUAL DE LA INSUFICIENCIA CARDIACA

La insuficiencia cardíaca (IC) continúa siendo uno de los problemas sanitarios más frecuentes, costosos, discapacitantes y letales en los que se ven involucrados tanto médicos de atención primaria como especialistas de diversas áreas^{1,2}. Aunque la comprensión de su epidemiología, fisiopatología, diagnóstico y tratamiento ha avanzado en gran medida en los últimos 25 años, todavía persisten muchos misterios por resolver acerca de esta entidad clínica^{3,4}.

1.1.1. CUESTIONES CLÍNICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS

La insuficiencia cardíaca se define como el estado patológico en el que una anomalía de la función cardíaca es la causante de la imposibilidad del corazón para satisfacer los requerimientos del organismo.

Durante los últimos 50 años han aparecido numerosas definiciones de la IC, que señalan una o varias características de este complejo síndrome, como son los parámetros hemodinámicos, el consumo de oxígeno o la capacidad de esfuerzo⁵. La IC es un síndrome en el que los pacientes presentan las siguientes características: síntomas de IC, típicamente falta de aire o fatiga tanto en reposo como durante el ejercicio; signos de retención de líquidos, como congestión pulmonar o hinchazón de tobillos, y evidencia objetiva de una alteración cardíaca estructural o funcional en reposo⁶. Las alteraciones cardíacas asintomáticas, estructurales o funcionales, se consideran las precursoras de la IC sintomática y están asociadas a una mortalidad elevada^{7,8}.

La enfermedad puede afectar únicamente al lado derecho o al lado izquierdo del corazón y se denominan insuficiencia cardíaca derecha o izquierda respectivamente⁹. Con mucha frecuencia, ambos lados del corazón resultan comprometidos¹⁰.

TABLA 1. Bases del diagnóstico de la insuficiencia cardíaca

SÍNTOMAS TÍPICOS	
Falta de aire en reposo o durante el ejercicio	Cansancio
Fatiga	Hinchazón de tobillos
SIGNOS TÍPICOS	
Taquicardia, taquipnea	Elevación de la presión yugular venosa
Estertores pulmonares	Edema periférico
Derrame pleural	Hepatomegalia
EVIDENCIA OBJETIVA DE ANOMALÍAS ESTRUCTURALES O FUNCIONALES	
Cardiomegalia	Anomalías electrocardiográficas
Tercer sonido, soplos cardíacos	Concentraciones elevadas de BNP

Normalmente se distingue entre la **IC sistólica**, cuando el miocardio no puede bombear adecuadamente la sangre fuera del corazón, y la **IC diastólica**, cuando por alteraciones funcionales de los miocitos la pared cardíaca está rígida dificultando el llenado cardíaco¹¹. En la mayoría de los pacientes con IC hay evidencia de disfunción sistólica y diastólica, tanto en reposo como durante el ejercicio¹². Por tanto la IC diastólica y la sistólica no deben considerarse entidades separadas¹³. Sin embargo, en la práctica clínica diaria se hace una distinción, un tanto arbitraria, entre ambas entidades, utilizando los términos de IC con función sistólica conservada o fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) normal e IC con función sistólica deprimida o FEVI baja. Los pacientes con IC diastólica presentan síntomas y/o signos de IC y una FEVI > 45%-50%, aunque no existe un consenso en cual es el punto de corte de la FEVI para definir una función sistólica como conservada¹⁴.

La prevalencia e incidencia de la IC se están acercando a proporciones epidémicas, como ponen de manifiesto el incremento constante del número de ingresos por dicha patología, la cifra creciente de muertes atribuibles a ella y los costes crecientes asociados a su asistencia.

En la actualidad disponemos de amplia información sobre la epidemiología de la IC. En la Sociedad Europea de Cardiología están representados 51 países, cuyas poblaciones suman más de 900 millones de habitantes, entre los que hay como mínimo 15 millones de pacientes con IC, con una **incidencia anual del 1%**¹⁵. La prevalencia de la IC se sitúa entre el 2 y el 3% y aumenta drásticamente alrededor de los 75 años de edad, hasta llegar a un 10-20% en el grupo de pacientes de 70-80 años¹⁶. La media de edad de los pacientes con IC en los países desarrollados es 75 años¹⁷. En los grupos más jóvenes, la prevalencia es mayor en los varones debido a que la enfermedad coronaria, una de las causas más frecuentes de IC, aparece a edades más tempranas¹⁸. Entre las personas de edad avanzada, la prevalencia es similar en ambos sexos. La IC con FEVI conservada supone aproximadamente la mitad de los casos¹⁹, siendo más común en pacientes de edad avanzada, mujeres, hipertensos y diabéticos²⁰⁻²¹. La prevalencia total de la IC está en aumento debido al envejecimiento de la población, una mayor supervivencia de los pacientes que sufren eventos coronarios y la eficacia de la prevención, que retrasa la aparición de eventos coronarios en los pacientes en alto riesgo y en los que han sobrevivido al primer evento (prevención secundaria)²².

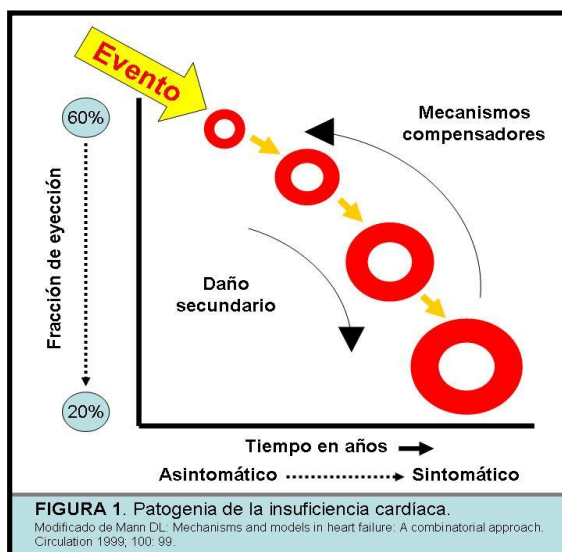
La IC es la causa del 5% de los ingresos hospitalarios urgentes, ocupa el 10% de las camas hospitalarias y representa aproximadamente el **2% de los gastos sanitarios nacionales**, debido en gran parte al coste de las hospitalizaciones²³. En términos generales, las perspectivas para el futuro son poco alentadoras, aunque algunos pacientes pueden vivir muchos años. Del número total de pacientes, **el 50% fallece a los 4 años y el 40% de los pacientes ingresados por IC fallece o reingresa durante el primer año**²⁴⁻²⁵. En algunos países, la mortalidad por IC ajustada por edad ha disminuido, en parte gracias a las nuevas estrategias de tratamiento²⁶⁻²⁷. En cuanto a la IC con FEVI conservada, estudios recientes han demostrado que el pronóstico de estos pacientes es similar al de los pacientes con IC sistólica²⁸.

1.1.2. ETIOPATOGENIA Y FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

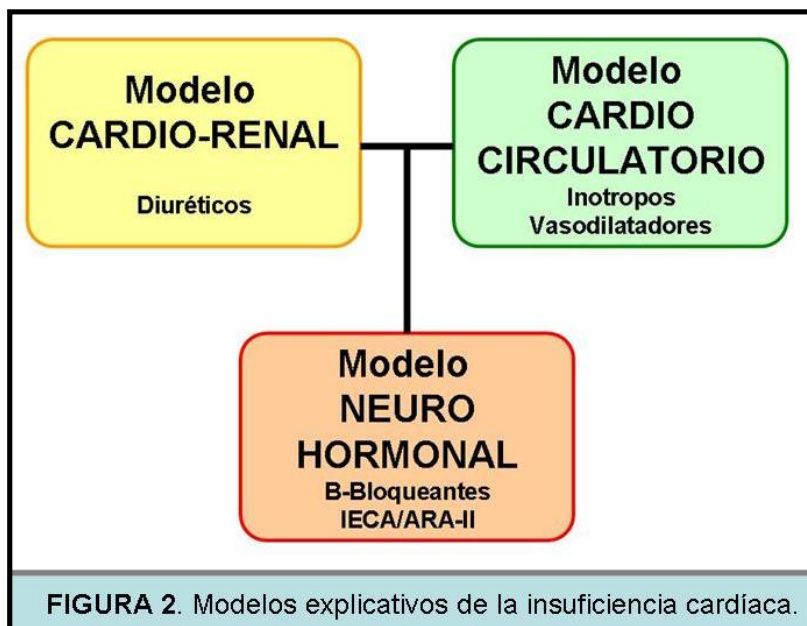
La IC debe ser entendida como algo más que un trastorno hemodinámico, con un enfoque neurohormonal, según el cual la IC progresa no solo como resultado del estrés hemodinámico sino también por la sobreexpresión de moléculas biológicamente activas capaces de ejercer efectos tóxicos directos sobre el sistema cardiocirculatorio.

A pesar de los intentos repetidos de plantear una sola hipótesis que describa el síndrome clínico de la IC, ningún paradigma conceptual único ha superado la prueba del tiempo. Por ello es sorprendente que los médicos e investigadores hayan usado diversos modelos cada vez más complejos con el fin de intentar describir el síndrome de la IC²⁹. Aunque inicialmente se veía la IC como un problema debido a una retención excesiva de sal y de agua causada por alteraciones del flujo sanguíneo renal (“**modelo cardiorrenal**”)³⁰, a medida que empezaron a realizarse medidas hemodinámicas cuidadosas se puso de manifiesto que la IC se acompañaba de un gasto cardíaco reducido y de una vasoconstricción periférica excesiva (“**modelo cardiocirculatorio**”)³¹. Sin embargo ninguno de estos modelos explicaba la progresión implacable de la enfermedad.

La IC debe de entenderse como un **trastorno progresivo** que se inicia después de que un “acontecimiento índice” dañe el músculo cardíaco, con pérdida de cardiomiocitos funcionantes³². Este puede tener un inicio brusco (como en el caso del infarto agudo de miocardio), puede ser gradual (como en el caso de la cardiopatía hipertensiva por sobrecarga progresiva de presión) o puede ser



hereditario (como en el caso de muchas miocardiopatías)³³. A raíz de ahí, incluso en ausencia de un nuevo insulto miocárdico, comienza un proceso progresivo. La principal manifestación de esta progresión es un cambio en la geometría y la estructura del ventrículo izquierdo, de modo que la cámara se dilata y/o hipertrofia y se hace más esférica, un proceso conocido como **remodelación cardíaca**³⁴. Este cambio en el tamaño y estructura del ventrículo izquierdo no solo aumenta el estrés hemodinámico de las paredes cardíacas, sino que también altera su capacidad contráctil³⁵. Estos efectos, a su vez, sirven para mantener y exacerbar el proceso de remodelación³⁶. La remodelación cardíaca generalmente precede al desarrollo de los síntomas (a veces por meses o incluso años) y continúa después de la aparición de estos, contribuyendo sustancialmente al empeoramiento de la clínica a pesar del tratamiento³⁷. La progresión de la enfermedad coronaria, la diabetes mellitus, la hipertensión arterial o la aparición de la fibrilación auricular también puede contribuir a la progresión de la IC³⁸. El desarrollo de anomalías estructurales conduce a alguna de las siguientes circunstancias³⁹: 1) los pacientes mueren antes de desarrollo de los síntomas (en la fase A o B según la clasificación de American College of Cardiology), 2) los pacientes desarrollan síntomas controlados con el tratamiento, o 3) los pacientes mueren de IC progresiva. La muerte súbita puede interrumpir este curso en cualquier tiempo.



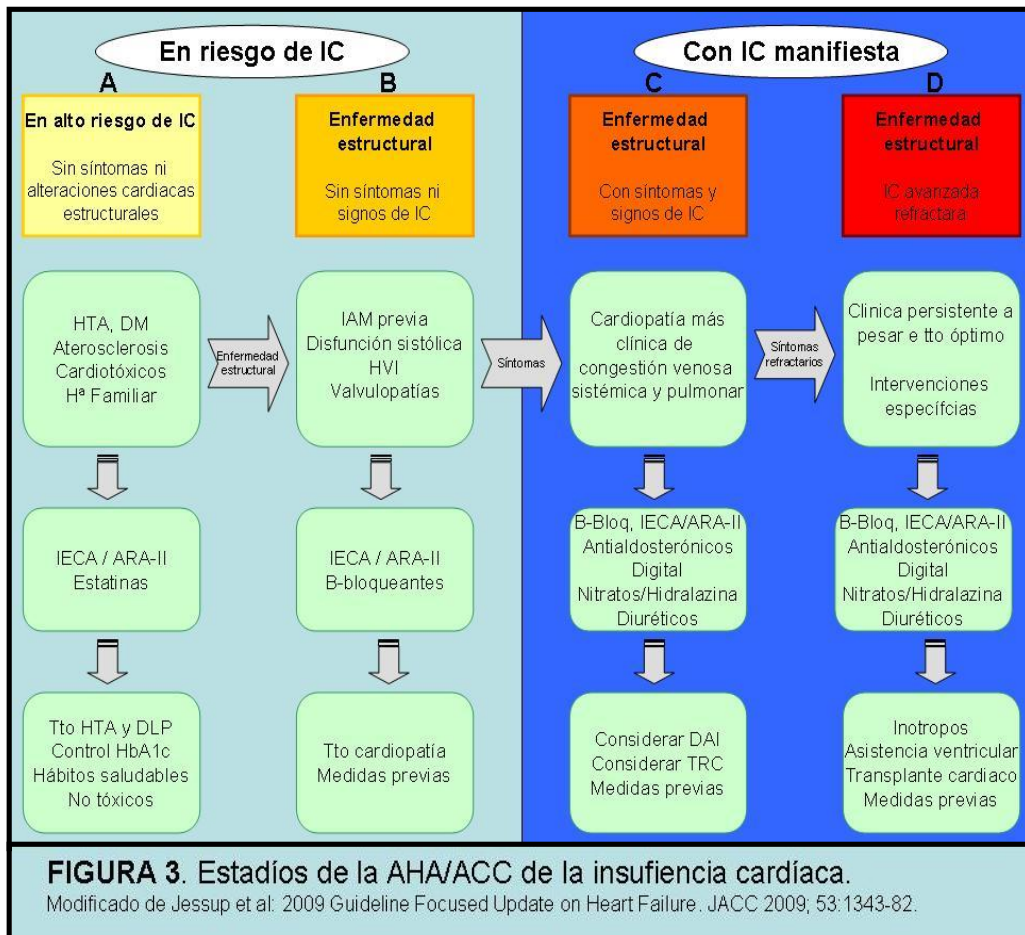
Aunque varios factores pueden acelerar el proceso de remodelación ventricular, hay pruebas sustanciales de que la activación de los sistemas endógenos neurohormonales juega un papel importante en remodelación cardíaca y por lo tanto en la progresión de la IC (**“modelo neurohormonal”**)⁴⁰. Los pacientes con IC tienen elevados niveles circulantes de noradrenalina, angiotensina II, aldosterona, endotelina, vasopresina, y citoquinas, que en conjunto actúan afectando negativamente a la estructura y función del corazón⁴¹⁻⁴². Estos factores neurohormonales no sólo aumentan el estrés hemodinámico ventricular⁴³, sino que también causan retención de sodio y vasoconstricción periférica⁴⁴, ejerciendo también un efecto tóxico directo sobre las células cardíacas, estimulando la fibrosis miocárdica que altera la arquitectura miocárdica y perjudica el funcionamiento del músculo cardíaco⁴⁵⁻⁴⁶. La activación neurohormonal también tiene efectos nocivos directos en los miocitos y el intersticio, alterando el desarrollo fenotípico de estas células⁴⁷⁻⁴⁸.

Los cambios que se producen durante la reestructuración cardíaca en la biología del cardiomiocito así como en la matriz extracelular son, en gran medida, responsables del aumento de rigidez del miocardio, de la dilatación progresiva del ventrículo izquierdo y de su disfunción contráctil.

El proceso de reestructuración del ventrículo izquierdo tienen un efecto importante en la biología del miocito cardíaco⁴⁹, en los cambios del volumen de los componentes miocítico y no miocítico del miocardio y en la geometría y arquitectura de la cámara del ventrículo izquierdo⁵⁰⁻⁵¹. Con respecto a los cambios que se producen en el **componente miocítico**, cada vez más pruebas indican que la pérdida progresiva de miocitos, mediante vías de muerte celular necrótica, apoptótica o autofágica, puede contribuir a la disfunción cardíaca progresiva y a la reestructuración del ventrículo izquierdo⁵²⁻⁵³. Los cambios de la **matriz extracelular** constituyen la segunda adaptación miocárdica importante que aparece durante la reestructuración cardíaca⁵⁴. Se produce una acumulación de colágeno (fundamentalmente a expensas de los colágenos I, III y IV, así como otras moléculas tales como fibronectina, laminina y vimentina)⁵⁵, generando

fibrosis miocárdica a nivel del espacio intersticial (fibrosis intersticial), rodeando las arterias y arteriolas coronarias intramurales (fibrosis perivascular) y en sustitución de los cardiomiocitos necróticos (fibrosis cicatricial)⁵⁶. Además, los estudios clínicos indican que hay una pérdida progresiva del entrecruzamiento del colágeno, así como una pérdida de conectividad de la red del colágeno con los miocitos individuales, lo que es de esperar que provoque profundas alteraciones en la estructura y función del ventrículo izquierdo⁵⁷⁻⁵⁸. Aunque se desconocen todas las moléculas que son responsables de la activación del fibroblasto, muchas de las neurohormonas clásicas (por ejemplo, la aldosterona)⁵⁹ y citocinas (como el factor de crecimiento beta)⁶⁰ que se expresan en la IC son suficientes para provocar la activación del fibroblasto. Uno de los desarrollos más excitantes respecto a la comprensión de la reestructuración cardíaca ha sido el descubrimiento de una familia de enzimas colagenolíticas, llamadas en conjunto **metaloproteinasas de la matriz** (MMP)⁶¹, que se activan dentro del miocardio disfuncionante. La ruptura de la matriz extracelular llevaría a una dilatación ventricular y un adelgazamiento de la pared como resultado de la realineación mural de los haces de miocitos, así como a una disfunción contráctil como resultado de una contracción asincrónica del ventrículo izquierdo⁶². Todavía no se conocen los desencadenantes bioquímicos responsables de la activación de las MMP⁶³, aunque se ha puesto mucho énfasis en el rol del factor de necrosis tumoral (TNF) así como otras citocinas y factores de crecimiento peptídicos⁶⁴.

Toda esta progresión fisiopatológica de la enfermedad se traduce a efectos clínicos en un **modelo continuo de la enfermedad**. El desarrollo de la IC puede ser debidamente caracterizado teniendo en cuenta cuatro etapas, tal y como se describe en la última versión de la *Guía de Práctica Clínica de Insuficiencia Cardíaca del American College of Cardiology y de la American Heart Association*³⁹. Este sistema de clasificación reconoce que la IC, al igual que la enfermedad arterial coronaria, presenta una serie de factores de riesgo así como unos requisitos estructurales, que el desarrollo de la IC tiene fases sintomáticas y asintomáticas, y que los tratamientos específicos en cada etapa pueden reducir la morbilidad y la mortalidad de la insuficiencia cardíaca.



La IC como síndrome clínico puede deberse a alteraciones a nivel de pericardio, miocardio, endocardio o grandes vasos.

Una vez comprendida la fisiopatología, no resulta difícil de entender que cualquier trastorno que lleve a una alteración de la estructura o función del ventrículo izquierdo puede predisponer a desarrollar IC. Aunque la causa de la IC en los pacientes con FEVI conservada difiere de la causa en aquellos con FEVI deprimida, hay un solapamiento considerable entre las causas de estos dos trastornos⁶⁵. En relación con la IC con FEVI deprimida, en los países desarrollados la **enfermedad arterial coronaria** es la principal responsable, alcanzado porcentajes que oscilan entre el 60 y el 75% de los casos. Le seguirían las miocardiopatías (10%) y las valvulopatías (5-10%). En relación con la IC con

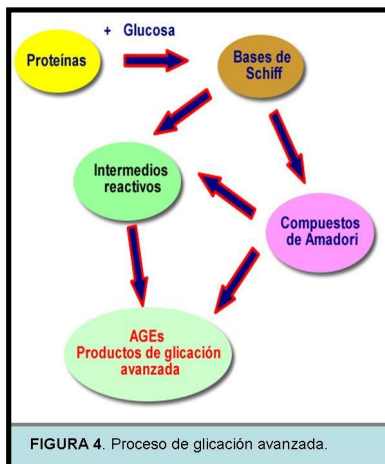
FEVI conservada, la **hipertensión arterial sistémica** es la principal causa (60-70%)^{6,66}.

TABLA 2. Causas de insuficiencia cardíaca crónica

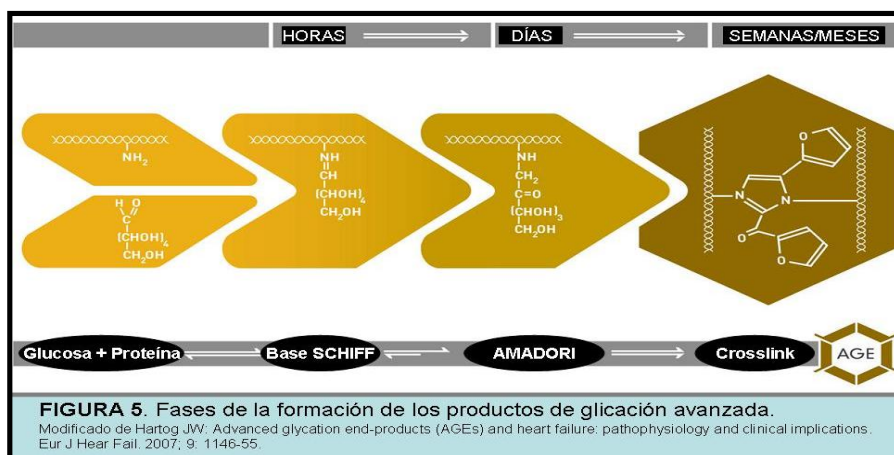
Enfermedad arterial coronaria Infarto agudo de miocardio Isquemia miocárdica
Sobrecarga crónica de presión Hipertensión Valvulopatía obstructiva
Sobrecarga crónica de volumen Insuficiencia valvular Cortocircuito intracardiaco Cortocircuito extracardiaco
Miocardiopatía dilatada no isquémica Trastorno familiar/genético Enfermedades infiltrativas Lesión inducida por tóxico o fármaco Trastorno metabólico Virus u otros microorganismos infecciosos
Trastornos de frecuencia y ritmo Bradiarritmias crónicas Taquiarritmias crónicas
Cardiopatía pulmonar
Estados con gasto cardíaco alto <i>Anemia crónica</i> <i>Tirotoxicosis</i> <i>Cortocircuito arteriovenoso sistémico</i> <i>Trastornos nutricionales</i>

1.2. PROCESO DE GLICACIÓN AVANZADA

La glicación no enzimática fue descrita por primera vez en 1912 por el químico francés Louis-Camille Maillard, quien trataba de explicar el color dorado de los alimentos al cocinarlos y el cambio de color y textura de los alimentos tras un almacenamiento prolongado⁶⁷. La **reacción de Maillard** o glicación no enzimática comienza con la formación espontánea de una **base de Schiff**



reversible, entre el grupo aldehído de un azúcar reductor (como la glucosa) y el grupo amino primario de una macromolécula, habitualmente una proteína⁶⁸. En poco tiempo (días), la base de Schiff puede reorganizarse intramolecularmente y alcanzar un equilibrio más estable, aunque aún reversible, denominado **producto de Amadori** (en el caso de la glucosa)⁶⁹. Tras algunas semanas, los productos de Amadori pueden sufrir reacciones espontáneas intra e intermoleculares, deshidrataciones y condensaciones, para generar un conjunto heterogéneo de productos irreversibles, que son en general fluorescentes, amarillentos y estables⁷⁰. Estos productos se denominan colectivamente productos de glicación avanzada, conocidos como **AGEs** (Advanced Glycation End-products), y su formación es enteramente no enzimática⁷¹. Desde que se descubrió que tal proceso también ocurría *in vivo*, se ha sugerido que los AGEs pueden estar implicados en la fisiopatología de diversas enfermedades⁷².



1.2.1. PRODUCTOS DE GLICACIÓN AVANZADA (AGE): FORMACIÓN

Los AGE son moléculas que aparecen en plasma y se acumulan en diversos tejidos como consecuencia de la oxidación de una serie de compuestos que en su mayor parte se obtienen por glicación.

Las glicaciones no enzimáticas consisten en una serie de reacciones en los grupos amino libres de las proteínas (como, por ejemplo, residuos de lisina) con los grupos carbonilo de los azúcares aldehídos, como la glucosa acíclica, a través de una adición nucleofílica formándose de este modo una aldimina, conocida como **base de Schiff**⁷³. Este producto temprano de la glicación aumenta rápidamente unas pocas horas después de la incubación de proteína y glucosa⁷⁰.

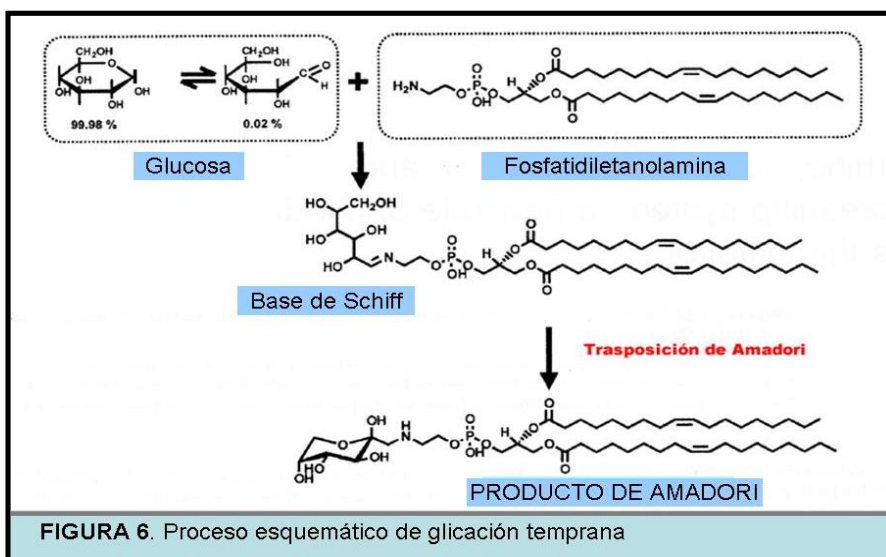


FIGURA 6. Proceso esquemático de glicación temprana

La concentración de las bases de Schiff depende de altas concentraciones de glucosa y se trata de una reacción lenta⁶⁸. A través de una catálisis ácido-base, estos residuos lábiles sufren reordenamientos moleculares secuenciales, llamados **reordenamientos de Amadori**, para formar una 1-amino-deoxifruktosa (fructosamina) estable, la cual puede ciclarse a una estructura de anillo⁶⁹. La reacción de glicación sigue una cinética de segundo orden y principalmente depende de la concentración y del tiempo de exposición a la glucosa⁷¹. *In vivo*, estos dos factores se trasladan al grado y duración de la hiperglicemia en la diabetes, produciendo una lenta e irreversible glicación de las proteínas⁷⁴. De los

datos experimentales se sabe que la fructosamina alcanza su equilibrio de reacción a las 38 horas⁷⁵. A partir de aquí se pueden obtener otros productos de glicación tempranos más complejos como la **albúmina glicada** y la **hemoglobina glicada**⁷⁶.

La albúmina glicada supone el 80% de las proteínas glicadas circulantes y la albúmina modificada con Amadori es la forma predominante *in vivo*⁷⁷. En la albúmina *in vivo*, los principales residuos sujetos a glicación son lisinas en las posiciones 525, 439, 281 y 199, siendo la más importante la modificación en la posición 525⁷⁸. La albúmina glicada tiene sus propios efectos

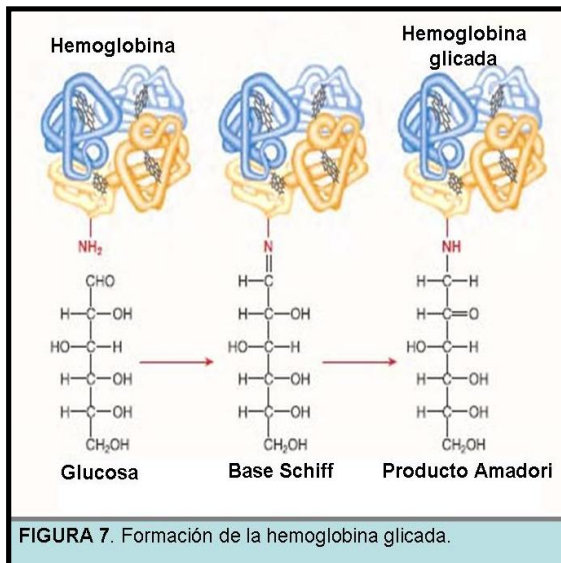
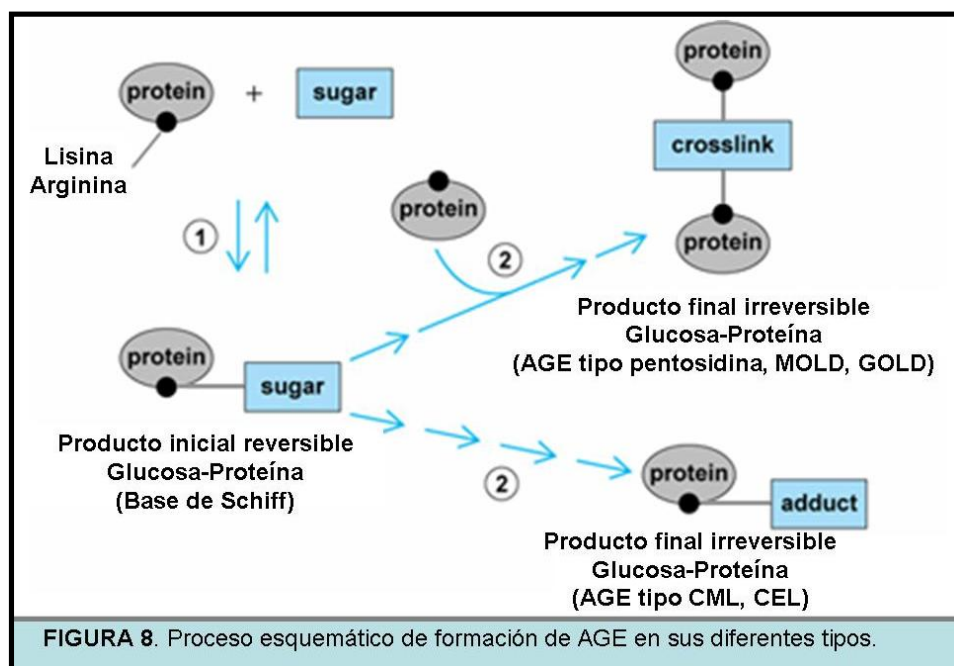


FIGURA 7. Formación de la hemoglobina glicada.

biológicos relacionados con la nefropatía diabética y otras complicaciones⁷⁹⁻⁸⁰. Al igual que la medida de la cantidad de hemoglobina glicada (HbA1c) en eritrocitos, la determinación de la concentración en el suero de la albúmina glicada evalúa la glicemia de una manera retrospectiva, abarcando un periodo de entre 2-3 semanas en humanos⁸¹. La hemoglobina glicada (HbA1c), es otro producto de Amadori y sirve como marcador del estado glicémico durante un mayor periodo de tiempo. Así mismo hoy en día es un parámetro analítico de gran relevancia clínica, implicado en el diagnóstico y pronóstico de la diabetes mellitus (DM), con implicaciones terapéuticas directas⁸².

Solo una parte de estos productos de Amadori, que son relativamente estables, pueden sufrir un cambio más, formándose los AGE⁷³. En función del número de proteínas, pueden ser mono o poliméricos⁸³. Los AGE más conocidos son la **pentosidina** (dimérica) y la **carboximetil-lisina** (monomérica)⁸⁴.



Así mismo, en función de su naturaleza química, los AGE pueden clasificarse en 2 grupos, según predominen en su estructura molecular los anillos imidazólicos (como son el 2-(2-furonil)-4(5)-(2-furanil)-1H-imidazol [FFI] o el 1-alkil-2-formil-3,4-diglicosil pirrol [AFGP]) o los pirrólicos (caso del 5 hidroximetil-1-alkilpirrol-2-carbaldehído [pirralina], la carboximetil-lisina o la pentosidina)⁸⁵.

Una distinción importante entre los productos de Amadori y los AGEs es la naturaleza irreversible de estos últimos⁷³, catalizada por el estrés oxidativo, que juega un papel transcendental en este último paso para la formación de los AGE⁸⁶. Los AGEs a su vez favorecen la oxidación^{87,88} y de esta forma retroalimentan su propia formación⁸⁹.

Los AGEs no se asocian únicamente a la diabetes, como consecuencia de la hiperglicemia mantenida; el estrés oxidativo y el exceso de radicales libres también conduce a su formación.

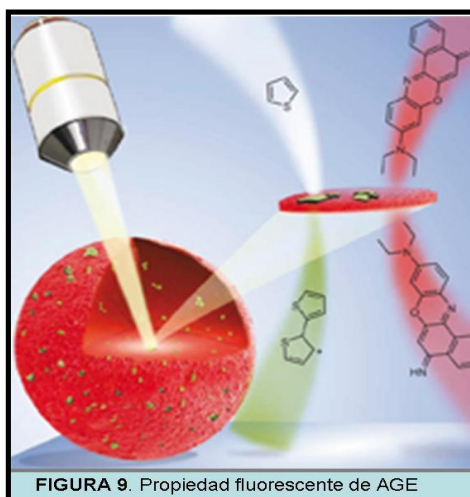
La formación de AGEs depende de un alto número de variables: temperatura, pH, concentración de proteínas y glucosa, nivel oxidativo y tasa de renovación (*turnover*) del sustrato⁹⁰. A efectos fisiopatológicos, se resume básicamente en la

interacción de dos factores: **la existencia de un estado de hiperglicemia mantenido y/o un alto grado de estrés oxidativo**⁹¹. De ahí que el acúmulo de AGE no se restrinja únicamente a pacientes diabéticos. Así la edad, el tabaquismo y diversos alimentos precocinados conducen a un aumento de los niveles plasmáticos de AGE⁹²⁻⁹⁴. También en estados de alto estrés oxidativo, como la insuficiencia cardíaca o la insuficiencia renal, los niveles de AGE se encuentran elevados⁹⁵⁻⁹⁷.

Además de la vía mediada por carbohidratos, se han identificado otras rutas de formación de AGE, ya sea por autooxidación o glicolisis de la glucosa⁹⁸. La **ruta de los polioles** (mecanismo de auto-oxidación) está basada en una familia de enzimas reductasas, que producen alcoholes de azúcar (polioles) a partir de compuestos carbonilos y de NADPH⁹⁹. En cuanto a la sobreactivación del **metabolismo de las hexosaminas** (mecanismo de glucolisis), en esta ruta la fructosa 6-fosfatasa se separa de la glucolisis para suministrar un sustrato a la enzima glutamina:fructosa 6-fosfatasa amidotransferasa¹⁰⁰. Esta enzima modifica las proteínas uniendo N-acetilglucosamina en serinas o treoninas. Ambas vías confluyen en el metilglioxal, compuesto dicarbonilo derivado de las triosas fosfato, que es generado dentro de las células a partir del metabolismo del gliceraldehído 3-fosfato, así como de la oxidación de las cetinas¹⁰¹. Este compuesto altamente tóxico está aumentado en la DM y es capaz de modificar rápidamente las proteínas y generar AGEs¹⁰². El catabolismo del metilglioxal es dependiente de glutatión reducido y este último disminuye si aumenta el estrés oxidativo, lo que condiciona un incremento de la permanencia del tóxico dentro de la célula y, por consiguiente, una prolongación de sus efectos celulares deletéreos¹⁰³. Las triosas fosfato (fructosa 1-6-bifosfato, gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato), productos de la primera fase de la glucólisis, están aumentadas en la DM debido a la inhibición de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Estas triosas son, por lo menos, 100 veces más auto-oxidables y 200 veces más glucosilantes, respectivamente, que la glucosa, y son el origen de la síntesis enzimática del metilglioxal¹⁰⁴. Además, el gliceraldehído 3-fosfato está siempre en forma de cadena abierta, por lo que puede formar AGEs más rápidamente que la glucosa, y el producto de su reducción, conocido como glicerol 3-fosfato, es el sustrato inicial de la síntesis de diacilglicerol, que activa a la proteína quinasa C^{105,106}.

Adicionalmente, la glucosa tiene la capacidad para reaccionar con los aminofosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina y fosfatidilserina) y formar bases de Schiff así como compuestos de Amadori lipídicos que se comportan como potentes inductores de la formación de los lipoperóxidos que producen el estrés oxidativo¹⁰⁷. A esos productos finales de la glicación de los lípidos se les denomina **ALEs (Advanced lipoperoxidation end products)**¹⁰⁸.

Los AGEs han sido tradicionalmente medidos usando su propiedades fluorescentes¹⁰⁹, ya que al ser estimuladas con luz de 370 nm de longitud de onda son capaces de emitir luz entre los 440 y 460nm¹¹⁰. Recientemente, algunos métodos de espectrometría de masas han sido desarrollados para la determinación de los niveles de AGE en tejidos así como en muestras sanguíneas¹¹¹. Estos



incluyen la espectrometría de masas asociada a cromatografía de gases (GC-MS: *Gas Chromatography/Mass Spectrometry*)¹¹² o de líquidos (LC-MS: *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*)¹¹³, siendo ésta última el método más preciso en el momento actual. Otros métodos también usados son el de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)¹¹⁴ y el de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC: *high performance liquid chromatography*)¹¹⁵.

Aunque existen numerosos estudios que explican el papel de los efectos biológicos de los AGE en el sistema vascular¹¹⁶, hay que matizar que en éstos no se hace una adecuada separación de los AGEs y de los productos de Amadori. Así hay que tener en cuenta que en las proteínas glicadas del plasma hay más productos de Amadori que bases de Schiff y que solo una pequeña parte de los productos de Amadori se reordenan para formar AGEs¹¹⁷; por poner un ejemplo, un 3-8% de las proteínas séricas son productos de Amadori frente a <0.01% de

AGEs¹¹⁸. Esto quiere decir que pueden tener más presencia los posibles efectos de los Amadori que los de los AGE. *In vitro* sucede lo mismo: con concentraciones de glucosa entre 5 y 25 mM durante 10 días, la cantidad de productos de Amadori sobre la albúmina aumenta en un 10%, mientras que, en las mismas condiciones, no se aprecia la aparición de ningún AGE sobre la albúmina¹¹⁹. Solo aparecerían AGEs en incubaciones más largas pero nunca llegan a tener una concentración tan alta como los productos de Amadori. Por ello, pese a que muchos artículos describen tratamientos con AGE, las preparaciones de éstos es probable que contengan una concentración mayor de productos de Amadori, así que parte de los efectos descritos en estos estudios pueden estar mediados por estos últimos y no por los AGE.

Sin embargo los productos de Amadori tienen sus propios receptores, diferentes de los de los AGEs¹²⁰. Estudios con albúmina glicada mostraron que la albúmina Amadori no compite con la albúmina-AGE por el receptor de AGE (denominado RAGE, del inglés *Receptor for Advanced Glycation End-products*) y puede ejercer sus propios efectos¹²¹. Además los efectos causados por los productos de Amadori se han visto experimentalmente con independencia del RAGE. Hattori y colaboradores observaron la activación del NF-kB y de la AP-1 en células del músculo liso vascular tratadas con albúmina con productos de Amadori y también con AGE¹²². La activación de los factores de transcripción fue inhibida por el RAGE soluble cuando esta activación era consecuencia del tratamiento con AGE, pero no fue inhibida en el caso del tratamiento con productos de Amadori. En cardiomiocitos de rata, el tratamiento con albúmina modificada tanto con productos de Amadori como con AGE aumentaba el estrés oxidativo y éste solo era inhibido por los anticuerpos contra el RAGE en los tratamientos con AGE, pero no en los tratamientos con los productos de Amadori¹²³. Estos estudios muestran claramente que los productos de Amadori ejercen unos efectos independientemente de los AGE.

1.2.2. RECEPTORES DE AGE

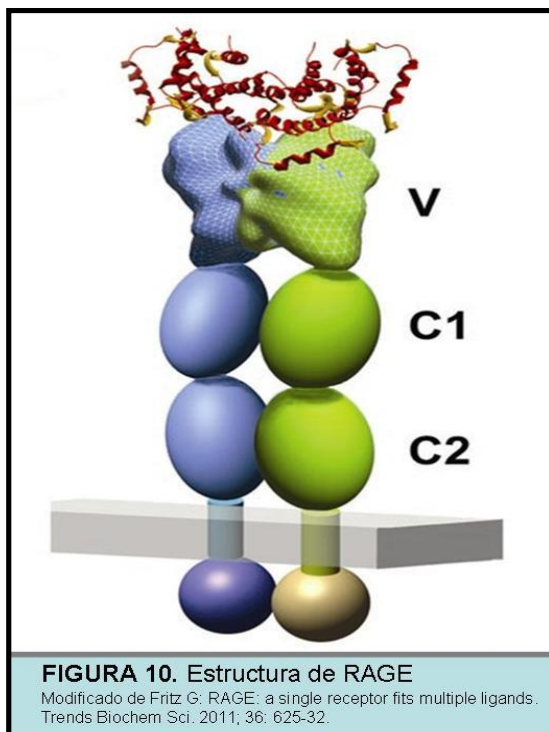
Los receptores para los AGEs (RAGE) son moléculas ubicadas en la superficie celular que interactúan con patrones moleculares tridimensionales, más que con secuencia de aminoácidos, lo que los hace adecuados para unirse a varios ligandos.

El descubrimiento de receptores específicos para estos productos de glicación avanzada, los RAGE, no ha hecho sino incrementar el interés por estos productos, ya que los RAGE intervienen en la génesis de algunas enfermedades crónicas así como en el desarrollo y mantenimiento del síndrome metabólico.

Los RAGE son unos receptores de membrana que pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas¹²⁴.

Se trata una proteína tipo I de ubicación transmembrana y compuesta por tres dominios a semejanza de las inmunoglobulinas¹²⁵. Presenta una estructura helicoidal en su porción transmembrana y un parte terminal C citosólica, altamente acídica, mediante la cual se hace la transducción de la señal al interior de la célula¹²⁶. En la parte extracelular más distal se encuentra un dominio variable (región V)

mediante el cual se une a los ligandos, seguido de dos dominios constantes (región C1 y C2) de los cuales no se tiene claro sus funciones, pero se ha reportado que el C1 adyacente a la región V, puede participar en la unión a los ligandos¹²⁷. La expresión de RAGE es codificada por el gen AGER, que se



encuentra en el locus del complejo mayor de histocompatibilidad en la región de Clase III, en el cromosoma 6 del humano y en el 7 del ratón¹²⁸.

El RAGE no es el único receptor que interacciona con los AGEs; los monocitos-macrófagos poseen receptores recolectores (*scavenger*) que interaccionan con AGEs (AGE-R)¹²⁹. Sin embargo, la unión de los AGEs con los receptores en los monocitos induce endocitosis y extracción de estos compuestos del medio donde se encuentren¹³⁰. En el caso del RAGE esta interacción induce señalizaciones que originan respuestas celulares que llevan a la inflamación¹³¹. Esta propiedad, junto con los diversos ligandos endógenos, hace de RAGE un importante factor en el desarrollo y progreso de las enfermedades inflamatorias y las asociadas al envejecimiento.

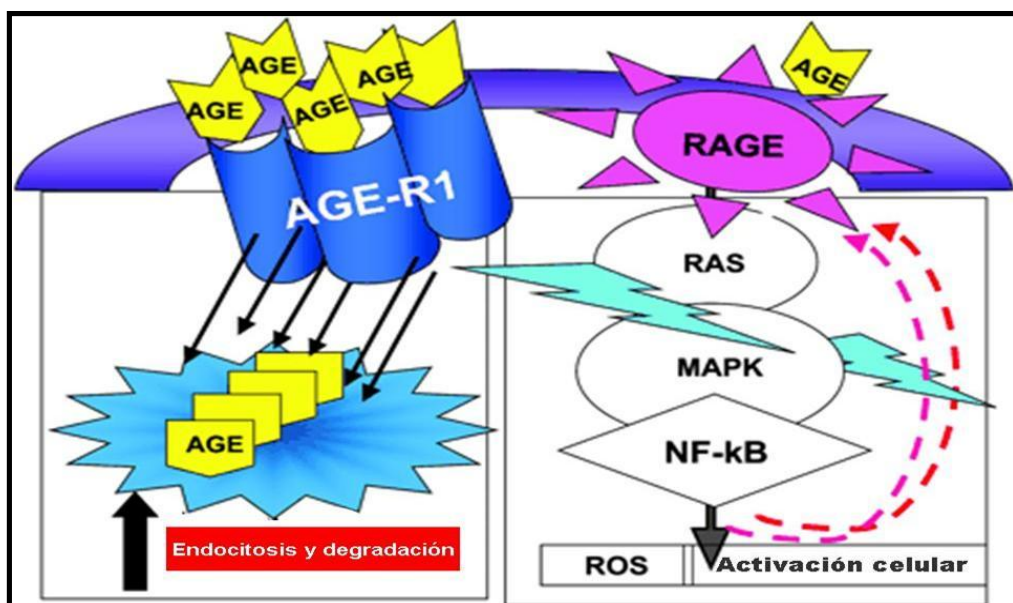


FIGURA 11. Diagrama de la interacción entre AGE-R1 y RAGE.

· La sobreexpresión de AGE-R1 potencia la unión a AGE y su degradación, inhibiendo la activación celular mediada por RAGE.

Modificado de Lu C.: Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101; 11767-72.

Los RAGE parecen funcionar induciendo la transcripción del factor NF-KB proinflamatorio y suprimiendo los mecanismos endógenos de autoregulación, favoreciendo la perpetuación de la inflamación.

A semejanza de los receptores parecidos a Toll (TLR: *Toll like receptors*), cuando RAGE es activado por alguno de sus ligandos en la superficie celular, induce una serie de señalizaciones que involucran al **factor de transcripción nuclear NF- κ B**¹³², éste a su vez induce una serie de eventos pro-inflamatorios. Esto implica el paso de este factor de transcripción desde el citoplasma, donde se encuentra retenido, al núcleo, donde ejerce su función¹³³. Entre las vías que pueden ser activadas para la translocación del factor NF- κ B al núcleo se encuentran las cinasas del fosfatidilinositol-3 o proteína cinasa -B (PI3K) y la vía de las proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPKs)¹³⁴⁻¹³⁵. En este último grupo se encuentran la cinasa N-terminal c-Jun (JNK), p38 y las cinasas reguladas por signos extracelulares (ERK)¹³⁶. Estas vías de señalización están interconectadas entre sí para regular de manera general a las células en respuesta a varios estímulos.

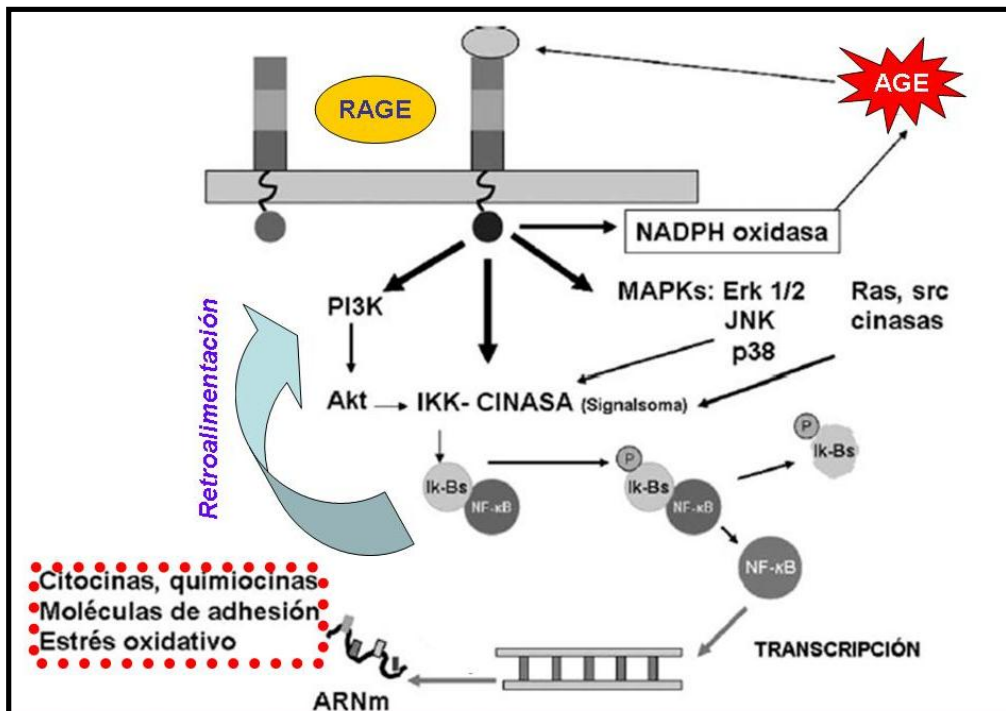


FIGURA 12. Esquema de señalización de la activación de RAGE.

· Tras la activación de RAGE por AGE, el componente citosólico de la molécula activa una red de sistemas de señalización compuesta principalmente por las cinasas del fosfatidilinositol-3 (PI3K) y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Estas señalizaciones convergen en el complejo de cinasas llamadas IKK signalosomal que fosforilan al inhibidor del factor de transcripción NF- κ B en el citoplasma (I κ -Bs); éste deja libre al NF- κ B y posteriormente es degradado. El NF- κ B se transloca al núcleo induciendo al ADN a codificar para varios factores proinflamatorios como la expresión de moléculas de adhesión, citocinas, quimiocinas y el estrés oxidativo. A su vez el ADN codifica para la neoexpresión de RAGE, actuando como un mecanismo de retroalimentación y aumentando el proceso inflamatorio.

Modificado de Mosquera JA.: Role of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in inflammation. Invest Clin 2010; 51: 257 - 268.

Debido a que la expresión de RAGE es también controlada por NF- κ B, la activación de RAGE y la señalización de NF-KB incrementan la expresión de RAGE en la superficie celular, con posterior aumento del proceso inflamatorio¹³⁷⁻¹³⁸. La clave de la activación de NF-KB es la fosforilación de su inhibidor (I κ B), que mantiene retenido al NF-KB en el citoplasma¹³⁹. I κ B es fosforilado por el complejo de cinasas llamadas IKK signalsomal¹⁴⁰. Después de fosforilado el inhibidor es degradado por un proteosoma¹⁴¹. Aunque los estímulos para RAGE pueden ser variables, todos convergen en el IKK que sirve como unión común para activar al NF-KB¹⁴²⁻¹⁴³.

RAGE comparte ciertos ligandos con los TLRs como las **HMGB1** [*High-mobility group protein B1*, que incluye la *high-mobility group protein 1* (HMG-1) y la anfoterina)]¹⁴⁴, pero a diferencia de ellos, no se ha reportado en los TLRs interacción con otros ligandos de RAGE como los AGEs, **S100** y los **péptidos amiloides β** ^{145,146}. La interacción de RAGE con sus ligandos puede inducir señalización por diferentes vías. Así, por ejemplo, en la interacción con las proteínas S100B o S100A6, una puede activar la vía de la cinasa PI3/AKT y la otra la vía de JNK, a pesar de que los ligandos pertenecen a la misma familia y son estructuralmente muy similares¹⁴⁷. También se ha demostrado que RAGE y los TLRs tienen diferente afinidad por un ligando común. Los ligandos endógenos pueden tener una constante de disociación más baja cuando interactúan con RAGE que cuando lo hacen con los TLRs, sin embargo los ligandos originados por patógenos, se unen más estrechamente a TLRs que a RAGE¹⁴⁸. Esta afinidad entre ligando y receptor puede determinar la fuerza de la señal y la vía de señalización. Unido a esto, las citocinas, como las interleucinas 4 y 13, pueden modular la especificidad de las señalizaciones celulares al formar diversos complejos de señalización con diversos ligandos¹⁴⁹. A diferencia de los TLRs, el RAGE posee en su estructura un dominio citosólico que no tiene homología con los de los TLRs, lo que podría generar distintas vías de señalización y de regulación¹⁵⁰.

No se sabe cómo las señalizaciones originadas en el RAGE pueden originar un estado de inflamación aguda o crónica. Al respecto existen dos hipótesis: 1) Los ligandos de RAGE deben estar polimerizados (oligomerizados) para tener una

adecuada interacción con RAGE¹⁵¹. Se ha determinado que la forma tetramérica de la S100B es mas efectiva en generar supervivencia celular que las formas diméricas. Adicionalmente se ha demostrado que solo las formas multiméricas de la familia de las S100 pueden activar señalizaciones a través del RAGE y eventos celulares¹⁵². Sin embargo, estos experimentos no se han realizado para determinar la diferencia entre inflamación aguda y crónica. 2) Alternativamente, el origen de los ligandos pudiese estar relacionado con la inducción de la inflamación aguda o crónica. A este respecto, se ha descrito que los efectos mediados por el RAGE y los TLRs se pueden combinar para generar una respuesta inflamatoria aguda en respuesta a patógenos; sin embargo, los ligandos de origen endógeno con una constante de disociación baja, pueden originar inflamación crónica¹⁵³. Se requieren estudios de la cinética de interacción del RAGE y sus ligandos y la duración de las señalizaciones para poder sustentar estas dos hipótesis y entender los mecanismos regulatorios críticos. La evidencia experimental sugiere que la señalización inducida por el RAGE resulta en inflamación¹⁵⁴; sin embargo, y a diferencia de los TLRs, la señalización generada por el RAGE es también importante en otros procesos fisiológicos de desarrollo celular¹⁵⁵.

La unión de AGE a su receptor favorece la infiltración leucocitaria.

Además de los efectos producidos por la activación del RAGE, esta molécula puede actuar como un receptor de adhesión en los leucocitos y permitir la extravasación de estas células cruzando la barrera endotelial¹⁵⁶. Experimentos en ratones AGER -/- muestran que la infiltración leucocitaria está disminuída ante un estímulo inflamatorio, efecto que es revertido al inducir la expresión de RAGE¹⁵⁷. El reclutamiento y la infiltración de leucocitos a través del endotelio es un proceso primario en la inflamación y también uno de los pasos tempranos de la aterogénesis¹⁵⁸. Experimentos *in vitro* han demostrado que el RAGE se une a las células del endotelio mediante la interacción con la beta-integrina Mac-1, acción que es potenciada por el ligando de RAGE S100B¹⁵⁹. De esta manera el RAGE representa una alternativa para proteínas como la molécula de adhesión intercelular -1 (ICAM-1) en la infiltración leucocitaria¹⁶⁰.

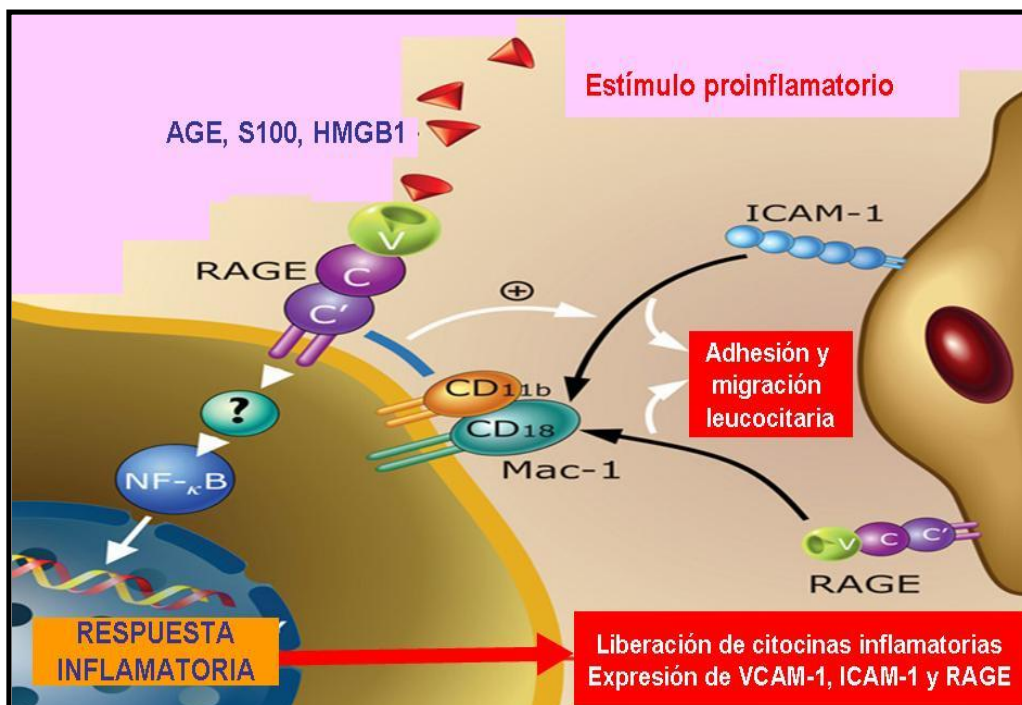


FIGURA 13. Participación de RAGE en la respuesta inflamatoria.

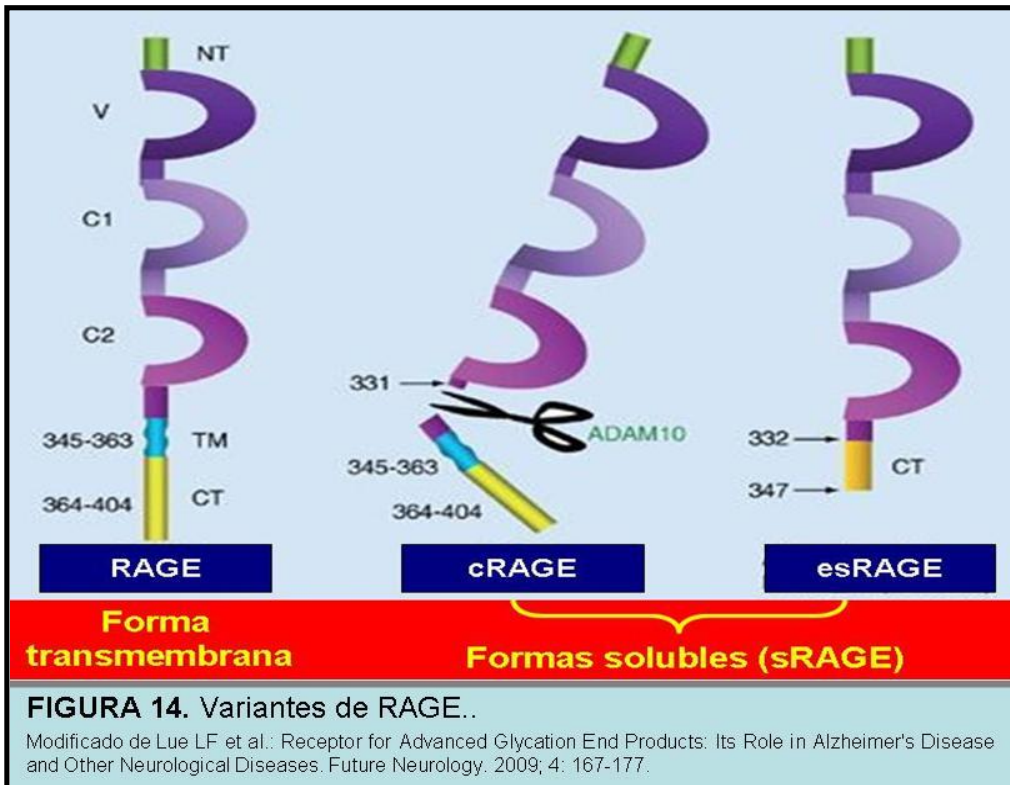
• Ante determinados estímulos proinflamatorios, se produce una liberación de moléculas como AGE, HMGB1 and S100, con capacidad de unirse a los RAGE. La unión de RAGE con sus ligandos conlleva la activación de una respuesta proinflamatoria mediada por NF-κB, puesta en marcha por una cascada de señalización intracelular. Además, RAGE interactúa con la integrina leucocitaria CD11b/CD18 (Mac-1), facilitando la adhesión, migración y reclutamiento de los leucocitos.

Modificado de Van Zoelen M.: RAGE during infectious diseases. *Frontiers in Bioscience*. 2011; S3: 1119-32.

La forma soluble de RAGE incluye dos subtipos: uno, secretado directamente por las células; otro, secundario al proceso de proteólisis del receptor transmembrana.

El gen AGER codifica para varias isoformas de RAGE¹⁶¹. Se ha determinado que los ARN mensajeros codifican tanto para las formas truncadas N- y C-terminal de RAGE en células endoteliales, pericitos y pulmón¹⁶². La **forma de RAGE truncada en N-terminal**, pierde el dominio V en su porción extracelular; por lo tanto, no puede unirse a los AGE¹⁶³. La **forma truncada en C-terminal**, referida como RAGE endógeno secretado (esRAGE, del inglés *endogenous secretory RAGE*), no contiene la porción transmembrana y, por lo tanto, es secretado al espacio extracelular como una proteína soluble¹⁶⁴. Además de la forma secretada del RAGE, este puede ser cortado de la superficie celular por proteólisis, recibiendo el

nombre de RAGE escindido (cRAGE, del inglés *cleaved RAGE*)¹⁶⁵. Estas dos formas de RAGE (esRAGE y cRAGE) son los que forman en el plasma el llamado RAGE soluble (sRAGE, del inglés soluble RAGE)¹⁶⁶. No se tiene claro cuales son los procesos ligados a un aumento de estas formas de RAGE en el plasma. Estos pueden estar ligados a la estructura genómica del AGER o ser influenciados por otros factores¹⁶⁷.



El incremento del RAGE soluble puede ser de importancia como maniobra terapéutica en el caso de las enfermedades mediadas por RAGE. Al respecto se ha demostrado que el **RAGE soluble tiene la capacidad de unirse a los AGE evitando las señalizaciones generadas por el RAGE en la superficie celular**, siendo por ende, un potencial instrumento terapéutico para las enfermedades inflamatorias como diabetes y enfermedades cardiovasculares¹⁶⁸. En ratones diabéticos, la administración del RAGE soluble suprime la formación de placas ateroscleróticas en aorta¹⁶⁹. Así mismo, la administración del RAGE soluble también previene eventos inflamatorios vasculares como la expresión de las moléculas de adhesión a células vasculares tipo 1 (VCAM-1), el factor tisular y las

metaloproteinasas de la matriz¹⁷⁰. El RAGE soluble también estabiliza las placas ateroscleróticas ya formadas en ratones apoe -/- diabéticos y no diabéticos¹⁷¹.

Aunque en situaciones basales RAGE soluble resulta un factor protector del daño producido por los AGE, en estados patológicos niveles altos de RAGE soluble traducen una mayor gravedad de la enfermedad.

Se han realizado varios estudios clínicos para definir si los niveles del RAGE soluble están asociados a enfermedades cardiovasculares o metabólicas. Lo que se ha encontrado en la mayoría de dichos estudios resulta un tanto paradójico, puesto que se ha visto en varios estudios que la concentración sérica del RAGE soluble se encontraba incrementada en pacientes con insuficiencia renal e insuficiencia cardíaca, así como en los procesos ateroscleróticos¹⁷²⁻¹⁷⁵. La explicación radica en que la medición global del RAGE soluble incluye sus dos isoformas (esRAGE y cRAGE) cuyas implicaciones fisiopatológicas son bien diferentes, si bien ambas formas comparten la capacidad de unión a los AGEs circulantes. Está claro que la administración del RAGE soluble en condiciones basales va a bloquear la acción de los AGE mitigando sus efectos patológicos¹⁷⁶. Sin embargo, en pacientes con estados de alto estrés oxidativo (como en la insuficiencia cardíaca) los niveles del RAGE soluble se verán aumentados debido a una mayor producción de esRAGE de forma reactiva al aumento de AGEs, y sobre todo, a una mayor proceso de escisión del RAGE tisular por las metaloproteinasas activadas en dichos estados, aumentando la concentración de cRAGE¹⁷⁵. A su vez en la insuficiencia renal los niveles de sRAGE se encuentran elevados por la adición, a los mecanismos anteriormente propuestos, de una reducción de la excreción de dichos productos¹⁷⁴.

1.2.3. IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LOS AGE

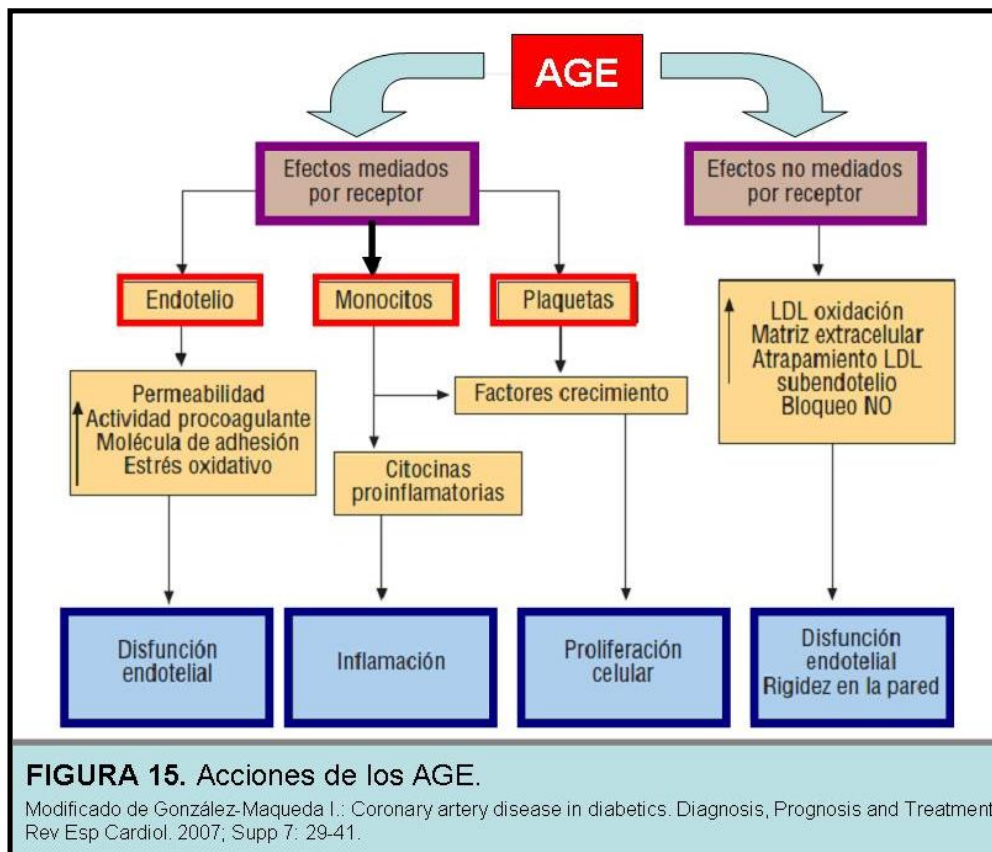
Los AGE llevan a cabo sus acciones de forma directa, alterando las propiedades estructurales y funcionales de las proteínas a las que se unen, y de forma indirecta, mediante la unión a su receptor específico.

Se han identificado bastantes AGEs a nivel plasmático y tisular, teniendo todos ellos en común que sus niveles están significativamente aumentados en los pacientes con enfermedades crónicas en comparación con los individuos sanos¹⁷⁷. Cuando se incrementan los niveles de AGEs, estos inducen una exacerbación de la inflamación, debilitan el sistema inmunitario, alteran los mecanismos de reparación del ADN y, lo que es más importante, producen unas 50 veces más radicales libres que las correspondientes proteínas no glicadas, alterando su estructura y función¹⁷⁸.

La información hasta la fecha actual indica que bajo condiciones normales, la generación de AGEs tiene un papel importante en la modificación de proteínas y remodelación de los tejidos. Los AGEs se forman a una tasa constante, pero lenta en condiciones fisiológicas, iniciándose en el desarrollo embrionario con acumulación progresiva, por lo que se encuentran en exceso durante las etapas de envejecimiento¹⁷⁹. El acúmulo de AGE se puede deber también a un exceso en su producción (hiperglicemia mantenida o estados de alto estrés oxidativo) o a un fallo en su eliminación (caso de la insuficiencia renal). Típicamente se asociaron con la diabetes¹⁸⁰ (en donde las concentraciones de glucosa se mantienen elevadas por tiempos prolongados y, por lo tanto, la producción y acumulación de AGEs ocurre a una tasa mayor) así como con las complicaciones crónicas de esta enfermedad, incluyendo la severidad en las mismas¹⁸¹. Posteriormente se ha visto que están implicados en otras patologías con independencia de la presencia o no de diabetes^{182,183}.

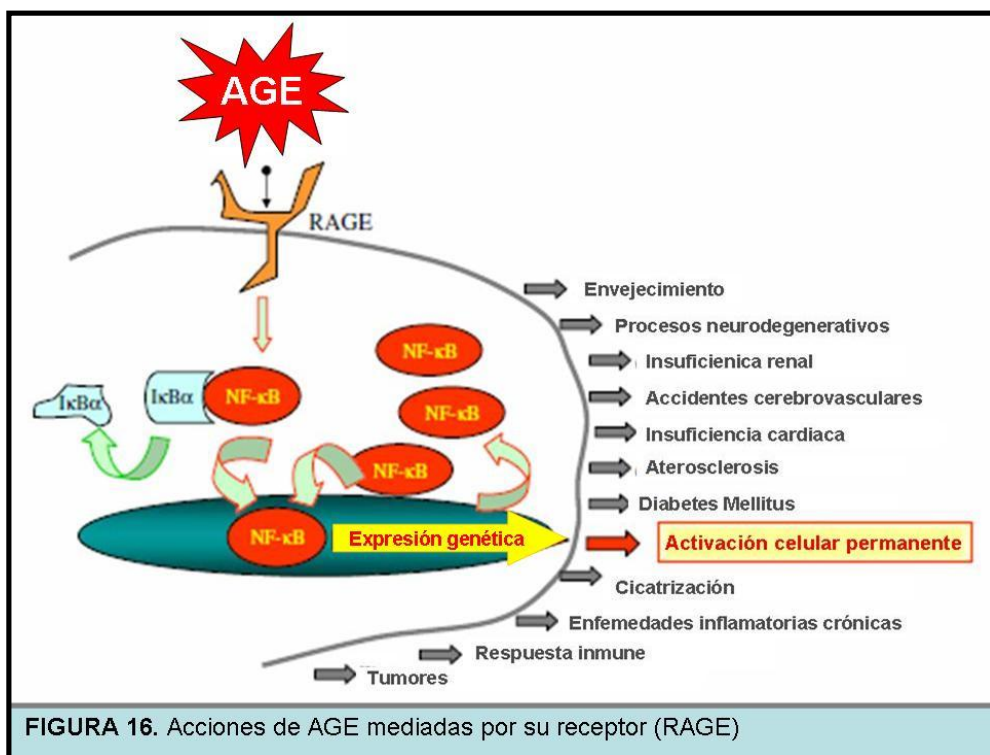
Los efectos provocados por los productos de glicación avanzada (AGE) pueden ser clasificados como dependientes o independientes de su receptor (RAGE). Los efectos provocados por los AGEs por la vía dependiente del receptor se desencadenan por la interacción de los AGE con RAGE (eje AGE-RAGE), activándose segundos mensajeros tales como la proteína cinasa C y la translocación del NF-KB al núcleo, cuyo mecanismo de acción se explico con anterioridad¹³³. En consecuencia, tienen lugar una serie de procesos a nivel celular que se traducen en la activación de una **cascada inflamatoria con repercusiones en diferentes órganos diana**¹³⁴. En cuanto a los efectos de los AGEs independientes del receptor, la clave radica en la formación de

entrecruzamientos intra- e inter-moleculares con diversas proteínas (caso del colágeno)¹⁸⁴, conduciendo a alteraciones estructurales que conllevan una **pérdida de la elasticidad y aumento de la resistencia a la digestión proteolítica**^{185,186}.



Los AGE se localizan en el plasma, a nivel tisular intracelular o a nivel tisular extracelular. Su acumulación ocurre preferentemente en la pared arterial, en nervios periféricos, en el mesangio glomerular y en la membrana basal glomerular y de otros capilares¹⁸⁷. Por el contrario, los productos de Amadori como la hemoglobina glicada, se comportan de manera diferente y no se acumulan indefinidamente, ya que en ellos participan proteínas de menor vida media, con tasas de degradación y eliminación más rápidas⁷⁹. Así pues, el depósito de AGEs ocurre en diversos órganos, entre éstos, cristalino, retina, cerebro, piel, ovario, pene, intestino, pulmón, riñón y corazón¹⁷⁹. Y se asocian con patologías tales como la las cataratas, la retinopatía diabética, las enfermedades

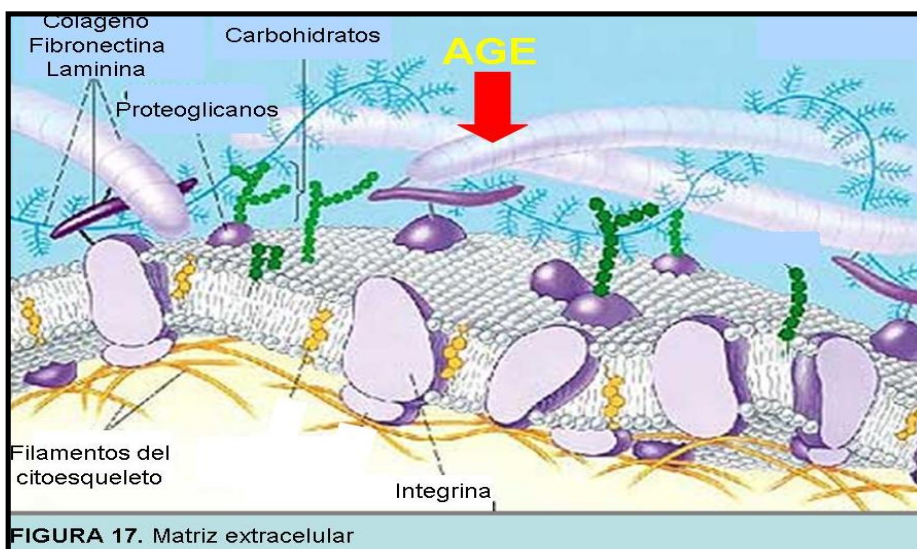
neurodegenerativas, la disfunción eréctil, la insuficiencia renal y la insuficiencia cardíaca, entre otras muchas^{95,97,188-191}.



En relación a las proteínas plasmáticas, se ha observado que la glicación no enzimática de la **antitrombina III** reduce su afinidad por la heparina, disminuyendo de manera significativa la inhibición *in vivo* que ejerce la heparina sobre ésta, defecto que se debe al marcado descenso del contenido de heparán sulfato en los tejidos y que causaría finalmente una disminución de la susceptibilidad de la fibrina a ser degradada por la plasmina^{192,193}; esto justifica el excesivo depósito vascular de fibrina que se ha constatado en la diabetes mellitus, lo cual la convierte en una enfermedad protrombótica¹⁹⁴.

Otras proteínas plasmáticas que pueden sufrir el proceso de glicación-oxidación, son las **lipoproteínas**, favorecido por la presencia en éstas de ácidos grasos poliinsaturados, que se pueden oxidar con facilidad¹⁹⁵. Las lipoproteínas glicadas, oxidadas y glicooxidadas están implicadas en la patogenia de la enfermedad microvascular y macrovascular en la diabetes mellitus, porque son especialmente

aterogénicas, sobre todo, la LDL, la cual ha sido la más estudiada y puede presentar diferentes modificaciones, como un descenso del 25 al 60 % de su contenido de ácido siálico, una disminución de su diámetro y un aumento de su densidad y de su electronegatividad^{196,197}. En el caso particular de las LDL, la glicación interfiere en el reconocimiento de esta por su receptor hepático, lo que disminuye su aclaramiento plasmático y aumenta su permanencia en la sangre, situaciones que favorecen que sea captada por la íntima vascular, desde donde migra luego al espacio subendotelial y allí es ingerida por un macrófago, quien no puede metabolizar en su interior el colesterol y se convierte en una célula espumosa, componente fundamental de la placa de ateroma¹⁹⁸⁻²⁰¹.



En referencia a las proteínas tisulares extracelulares, la **glicación del colágeno** ha sido ampliamente estudiada^{184,185}. Dicha proteína, predominante en la matriz extracelular y componente principal de los tejidos conectivos, como piel, tendones y huesos, es una buena candidata a ser glicada, debido a su larga vida media y a su exposición a la glucosa circulante. De hecho, una de las características del envejecimiento es un incremento de la rigidez y la dureza del colágeno, y esta disminución de la flexibilidad podría, en parte, atribuirse a ligamientos cruzados entre fibras de colágeno mediados por los AGEs²⁰². En los casos en los que se ha medido la presencia de AGE en tejidos ricos en colágeno, como la aorta, la duramadre o la piel, se ha observado una correlación positiva con la edad²⁰³. La

modificación por AGEs del colágeno también podría contribuir en la aterosclerosis, en las nefropatías y en las alteraciones vasculares periféricas²⁰⁴. Así mismo el colágeno modificado por AGEs puede formar ligamientos cruzados con proteínas séricas, como lipoproteínas de baja densidad, albúmina o inmunoglobulinas, contribuyendo a la formación de las placas de ateroma, espesamiento de la membrana basal en tejidos renales y oclusión de los vasos periféricos²⁰⁵.

A nivel del sistema nervioso, se ha precisado que la **mielina** modificada por el proceso de glicación es identificada por determinados macrófagos («carroñeros»), que se unen a receptores específicos de AGE, y entonces la mielina es incorporada al interior de estos macrófagos mediante el proceso de endocitosis, lo que justificaría la presencia de desmielinización segmentaria que se aprecia en los nervios de los individuos diabéticos afectados de neuropatía²⁰⁶. De igual manera, se ha evidenciado que la glicación también puede afectar a otras proteínas que componen el citoesqueleto axonal como, **la tubulina y la actina**; esto condiciona un enlentecimiento de la conducción nerviosa, y la atrofia y degeneración axonal²⁰⁷. Otra proteína que puede sufrir glicación es **la laminina**, lo que provocaría la pérdida de la capacidad de regeneración de las fibras nerviosas en los sujetos diabéticos²⁰⁸. La **enfermedad de Alzheimer** es una de las patologías donde más se ha investigado la influencia de los AGE, en relación con la acumulación progresiva de placas de β -amiloide en el cerebro (característica fundamental de esta enfermedad)¹⁹⁰. En estudios recientes se ha detectado que dichas placas contienen casi tres veces más AGEs que controles de edad similar²⁰⁹. Además se vió que la glicación de β -amiloide soluble produjo agregados de fibrillas amiloides insolubles²¹⁰. Estos y otros estudios sugieren que la glicación podría estar implicada en procesos neurotóxicos.

En cuanto a las proteínas tisulares intracelulares, las **proteínas del cristalino**, las cristalinas, son candidatas a mostrar una acumulación de AGE, ya que se renuevan muy poco y la glucosa entra en las fibras del cristalino independientemente de la insulina, de manera que las alteraciones en estas proteínas reflejan directamente las variaciones plasmáticas de glucosa²¹¹. El aumento con la edad de agregados proteicos y cromóforos fluorescentes sugiere

un importante efecto de la glicación no enzimática. Esta acumulación de agregados contribuye a la opacidad del cristalino y la aparición de cataratas²¹².

A nivel del **ADN** la glicación no enzimática puede tener efectos mutagénicos, ya que compromete de forma permanente la integridad del genoma y puede alterar las funciones celulares, pudiendo inducir la muerte celular en casos extremos, al activar la respuesta al daño del ADN^{213,214}. Los tipos de mutaciones que se han observado en ADN modificado por AGEs incluyen no sólo sustituciones de bases, sino también deleciones e inserciones, lo que sugiere que las modificaciones por AGEs inducen mecanismos complejos de reparación del ADN²¹⁵.

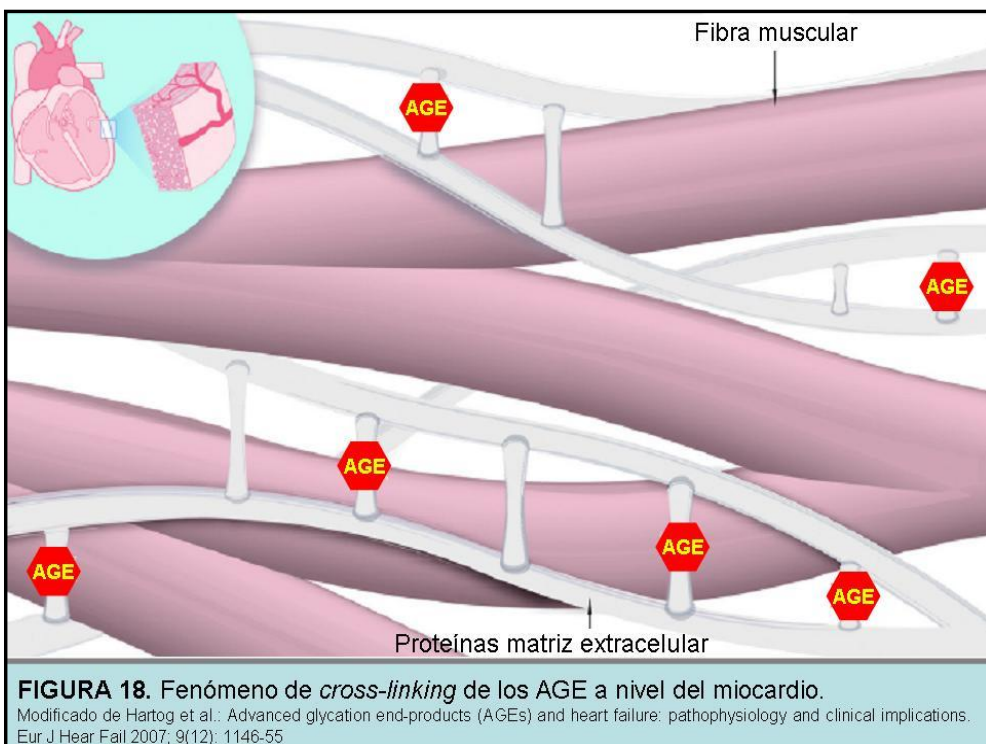
1.3. GLICACIÓN AVANZADA E INSUFICIENCIA CARDIACA

Diabetes e IC, dos verdaderas plagas de la civilización occidental, amenazan con convertirse en epidemias en los próximos años²¹⁶. Ambas guardan íntima asociación. De hecho, sabemos que por cada incremento del 1% en la hemoglobina glicada la incidencia de IC puede aumentar del 8% al 16%^{217,218}. En los ensayos aleatorizados que exploraron el efecto de diversos fármacos en la IC, la prevalencia de diabetes ha variado del 11% en el estudio CIBIS II²¹⁹ a casi el 40% en el estudio americano del grupo MOCHA²²⁰. Y en diferentes registros de hospitalización por IC, del 25% al 45% de los pacientes incluidos eran diabéticos^{221,222}. Existe entonces una fuerte relación entre la diabetes e IC.

Como ya sabemos, la diabetes es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de IC y así lo reveló el estudio de Framingham, en el que la presencia de diabetes aumentó dos veces y media el riesgo de desarrollar IC en los hombres y cinco veces en las mujeres²²³. Pero, además, los pacientes con IC, si son diabéticos, tienen peor evolución y en numerosas series la diabetes es en ellos un predictor independiente de mal pronóstico²²⁴⁻²²⁶. Este apartado intenta definir el porqué de esta asociación, revisando una de sus razones fisiopatológicas, que no es otra que la de la glicación avanzada, cuya existencia

no se reserva únicamente a la patología diabética, como se ha visto con anterioridad.

Los AGEs se unen a las proteínas tisulares alterando su estructura y función. Esto, a nivel del miocardio y de su intersticio, se traduce en una disminución de su distensibilidad que acaba condicionando la afectación de su contractilidad. Así mismo, y mediante la unión a su receptor (RAGE), se activan una serie de cascadas de señalización intracelular que condicionan la producción de citoquinas proinflamatorias y radicales libres, moléculas que juegan un papel central en la patogénesis de las complicaciones cardiovasculares⁹⁵. Por tanto, ya sea de forma directa por alteración proteica o de forma indirecta mediada por sus receptores, los AGEs se han involucrado en los últimos años en la fisiopatología de la IC.



Como se resume en el siguiente esquema, el eje AGE-RAGE conduce a la producción de IC mediante la génesis de disfunción sistólica, disfunción diastólica y disfunción vascular. Estos van a ser los tres aspectos que se van a tratar a continuación.

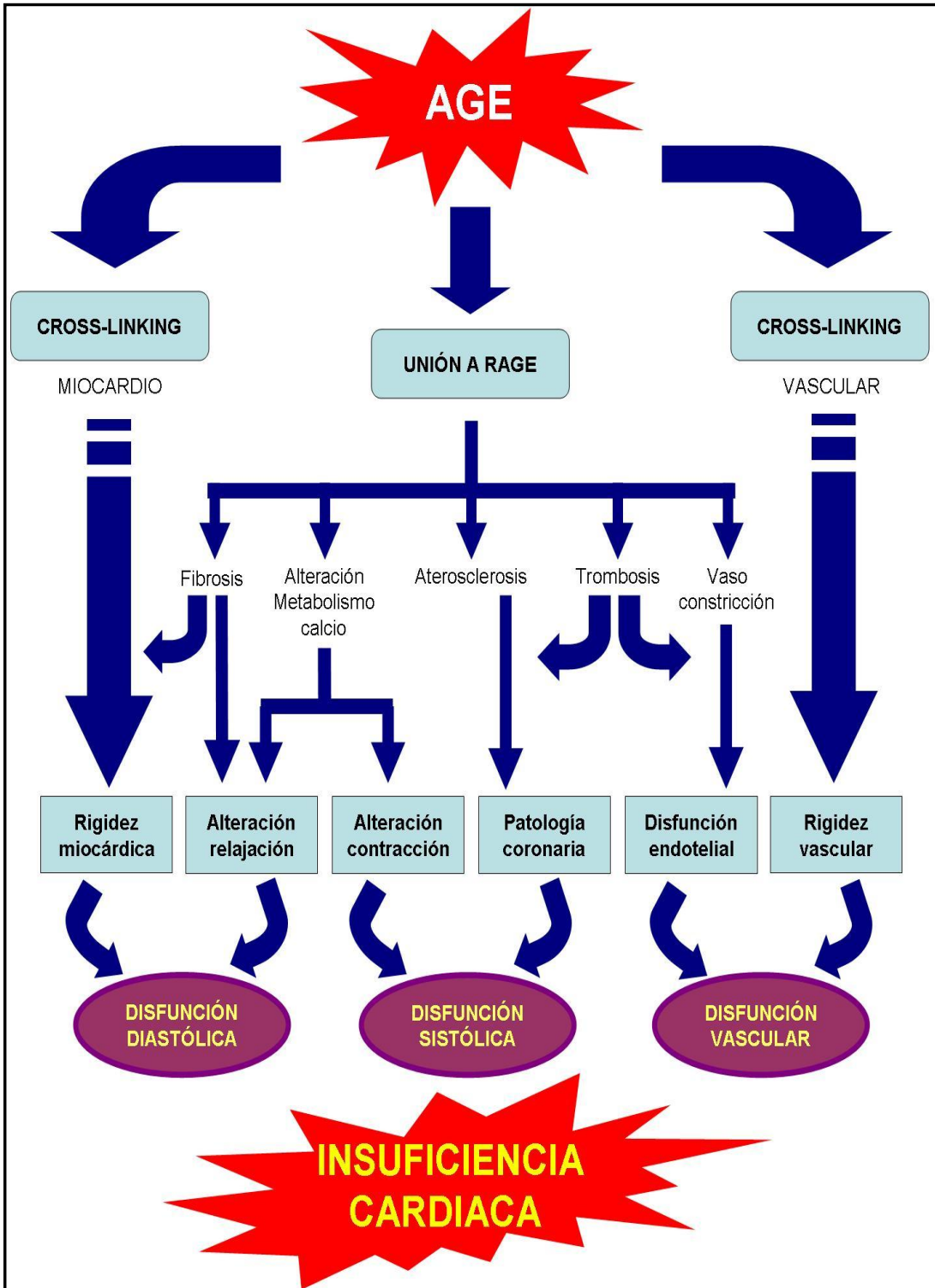


FIGURA 19. Implicaciones fisiopatológicas de los productos de glicación avanzada en la insuficiencia cardiaca.
Modificado de Hartog et al.: Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications. Eur J Hear Fail 2007; 9(12): 1146-55.

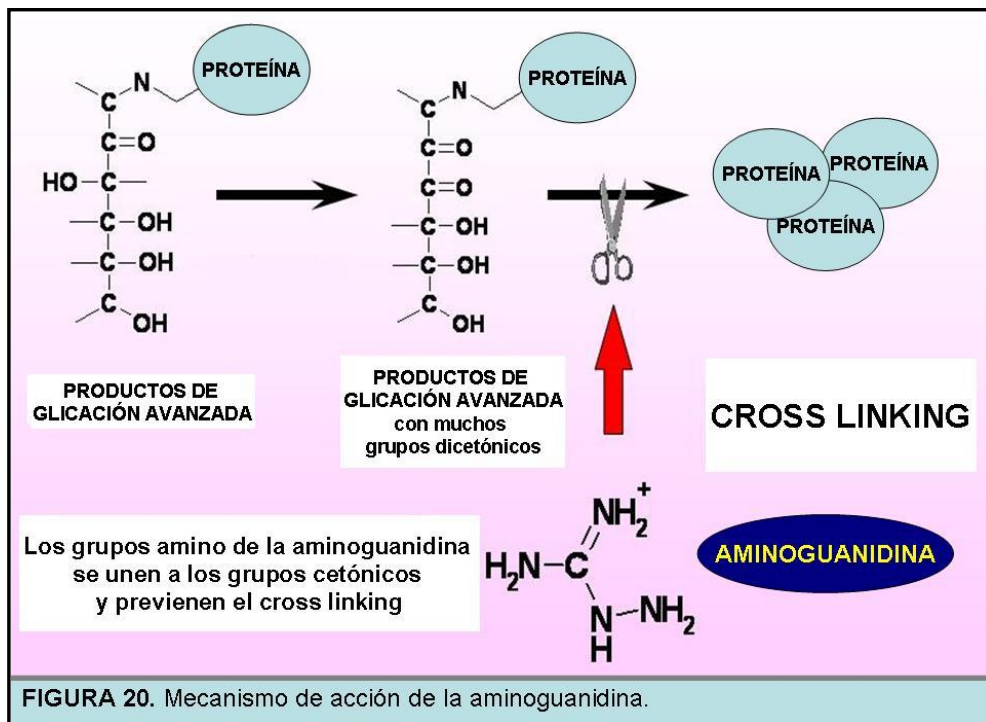
1.3.1. DISFUNCIÓN DIASTÓLICA

Los AGE alteran la función diastólica mediante cross-linking con las proteínas de la matriz extracelular y mediante la unión a RAGE, activando los procesos de fibrosis y alterando el metabolismo del calcio.

El entrecruzamiento de proteínas de matriz extracelular es esencialmente un fenómeno fisiológico. Fortalece los tejidos asegurando su integridad, sin comprometer la flexibilidad. Los AGEs son capaces de establecer enlaces cruzados con proteínas de la matriz como el colágeno, la laminina y la elastina²²⁷. El exceso de esas uniones **altera la flexibilidad de las proteínas de la matriz**, con un consecuente aumento de la rigidez miocárdica que de forma mantenida puede inducir disfunción diastólica. Otra vía por la que los AGEs pueden contribuir al desarrollo de disfunción diastólica es a través de la activación de los receptores²²⁸. Uno de los efectos mediados por RAGE es el de la **inducción de la fibrosis** a través de la regulación positiva (al alza) del factor transformador de crecimiento β (TGF- β)²²⁹. Este aumento de la fibrosis miocárdica podría ser el sustrato arrítmico sobre el que se sostiene la mayor frecuencia de fibrilación auricular en pacientes con IC. La activación del eje AGE-RAGE también parece influir en el **metabolismo del calcio** en los miocitos cardíacos. Petrova y colaboradores han creado ratones transgénicos que sobreexpresan RAGE en los cardiomiocitos y han analizado las corrientes de calcio en respuesta a la exposición a AGEs²³⁰. Mediante esto descubrieron que la sobreexpresión de RAGE reducía la concentración intracelular de calcio intracelular tanto en sístole como en diástole. Así mismo vieron que la exposición a AGE causaba un retraso importante en la reincorporación de calcio. Como consecuencia, la duración de la repolarización aumentaba, causando secundariamente disfunción diastólica.

Norton y colaboradores fueron los primeros en examinar el papel de los AGE en el desarrollo de la disfunción diastólica en un modelo animal²³¹. En su experimento, la inducción de la diabetes en ratas llevó a la disminución de la distensibilidad del ventrículo izquierdo medida por cateterismo cardíaco. Schafer y colaboradores, años después, consolidaron dicha idea mostrando una correlación directa positiva entre la función diastólica y los niveles de carboximetil-lisina (CML), un conocido

tipo de AGE, en un experimento llevado a cabo también en ratas²³². Algunos años antes, Berg y colaboradores, ya habían obtenido resultados similares en pacientes con diabetes mellitus tipo 1²³³.



Así mismo se comprobó que la **aminoguanidina**, un inhibidor de la formación de AGE, mejoraba la distensibilidad miocárdica y, en consecuencia, la función diastólica, en ratas. El tratamiento con aminoguanidina se acompañó de una disminución del colágeno miocárdico medido por fluorescencia. Avedano y colaboradores confirmarían posteriormente estos hallazgos (también en ratas), observando además de un efecto positivo de un IECA (enalapril) sobre la función diastólica y la acumulación de AGEs²³⁴. Hasta la fecha no hay estudios publicados sobre el papel de la aminoguanidina en la función diastólica en humanos. Se intentó desarrollar un ensayo clínico pero no pudo ponerse en marcha debido a problemas de seguridad con respecto a la toxicidad de la aminoguanidina, que inhibe la producción de óxido nítrico (NO)²³⁵. Una alternativa bien conocida a la aminoguanidina es el **alagebrium** (ALT-711), un destructor de los AGE ("AGE-breaker"). Usando ALT-711, Asif y colaboradores estudiaron el efecto de la reducción de AGEs en la rigidez de la pared miocárdica del ventrículo

izquierdo, medida mediante cateterismo cardíaco, utilizando para ello perros de edad avanzada²³⁶. Tras 4 semanas de tratamiento observaron ya una reducción significativa de la rigidez con mejoría de la distensibilidad miocárdica. Estos hallazgos fueron confirmados por Vaitkevicius y colaboradores en un experimento similar²³⁷. El efecto del ALT-711 en la disfunción diastólica también se ha estudiado en seres humanos. En el ensayo **DIAMOND**, Little y colaboradores trataron a 23 pacientes estables con insuficiencia cardíaca diastólica con ALT-711²³⁸. Después de 16 semanas, la masa ventricular izquierda (medida por resonancia magnética) se había reducido y la función diastólica (medida por Doppler tisular) había mejorado. Además, el fármaco fue bien tolerado y tuvo un efecto positivo en la calidad de vida de los pacientes. Un nuevo ensayo clínico (**PEDESTAL** trial) pretende investigar los efectos de la ALT-711 en pacientes con IC y función sistólica conservada (FEVI >45%)²³⁹.

1.3.2. DISFUNCIÓN SISTÓLICA

Los dos principales mecanismos por los que los AGE alteran la capacidad contráctil del corazón son la alteración del metabolismo del calcio y la afectación miocárdica secundaria a aterosclerosis.

Entre los diferentes mecanismos por los que los AGEs pueden inducir disfunción sistólica, destaca, por la repercusión clínica que tiene, el de la aceleración de la progresión de la enfermedad arterial coronaria. **La interacción AGE-RAGE puede inducir aterosclerosis, trombosis y vasoconstricción**¹⁹⁸⁻²⁰⁰. Por la influencia negativa sobre el metabolismo de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), los AGE aumentan el riesgo de desarrollar aterosclerosis y consecuentemente infarto de miocardio²⁴⁰. Así son capaces de formar enlaces cruzados con las partículas de colesterol-LDL, formando moléculas más aterogénicas y con menos afinidad por el receptor de LDL celular, con lo que se disminuye su degradación y eliminación²⁴¹. Además, el LDL modificado por AGE es más afín a los receptores de los macrófagos, creando células espumosas^{197,242}. Por otra parte, el uso de los “AGE-breakers” y de los inhibidores

de la formación de AGEs en modelos animales diabéticos revierte la aterosclerosis²⁴³. Sin embargo, ninguno de estos estudios pudo probarse en seres humanos. Además, la reducción de los niveles de calcio intracelular inducida por los AGEs, mencionada anteriormente, puede inducir disfunción sistólica debido a disminución de la contractilidad del miocardio²³⁰.

La mayoría de los datos obtenidos sobre el papel de los AGEs en la disfunción sistólica surge de los estudios sobre su papel en la disfunción diastólica. En los estudios donde la función sistólica ventricular izquierda estaba conservada, el tratamiento con fármacos reductores del nivel de AGEs no tuvo efecto sobre la función sistólica^{234,238,239}. Sin embargo la terapia reductora de AGEs parece mejorar la función sistólica en animales con disfunción contráctil²⁴⁴. Liu y colaboradores examinaron los efectos de la ALT-711 en los cambios hemodinámicos que ocurren con la edad en perros diabéticos que habían desarrollado marcada disfunción ventricular sistólica y rigidez aórtica²⁴⁵. La terapia con ALT-711 ayudaba a la recuperación de la función sistólica ventricular izquierda y reducía la rigidez de la aorta así como la masa del ventrículo izquierdo. Previamente, Vaitkeyicius y colaboradores describieron un efecto similar del ALT-711 en monos de edad avanzada con reducción de la función sistólica ventricular. Cheng y colaboradores investigaron el efecto de un nuevo “AGE-breaker”, denominado C16, así como del ALT-711, en la disfunción cardíaca sistólica inducida por la diabetes en ratas²⁴⁶. Tras cuatro semanas de tratamiento tanto con C16 como con ALT-711, se producía un aumento significativo del gasto cardíaco, con reducción de la resistencia periférica sistémica secundaria a un aumento de la distensibilidad arterial.

Heidland y colaboradores fueron los primeros en medir los niveles de AGEs en plasma en pacientes con insuficiencia cardíaca sistólica sometidos a trasplante cardíaco²⁴⁷. Al contrario de lo esperado, los autores descubrieron menores niveles de plasma de la CML y de AGEs fluorescentes en comparación con los controles. Se presentaron como posibles sesgos la hipervolemia, menor concentración de proteínas plasmáticas y la disminución de la ingesta diaria de AGEs en los pacientes con insuficiencia cardíaca transplantados. Años después Hartog y colaboradores demostraron que los niveles plasmáticos de CML se correlacionan

con los de NTpro-BNP y con la clase funcional NYHA (New York Heart Association), resultando además un predictor pronóstico en pacientes con IC sistólica²⁴⁸. Un estudio parecido fue desarrollado por el grupo de Koyama, analizando el valor pronóstico de los niveles séricos de AGEs en pacientes con IC crónica, encontrando que la pentosidina resultaba un predictor significativo de muerte cardíaca y rehospitalización por IC, independiente de otros factores de riesgo conocidos en la ICC, como el NTpro-BNP, la función renal, la edad y la clase funcional NYHA²⁴⁹.

En cuanto a la influencia de los tratamientos reductores de AGE en la disfunción sistólica en humanos, los datos se limitan a los resultados del estudio PEDESTAL, como se indicó anteriormente, en donde se observó una tendencia hacia la mejoría de la función sistólica del ventrículo izquierdo medida por ecocardiografía²³⁹.

1.3.2. DISFUNCIÓN VASCULAR

Los AGE alteran de forma directa la distensibilidad de la pared vascular. Esto, unido a la alteración de la función endotelial que producen mediada por RAGE, se traduce en una disfunción vascular

Los AGEs son capaces de alterar la función vascular, influyendo tanto en la **función endotelial** como en la **distensibilidad vascular**. Los AGEs pueden inducir la disfunción endotelial mediante la reducción de la disponibilidad de óxido nítrico (NO), un importante vasodilatador²⁵⁰. Además, los AGE pueden aumentar la producción de endotelina-1, un potente vasoconstrictor²⁵¹. Por otro lado la elasticidad vascular se ve influenciada por el cross-linking de los AGE de una manera similar a como ocurre en la matriz extracelular del miocardio²⁵².

Estudios tanto en humanos como en animales han demostrado la asociación entre alteraciones arteriales y AGEs. Se ha descrito que la pared arterial durante la vejez tiene un perfil proinflamatorio con elevación de proteínas de la matriz extracelular y aumento de quimiocinas como la proteína quimiotáctica para

monocitos-1 (MCP-1)²⁵³. El aumento de estas proteínas puede conducir a la enfermedad cardiovascular. Tanto RAGE como sus ligandos pueden contribuir a este proceso²⁵⁴. HMGB1, además de interactuar con RAGE para inducir un proceso proinflamatorio, tiene actividad quimiotáctica facilitando el paso de leucocitos a los tejidos²⁵⁵. Es probable que la activación de RAGE, además de inducir inflamación, intervenga en la remodelación de los tejidos, eventos que pueden inducir proliferación anormal de células vasculares y formación de placas ateroscleróticas con el consecuente aumento del grosor de las arterias y la enfermedad arterial²⁵⁶. Por otro lado, los AGE pueden adherirse a la matriz extracelular, y ser estos puntos lugares de interacción con las células que expresan RAGE, lo que llevaría a la alteración de la integridad estructural de la pared vascular y de la membrana basal²⁵⁷. Existen varios hallazgos experimentales que relacionan la expresión de RAGE con eventos inflamatorios pro-ateroscleróticos. En ratones diabéticos, deficientes en apolipoproteína E, la activación del RAGE media la inflamación vascular aumentando la expresión de la molécula de adhesión vascular celular-1 (VCAM-1) y de factores tisulares¹⁷⁰. Además, en estos ratones, el bloqueo de RAGE estabiliza la placa aterosclerótica¹⁷¹.

Por otro lado, además de la señalización mediada por RAGE, la capacidad de este receptor de interactuar con las moléculas de adhesión, facilita el infiltrado de leucocitos al tejido vascular y el consecuente daño y remodelación^{156,157}. La activación del RAGE puede estar conectada a otras señalizaciones que pueden influir en la inflamación vascular¹⁵⁸. A este respecto, tanto el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) puede aumentar la expresión del RAGE en la célula endotelial humana, probablemente activando al NF- κ B²⁵⁸. Los AGEs también pueden inducir la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), induciendo eventos de señalización adicionales inductores de angiogénesis *in vivo*²⁵⁹.

En los seres humanos, se ha visto que los niveles de AGEs circulantes se correlacionan con distensibilidad arterial. Recientemente se ha demostrado que la utilización de **Alagebrium** mejora la función endotelial en pacientes con hipertensión sistólica, efecto que está relacionado a una disminución de marcadores de inflamación²⁶⁰.

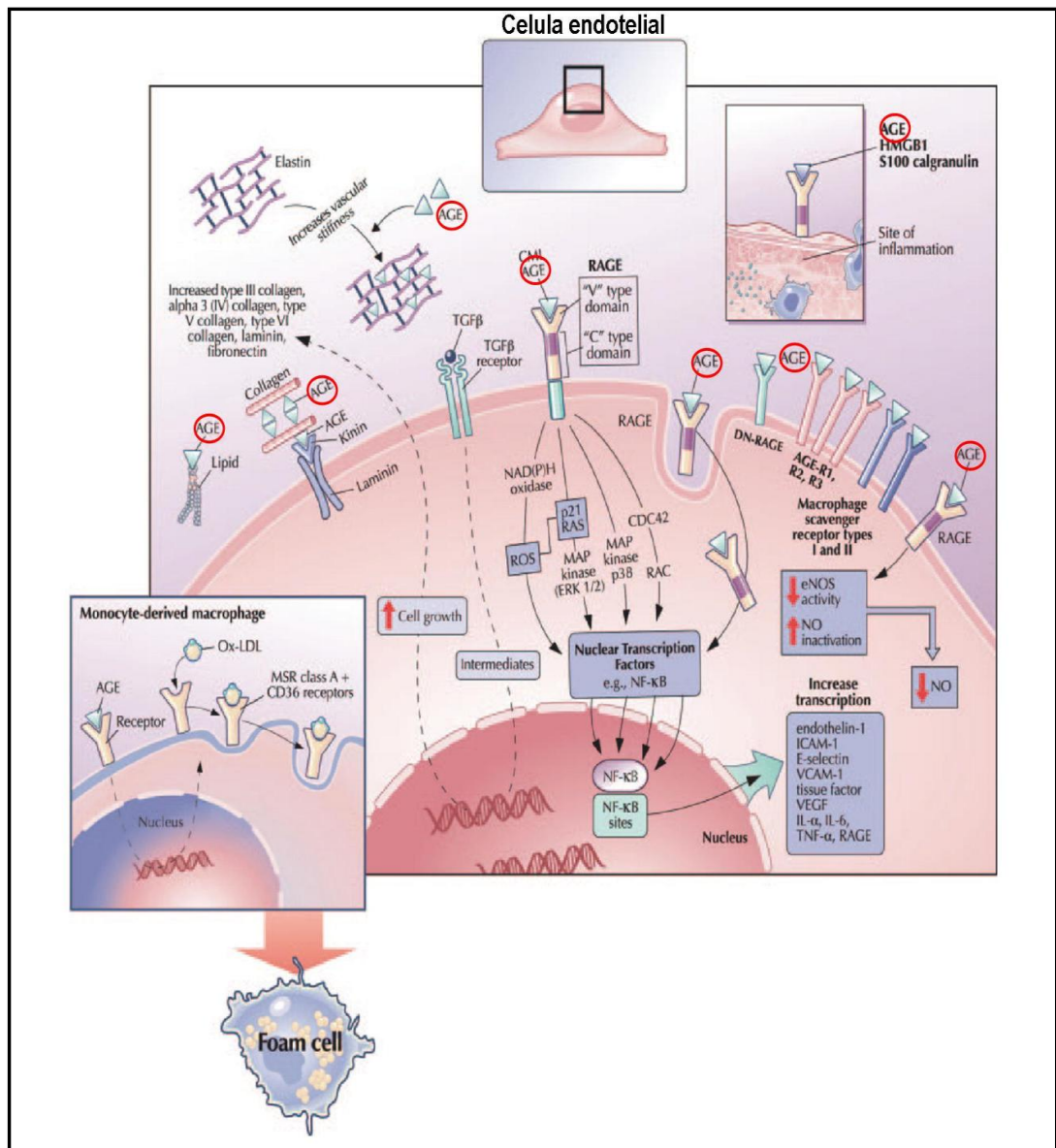


FIGURA 21. Efectos intra y extracelulares de los AGE a nivel del endotelio vascular.

• A nivel de la matriz extracelular, AGE se une al colágeno, elastina, laminina, vitronectina y a los lípidos, disminuyendo la elasticidad de la misma. Los AGE también potencian la unión del factor de crecimiento transformante β (TGF β) a su receptor, estimulando la producción de colágeno. Mediante la unión a RAGE, los AGE activan una cascada de señalización intracelular que confluye en la producción del factor de necrosis tumoral α (TNF-α). Este pasa al núcleo celular en donde aumenta la transcripción de diferentes proteínas, como la endotelina 1, el ICAM-1, la selectina-E y el factor tisular. Además los AGE pueden disminuir la disponibilidad del óxido nítrico (NO) al disminuir la actividad de la NO sintetasa (NOS).

Modificado de Goldin A.: Advanced Glycation End Products : Sparking the Development of Diabetic. Circulation 2006, 114:597-605.

HIPÓTESIS y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

- Los productos finales de glicación (AGE) están implicados en la fisiopatología y pronóstico de la insuficiencia cardíaca (IC), con independencia de la presencia de diabetes mellitus.
- Los niveles del receptor soluble de AGE (sRAGE) son indicativos del nivel de actividad del eje AGE-RAGE y pueden tener valor pronóstico en pacientes con IC.
- AGE y sRAGE son un marcador de afectación coronaria en pacientes con IC, asociándose con la extensión de la misma.
- El incremento de los niveles de AGE y sRAGE supone una mayor predisposición a eventos arrítmicos en la IC.
- En pacientes con IC, AGE y sRAGE son marcadores indirectos de función renal.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la asociación del eje AGE-RAGE con la progresión de la IC y con el pronóstico de este síndrome, tratando de aclarar cuales pueden ser los mecanismos fisiopatológicos implicados.

2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar el valor pronóstico tanto de los AGE como del sRAGE en una cohorte de pacientes con IC crónica y contrastarlo con otros sistemas validados de estratificación de riesgo.
- Comparar la información obtenida con el eje AGE-RAGE a la proveniente de otros biomarcadores, tales como el NT-proBNP o la cistatina C.
- Analizar el grado de asociación entre los AGEs y el sRAGE con el grado de afectación coronaria en pacientes con IC.
- Valorar la relación existente entre los trastornos de ritmo cardíaco y el eje AGE-RAGE en pacientes con IC, valorando la interacción de posibles factores confusores.
- Medir la asociación de los AGE y del sRAGE con la función renal en pacientes con IC crónica y compararlos con otros biomarcadores.

MATERIAL y MÉTODOS

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un **estudio prospectivo y unicéntrico** que tenía como objetivo valorar las implicaciones fisiopatológicas, clínicas y pronósticas de los productos de glicación avanzada y su receptor soluble en una cohorte de pacientes con IC crónica.

Fue designado con el acrónimo **RAICCRO** (“RAGE y AGE en la Insuficiencia Cardíaca Crónica”).

Todo el estudio fue llevado a cabo bajo los estándares éticos propuestos en la Declaración de Helsinki y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia.

3.2. POBLACIÓN A ESTUDIO

El estudio englobó de forma consecutiva a todos los **pacientes con IC crónica** (documentada mediante un ingreso previo por IC en el último año) seguidos en la consulta externa de cardiología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (consulta de IC, Dres. Alfonso Varela e Inés Gómez)

Se incluyeron todos aquellos pacientes, desde Julio de 2008 a Abril de 2009, que habían satisfecho los criterios de inclusión/exclusión y que de forma voluntaria habían decidido participar en el estudio tras firmar el consentimiento informado.

3.2.1 CALCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL.

Utilizando los datos previos del pronóstico de los pacientes con IC crónica en nuestra área poblacional, en donde las tasas descritas de mortalidad y re-hospitalización fueron del 8 y 29% en una mediana de seguimiento de 6 meses, hemos fijado como porcentaje de eventos combinados (muerte más reingreso) al año un 30%. En base a esta cifra, con un intervalo de confianza oscilando entre el 90 y el 95% y una potencia estadística del 80%, para poder valorar un riesgo

relativo de 1,5 (aumento del 50% de los eventos, lo que supone un incremento del porcentaje de eventos del 12.5%) en los pacientes con actividad del eje AGE/RAGE elevada, hemos obtenido que serían necesarios entre 93 y 158 pacientes (aplicación GraphPad Statmate 2). Si nos limitamos a los resultados de los 2 únicos estudios publicados hasta la fecha en donde se analiza el valor pronóstico de un AGE en IC crónica, con cifras de Hazard Ratio de 1,8 para la pentosidina y de 1,7 para la carboximetil-lisina, y el estudio de Koyama y colaboradores para sRAGE, en donde la Hazard Ratio fue de 1,9, entonces el número de pacientes necesarios para encontrar diferencias significativas estaría comprendido entre 90 y 100 pacientes, con un 90% de potencia y un error α de 0.05.

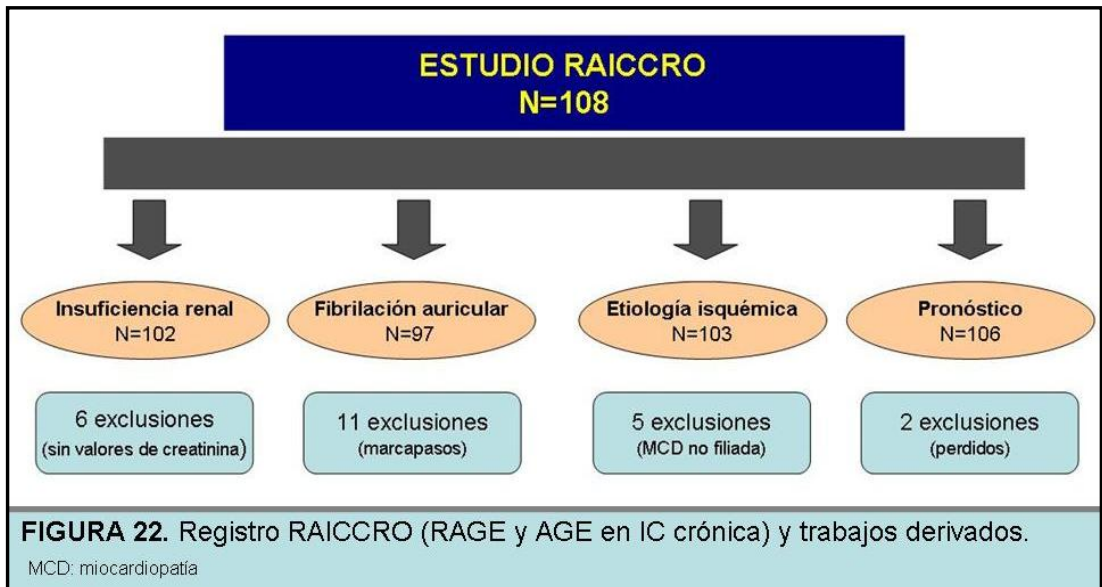
3.2.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Varón o mujer con edad ≥ 18 años.
- Pacientes con IC crónica que cumplan los criterios propuestos por la Sociedad Europea de Cardiología (signos y/o síntomas de IC más evidencia de alteración estructural y/o funcional cardiovascular), que como mínimo hayan presentado un ingreso por IC en los últimos 12 meses antes del momento de inclusión.
- Estabilidad clínica y hemodinámica en el momento de ser introducidos en el estudio y al menos en las 4 últimas semanas, con seguimiento ambulatorio.
- Consentimiento informado.

3.2.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

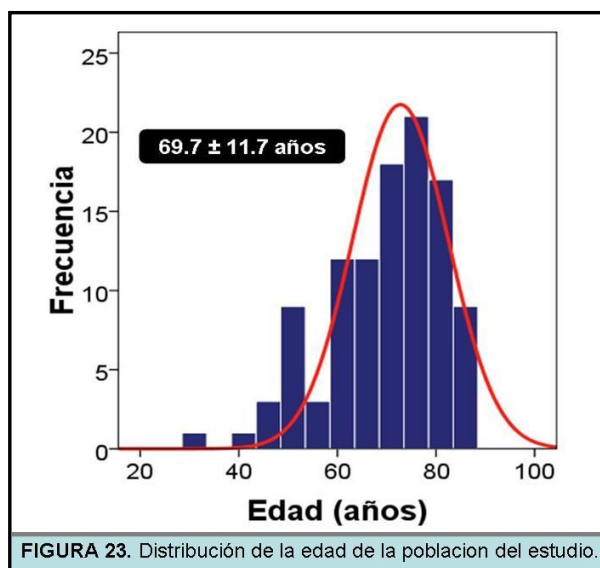
- Mujer embarazada.
- Pacientes en programa de diálisis.
- Procesos tumorales conocidos en el momento de la inclusión en el estudio.
- Enfermedad sistémica grave que limite su esperanza de vida a menos de 1 año.
- Enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias crónicas.
- Tratamiento con corticoides o antiinflamatorios en las 4 últimas semanas.
- Proceso infeccioso en el último mes.

- Ingreso hospitalario (de índole quirúrgico y/o médico) en las 4 últimas semanas).



3.2.4 CARACTERÍSTICAS BASALES.

Edad. La mediana fue de 72,0 años (rango intercuartílico [RIQ]: 62,7-78,2 años). El valor mínimo fue de 31 años y el máximo de 88 años.



Sexo. Del total de la muestra, 36 pacientes eran mujeres (33.3%).

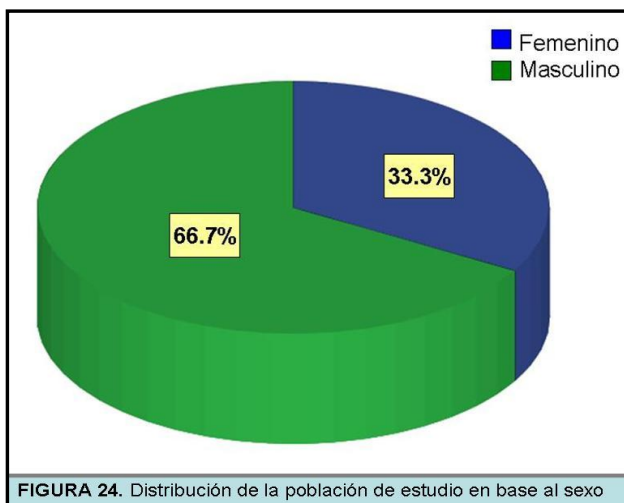


FIGURA 24. Distribución de la población de estudio en base al sexo

Datos paramétricos. El peso medio de los pacientes fue de $74,9 \pm 13,6$ Kg, con una talla media de $162,4 \pm 7,8$ cm. Se carecía de la información de peso y talla de 34 (31,5%) y 52 (48,1%) pacientes, respectivamente. El valor medio del perímetro de la cintura fue de $110,2 \pm 11,4$ cm. No se disponía de la información de tal parámetro en 18 pacientes (16,6%). La mediana del índice de masa corporal (IMC) fue de 28,2 (RIQ: 25,5-30,8) kg/m^2 . En base a la clasificación de la OMS, solo un 17,2% de los pacientes presentaban un peso dentro de los límites normales, con un porcentaje válido de obesidad (definida como $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) del 35,9%. En cuanto a la obesidad abdominal, basándonos en la presencia de un perímetro de cintura abdominal > 88 cm en mujeres y > 102 cm en varones, se encontró en el 52,2 % de nuestra población de estudio.

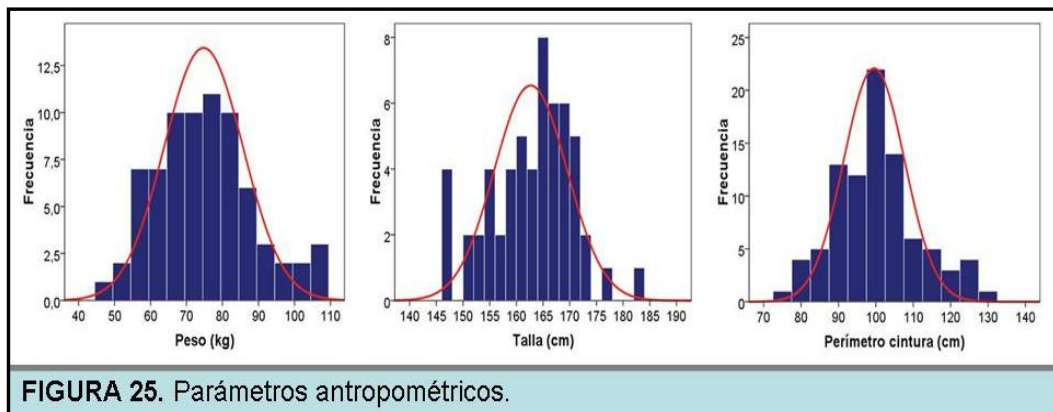
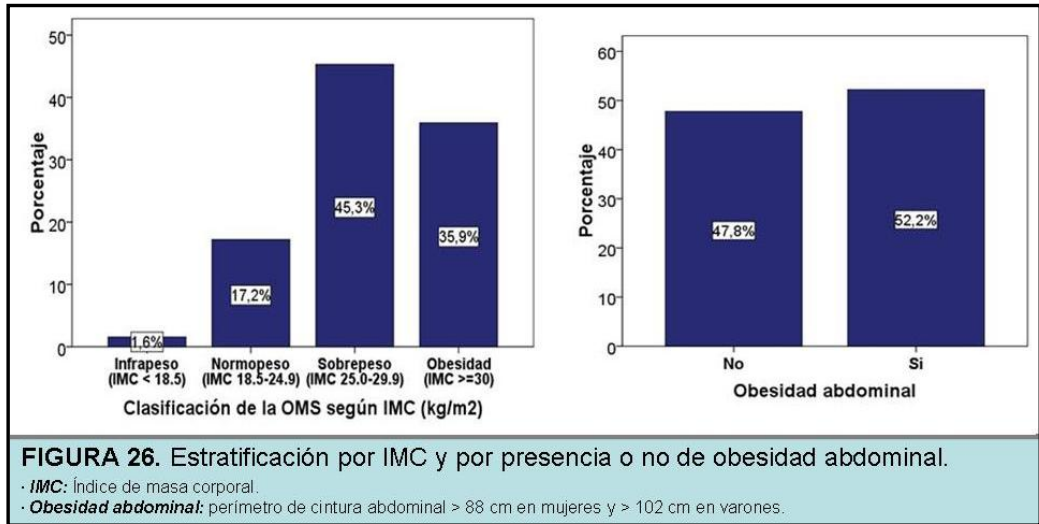
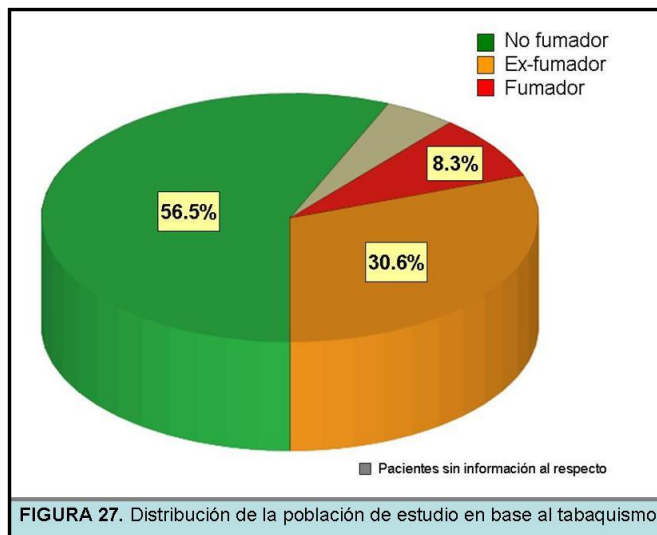


FIGURA 25. Parámetros antropométricos.



Tabaquismo. En referencia al hábito tabáquico, carecíamos de información en 5 pacientes (4,6%). Del resto, 61 no fumaban (56,5%), 33 lo habían hecho con anterioridad (30,6% de exfumadores, considerando como tal el abandono del tabaco por lo menos hace más de 6 meses) y 9 seguían fumando (8,3% de fumadores activos).



Factores de riesgo cardiovascular. En referencia a la hipertensión arterial (HTA) y a la dislipemia (DLP), no disponíamos de la información correspondiente a 4 (3,7%) y 5 (4,6%) pacientes, respectivamente. Del total de los pacientes con

información disponible, el porcentaje válido de HTA fue del 56,7% (59 pacientes) y de DLP del 51,5% (53 pacientes). La cifra media de tensión arterial sistólica fue de $127,2 \pm 21,5$ mmHg y de tensión arterial diastólica $77,9 \pm 12,9$ mmHg. El colesterol total medio fue de $180,4 \pm 43,9$ mg/dL, con cifras medias de colesterol-LDL de $110,4 \pm 35,0$ mg/dL y de colesterol-HDL de $42,9 \pm 18,1$ mg/dL. La media de triglicéridos plasmáticos fue de $114,6 \pm 60,4$ mg/dL.

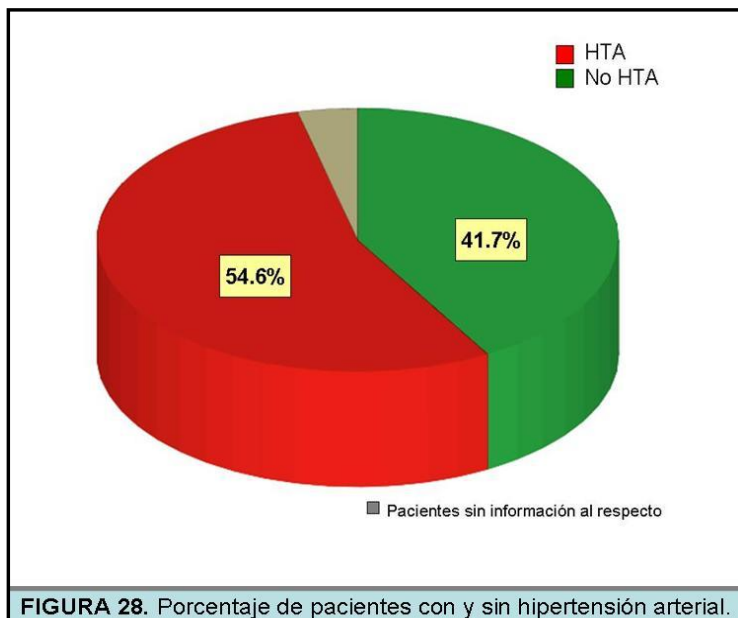


FIGURA 28. Porcentaje de pacientes con y sin hipertensión arterial.

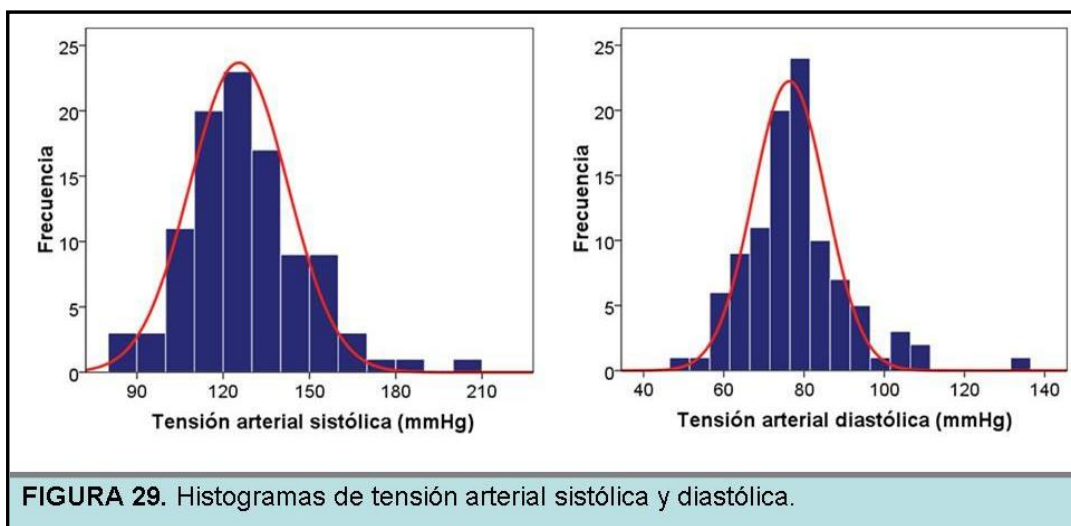
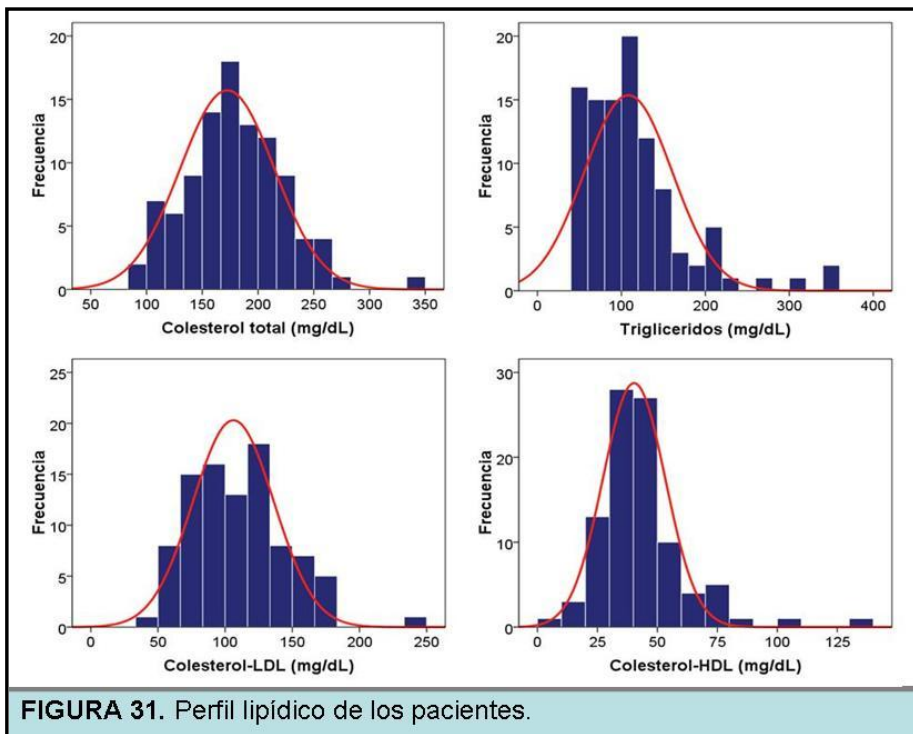
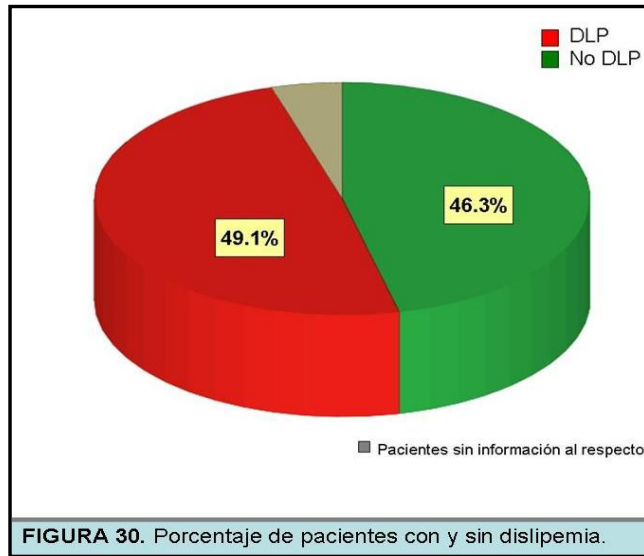


FIGURA 29. Histogramas de tensión arterial sistólica y diastólica.



Diabetes y control glucémico. 37 pacientes eran diabéticos (35,2%), de acuerdo con los nuevos criterios de la *American Diabetes Association*. Los niveles plasmáticos medios de glucosa fueron de $121,2 \pm 43,1$ mg/dL y de fructosamina de $265,3 \pm 87,6$ mg/dL. Se midieron 2 productos de glicación precoces en plasma:

la hemoglobina glicada (HbA1c) y la albúmina glicada. La HbA1c media en nuestra muestra fue de 6,5% (desviación estándar: 1,4%) y la albúmina glicada media de 21,4 µg/mL (desviación estándar: 12,3 µg/mL).

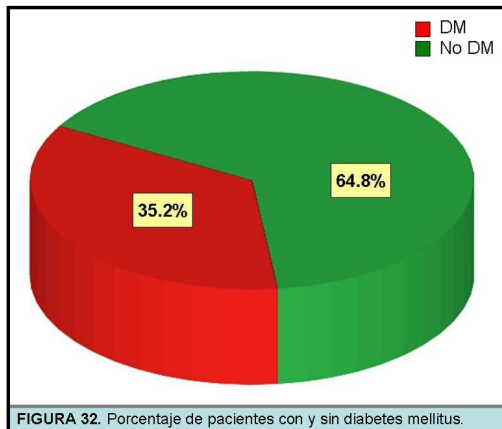


FIGURA 32. Porcentaje de pacientes con y sin diabetes mellitus.

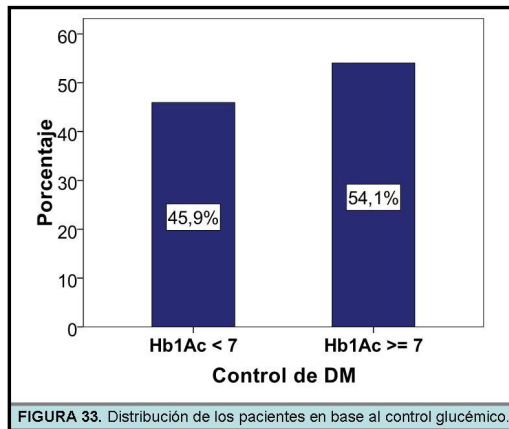


FIGURA 33. Distribución de los pacientes en base al control glucémico.

En cuanto a los valores perdidos, faltaban los datos referentes a la glucosa en 6 pacientes (5,5%), a la fructosamina en 64 pacientes (59,2%), a la HbA1c en 51 pacientes (47,2%) y a la albúmina glicada en 7 pacientes (6,5%). De los 37 pacientes diabeticos, 17 tenían un control glucémico adecuado, definido por niveles de HbA1c < 7%.

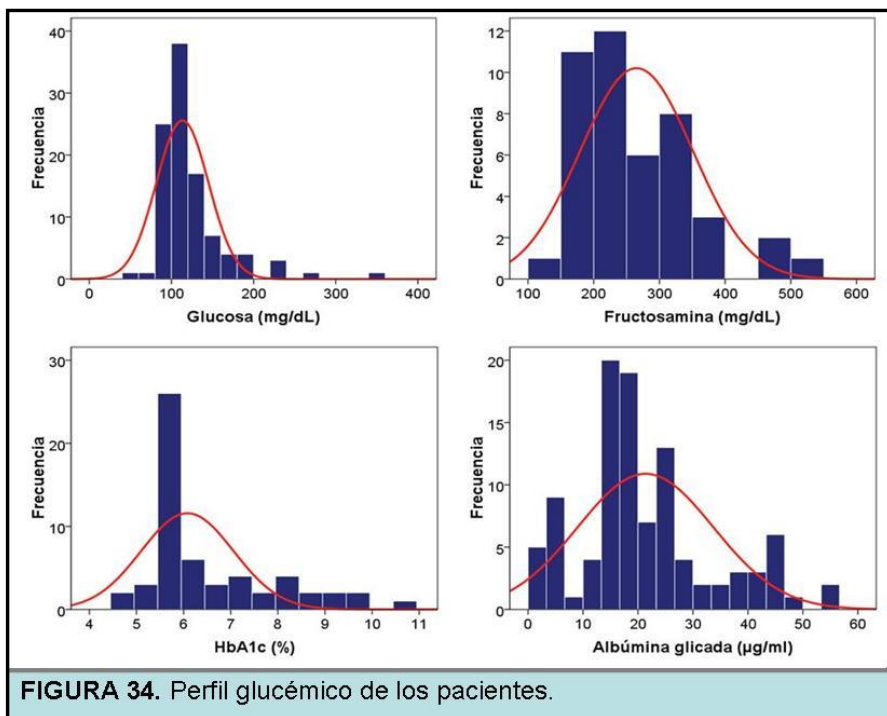
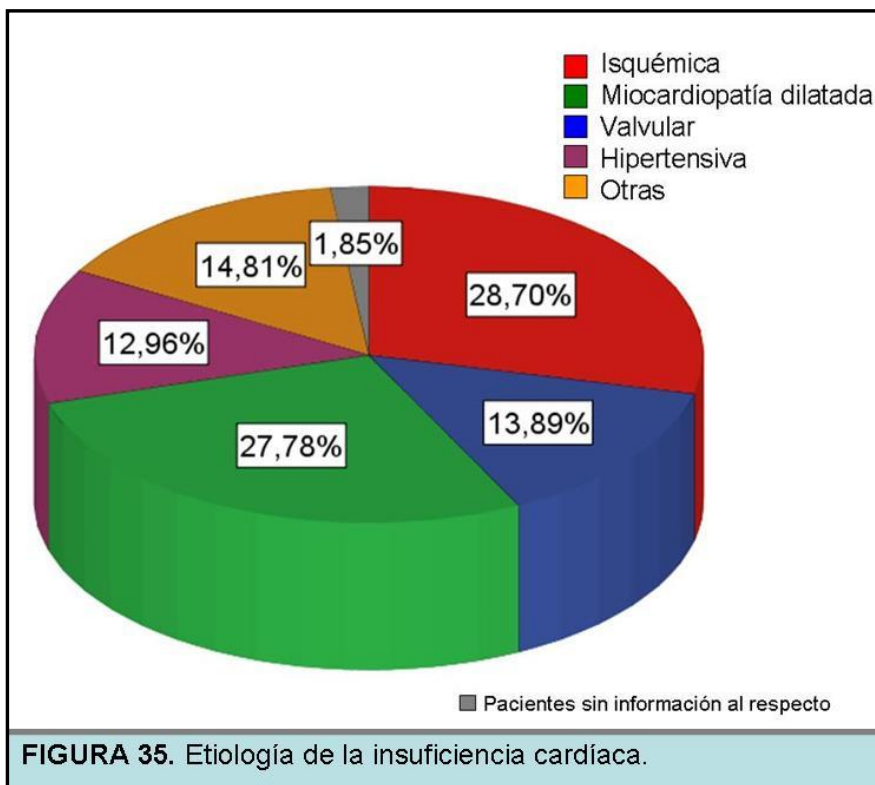
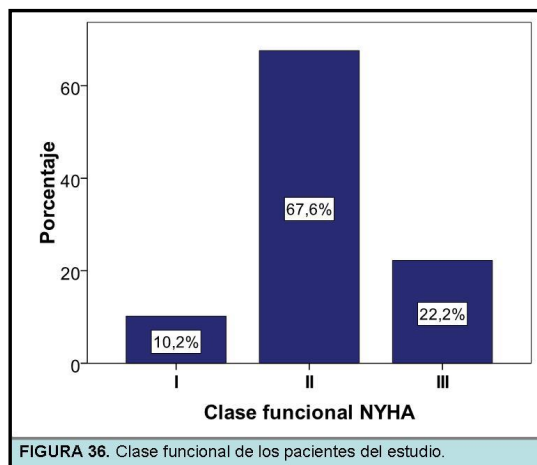


FIGURA 34. Perfil glucémico de los pacientes.

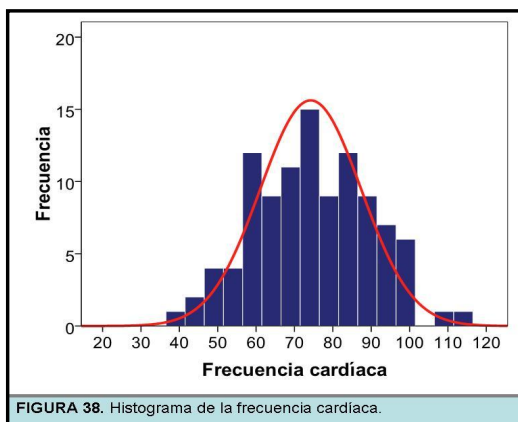
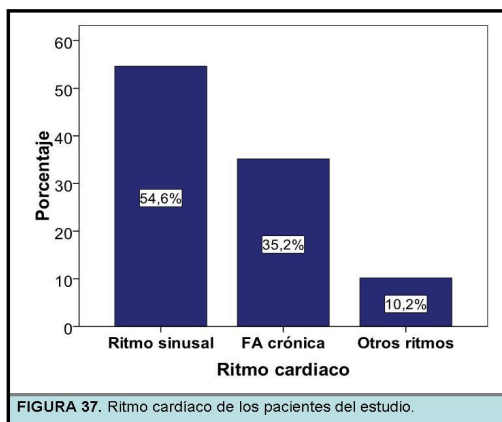
Etiología de la IC. 31 de los pacientes presentaban un origen isquémico de su IC (29,2% del porcentaje válido), mientras que 30 presentaban miocardiopatía dilatada (28,3%), 15 valvulopatías (14,2%) y 14 cardiopatía hipertensiva (13,2%). De los pacientes restantes, 16 se agruparon en otras causas (miocardiopatía hipertrófica, taquimiocardiopatía, miocarditis...). Hay que reseñar que ante todo paciente con miocardiopatía dilatada se descartó etiología isquémica ya sea mediante coronariografía o por test de imagen no invasivo para detección de isquemia/necrosis. Dos pacientes quedaron sin catalogar (1,9%), por presentar miocardiopatía dilatada y no poderse descartar etiología isquémica al no aplicarse ningún de las pruebas anteriormente mencionadas.



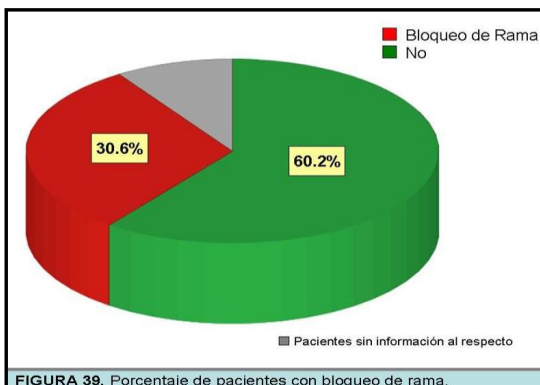
Clase funcional. Con respecto a la clasificación de la *New York Heart Association* (NYHA) sobre la clase funcional de los pacientes, en nuestro estudio 11 pacientes se encontraban en clase I, 73 en clase II y 24 en clase III, sin encontrar ningún paciente en clase funcional IV.



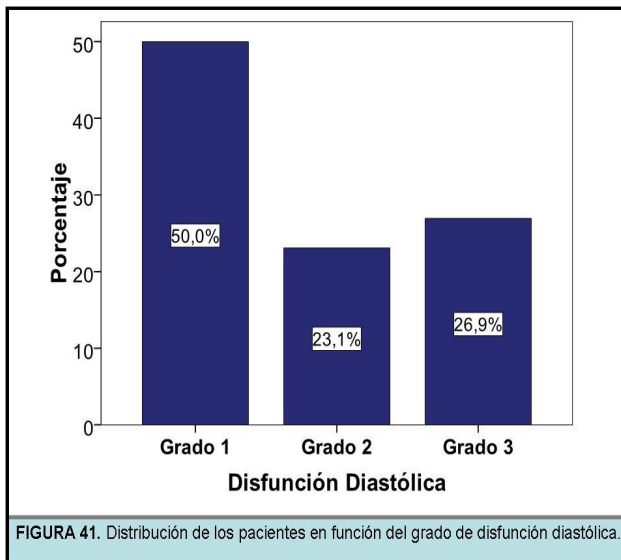
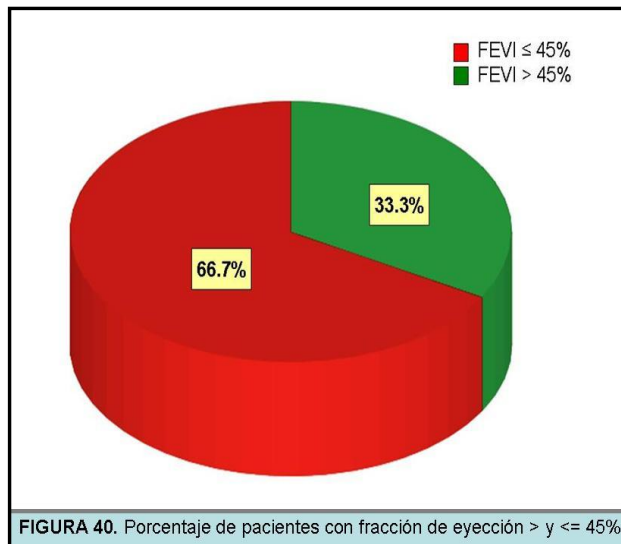
Ritmo y frecuencia cardíaca. 59 pacientes se encontraban en ritmo sinusal, mientras que 38 estaban en fibrilación auricular (FA). El grupo restante (11 pacientes) se incluyó en el grupo de otros ritmos, que incluía ritmo de marcapasos, flutter auricular y otros trastornos del ritmo.



En 33 pacientes había trastorno de conducción tipo bloqueo completo de rama (QRS > 120 milisegundos), que en el 69,7% consistía en un bloqueo de rama izquierda del haz de His.

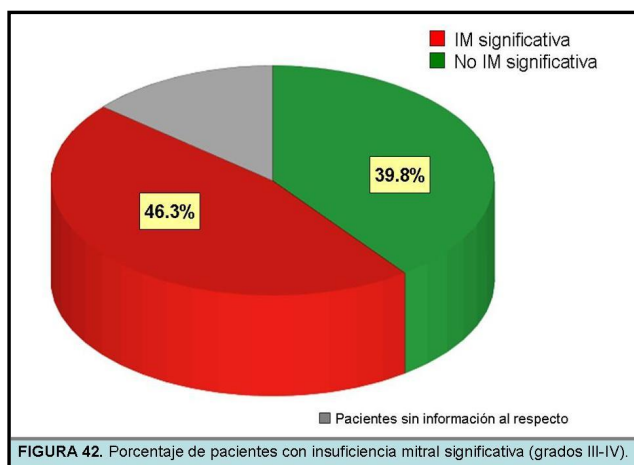


Medidas ecocardiográficas. 72 pacientes presentaban la función sistólica ventricular izquierda deprimida, considerando como tal valores de FEVI $\leq 45\%$. Por su parte, el patrón de disfunción diastólica más frecuente era el tipo 1 (50%), habiendo hasta un 26,9% de los pacientes con patrón restrictivo. De la función sistólica disponíamos de la información en el 100% de los pacientes, frente a sólo un 48,1% de los pacientes con datos del grado de disfunción diastólica.



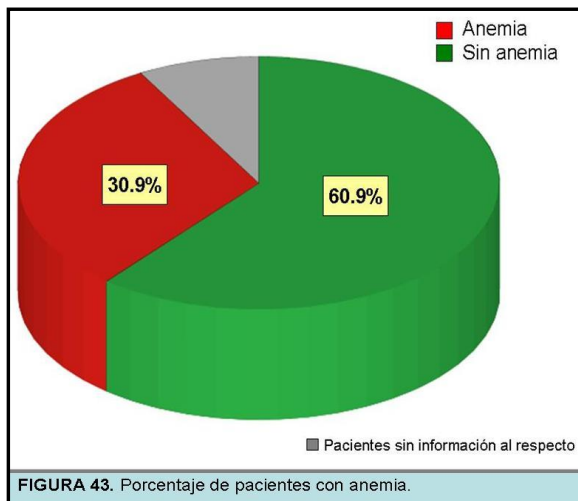
El grosor medio del septo fue de $11,7 \pm 3,0$ mm y de la pared posterior de $10,8 \pm 2,3$ mm. El volumen telediastólico medio fue de $157,7 \pm 58,6$ mm y el telesistólico

de $107,2 \pm 51,2$ mm. Estos datos se obtuvieron con la información de 54 pacientes (50% de valores perdidos).

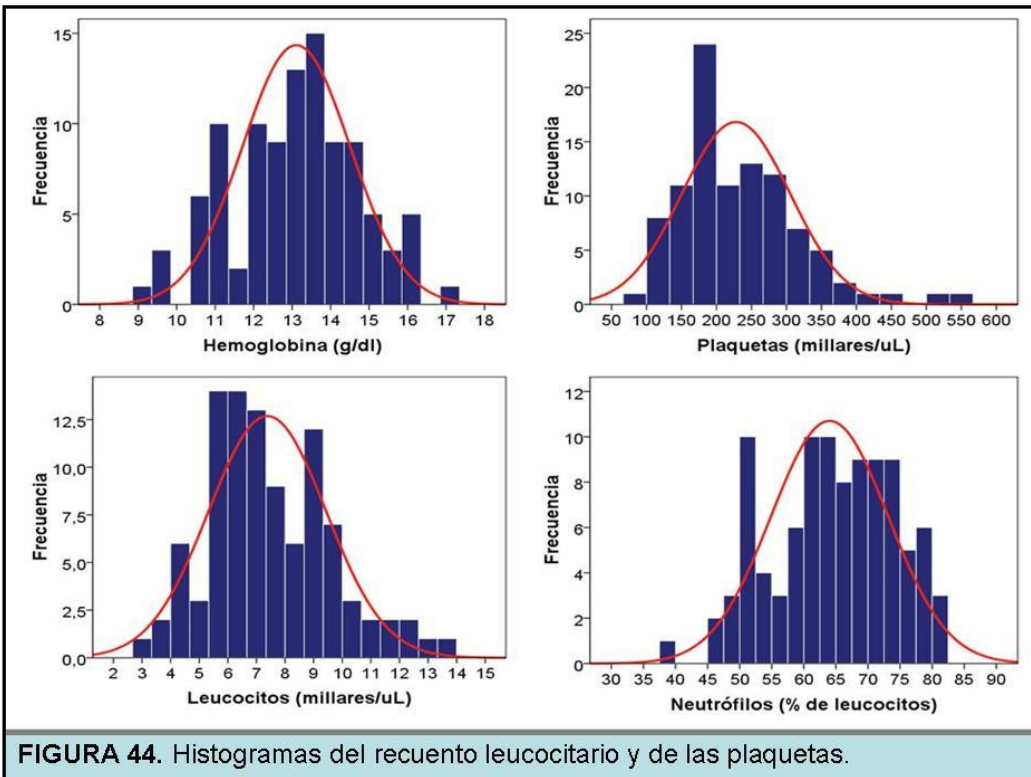


En cuanto a la presencia de alteraciones valvulares, disponíamos de la información en 102 pacientes (94,4%), encontrando la presencia de valvulopatía aórtica significativa (estenosis o insuficiencia de grado al menos moderado) en 8 pacientes (7,8%) y valvulopatía mitral significativa en 50 pacientes (49,0%, de los que el 100% era insuficiencia mitral al menos moderada).

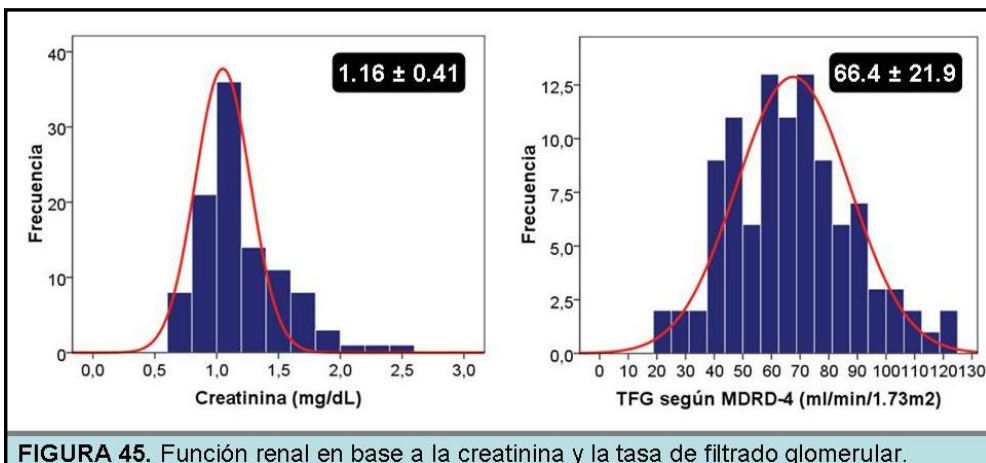
Hemograma. La hemoglobina media de nuestra población a estudio fue de $13,1 \pm 1,6$ g/dL y el hematocrito medio de $38,0 \pm 4,8\%$. En 9 pacientes no disponíamos de ese dato (8,3%). En base a la definición de anemia propuesta por la OMS (<13 g/dL en varones y < 12 g/dL en mujeres) 34 pacientes (33,7% del

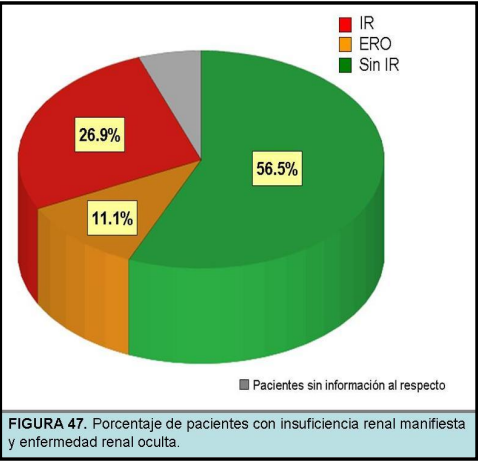
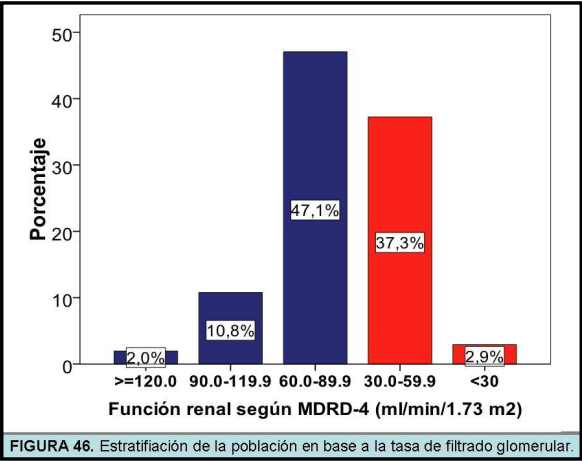


porcentaje válido) tenían anemia. La media de plaquetas fue de $233,6 \pm 85,1$ miles/ μ L y de leucocitos $7,5 \pm 2,2$ miles/ μ L (con $64,5 \pm 9,6$ % de neutrófilos).



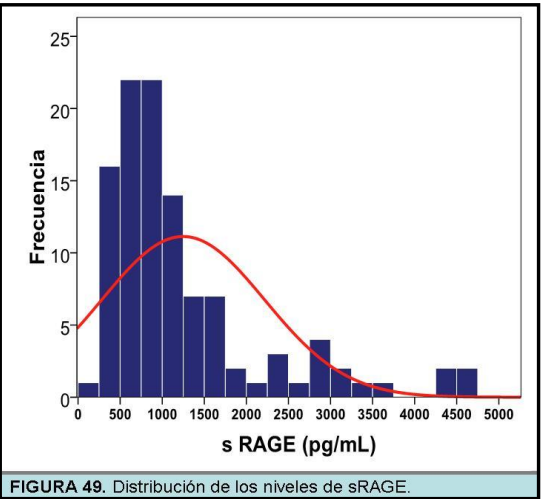
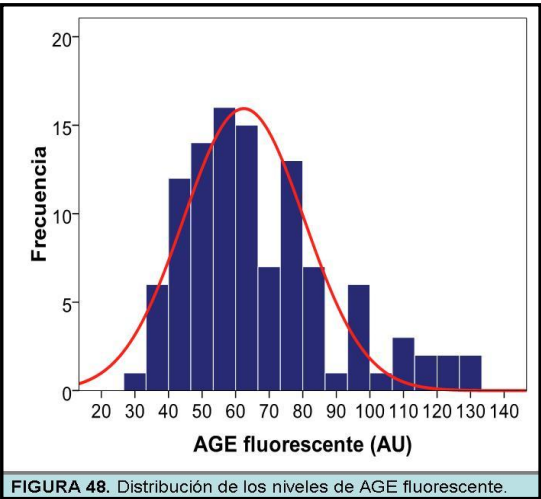
Función renal. La creatinina sérica presentaba una mediana de 1,0 mg/dL (RIQ: 0,9-1,3 mg/dL) y la tasa de filtrado glomerular (TFG) estimada mediante MDRD-4²⁶¹ de 66,0 ml/min/1.73 m² (RIQ: 49,8-79,7 ml/min/1,73 m²). 41 pacientes presentaban insuficiencia renal, definida como una TFG según MDRD-4 < 60 ml/min/1,73 m². De ellos, 12 (11,7%) presentaban cifras de creatinina consideradas normales (<1,3 mg/dL en varones y < 1,2 mg/dL en mujeres), catalogándose como enfermedad renal oculta (ERO).



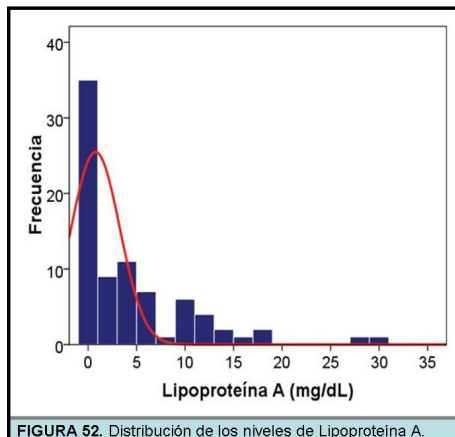
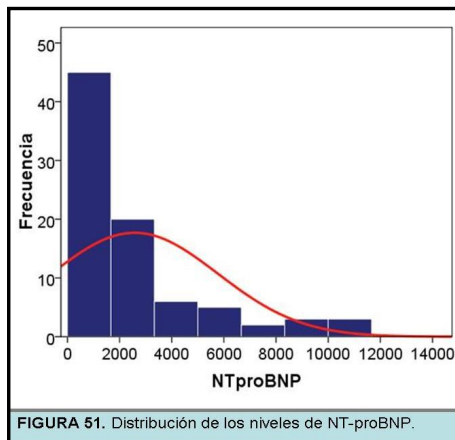
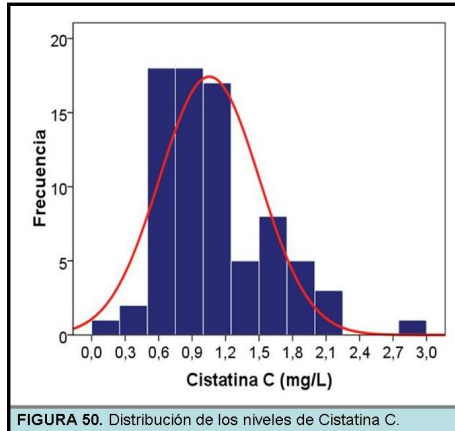


AGE fluorescente. Medido en la totalidad de los pacientes. Su valor medio en el plasma de nuestros pacientes fue de $67,3 \pm 22,6$ AU (*Arbitrary Units*), estando comprendidos entre 29,5 AU (valor mínimo) y 132,5 AU (valor máximo), con valores superiores a 63,5 AU en la mitad de los pacientes (mediana).

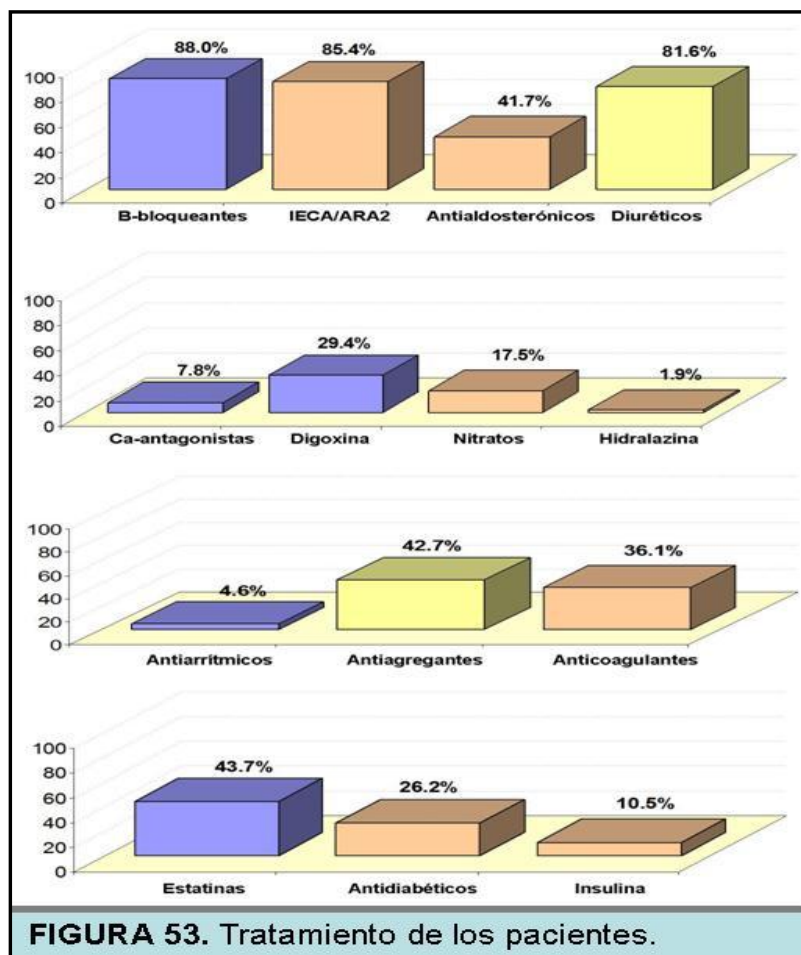
RAGE soluble. Medido en la totalidad de los pacientes. Su valor medio en el plasma de nuestros pacientes fue de $1268,9 \pm 953,6$ pg/mL, estando comprendidos entre 229,9 pg/mL (valor mínimo) y 4648,5 pg/mL (valor máximo), con valores superiores a 953,7 pg/mL en la mitad de los pacientes (mediana).



Otros biomarcadores. Se midió la cistatina-C, el NT-proBNP y la lipoproteína A en el plasma de los pacientes, con valores perdidos en 30 (27,7%), 23 (21,3%) y 28 (25,9%) pacientes, respectivamente. Las medianas para cistatina C, NT-proBNP y lipoproteína A fueron de 1,0 mg/L (RIQ: 0,7 – 1,4 mg/L), 1600,0 pg/mL (RIQ: 740,0 – 3033,0 pg/mL) y 2,0 mg/dL (RIQ: 0,0 – 6,0 mg/dL)



Tratamientos. Más del 85% de los pacientes estaban a tratamiento con B-bloqueantes (88,0%) e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) o antagonistas de los receptores AT1 de la angiotensina II (ARA-II) (85,4%). Así mismo, 45 pacientes estaban bajo tratamiento con antagonistas de la aldosterona (41,7%), ya sea espironolactona o eplerenona. Hasta 88 de los 108 pacientes controlaban su sintomatología con diuréticos de forma mantenida (81,6%). En cuanto al control del perfil lipídico destacar que hasta un 43,7% de los pacientes estaban bajo terapia con estatinas. De los 38 pacientes diabéticos, el 28,9% estaban tratados con insulina y un 68,4% con antidiabéticos orales. 42,7% de los pacientes estaban antiagregados y 36,1% anticoagulados. En referencia a otras medicaciones, destacar el empleo de digoxina en el 29,4% de los pacientes y de nitratos en el 17,5%. Los calcioantagonistas quedaron relegados a un 7,8% de los pacientes y la hidralazina a 1,8%. Así mismo 4 pacientes (3,7%) presentaban un desfibrilador automático.



3.3. PROTOCOLO DE ACTUACIÓN

En todos los pacientes se realizó la sistemática de estudio habitual en nuestro centro que incluye: **historia clínica completa, hemograma, bioquímica sérica y ecocardiograma**. Dos enfermeras especializadas (María Moure González y Ana Seoane Blanco) se encargaban de pesar y tallar a los pacientes, medir el perímetro de cintura así como tomar las constantes habituales (tensión arterial y frecuencia cardíaca). El tratamiento farmacológico se pautó de acuerdo a las directrices de la Guías de Práctica Clínica publicadas por la Sociedad Europea de Cardiología⁶.

3.3.1. RECOGIDA DE MUESTRAS

Previo información al paciente y familiares y obtención del consentimiento informado, se procedió a recoger una muestra sanguínea mediante venopunción del antebrazo, extrayéndose un volumen total de sangre de aproximadamente 6 ml (2 tubos con ácido etilendiaminotetraacético, EDTA, del inglés *Ethylene-Diamine-Tetraacetic Acid*), para la medición de los AGE y del sRAGE. Esas muestras fueron centrifugada a 1800 xg durante 10 minutos, a temperatura ambiente, y congeladas a -40°C hasta que se procedió al análisis.

3.3.2. MEDICIÓN DE AGES

Los AGE se midieron por espectrometría de fluorescencia (método de Munch)¹⁰⁹, teniendo en cuenta la propiedad fluorescente de los AGE, que emiten fluorescencia intensa a 460 nm tras ser sometidos a una fuente de excitación a 360 nm). Para ello se utilizaron muestras de plasma de 80 µL en placas multipocillo oscuras, midiéndose la fluorescencia por duplicado en un lector multi-modo (Synergy 2, Biotek), con un coeficiente de variación inferior al 8%. Los resultados de estas mediciones se expresaron en unidades arbitrarias de fluorescencia (AU: *arbitrary units*).

Este método no permite la medida de un único AGE, sino que sirve para detectar una amplia variedad de formas diferentes de AGE, mayoritariamente procedentes

de la formación de puentes entre lisinas, lo que permite valorar de una forma global la actividad de glicación avanzada en la circulación.

3.3.3. MEDICIÓN DE sRAGE

El receptor soluble de AGE (sRAGE) se midió a través de un Kit comercial (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, Estados Unidos) mediante el método de enzima-inmunoensayo (ELISA, acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las medidas se realizaron por duplicado con coeficientes de variación inferiores al 5%. Los resultados se expresaron en pg/mL.

3.3.4. OTRAS MEDICIONES

Las mediciones de los **parámetros bioquímicos básicos** se realizaron con el analizador multicanal Cobas Integra 700 (Roche Diagnostics, Indianápolis, Estados Unidos).

Los niveles séricos de **colesterol y triglicéridos** fueron medidos usando kits de reactivos enzimáticos (mediante tests colorimétricos) de la compañía Boehringer Ingelheim (Mannheim, Alemania), mientras que el HDL-c fue determinado en el sobrenadante después de la precipitación de las VLDL y LDL con ácido fosfotúngstico $MgCl_2$. La determinación de LDL-c se realizó con la fórmula de Friedewald²⁶² ($LDL = \text{Colesterol total} - \text{Colesterol HLD} - \text{Triglicéridos}/2,2$).

La **hemoglobina glicada** (Hb A1c) se determinó por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC: High-performance Liquid Chromatography) usando los analizadores automáticos HA-8121 y HA-8140 del grupo Menarini (Menarini Diagnostics, Reino Unido) con un coeficiente de variación < 1,6%.

La **fructosamina** se midió mediante el método enzimático GlyPro (con kits de Genzyme), usando el analizador Cobas Mira (Roche Diagnostics, Indianápolis, Estados Unidos).

La **cistatina C** se midió mediante métodos de inmunonefelometría, con el Kit de Dade Behring N Latex Cystatin C.

El **NT-proBNP** (fracción amino terminal del Péptido Natriurético Cerebral) se midió mediante el método de ELISA de la casa comercial Roche Diagnostics (Indianápolis, Estados Unidos).

3.4. SEGUIMIENTO CLÍNICO

La **mediana de seguimiento fue de 1,3 años**, con un rango intercuartílico que oscila entre 1,1 y 1,5 años, siendo el periodo mínimo de seguimiento de 38 días y el máximo de 688 días. De 2 pacientes (1,8%) carecíamos de información en el seguimiento.

Durante el seguimiento se registró la incidencia de muertes así como la necesidad de reingreso por empeoramiento de la sintomatología producida por la IC (IC crónica agudizada). Las asistencias de los pacientes al servicio de urgencias por empeoramiento de su clase funcional se consideraron como ingreso hospitalario por IC cuando precisaban la administración de diuréticos iv junto con más de 24 horas de observación. Así mismo se catalogó la muerte como de causa cardíaca cuando ésta era debida a un problema definido cardiovascular (IC, infarto de miocardio, arritmias...).

Cada paciente se reevaluó cada 3 meses, aproximadamente. La información sobre el *endpoint* de eventos combinados (muerte y reingreso por IC) se obtuvo de las revisiones clínicas, así como del programa de asistencia sanitaria *IANUS* y en ocasiones por vía telefónica.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la recogida tanto de los datos clínicos como de los datos de laboratorio en cada paciente, se utilizó un cuaderno de recogida de datos, así como una base de

datos en *Microsoft Access 2007*. Para el análisis de los datos se utilizó el programa *SPSS* (SPSS Inc, Chicago, Illinois, versión 15,0).

Las variables categóricas se expresaron mediante frecuencias y porcentajes. En relación con las variables continuas, la asunción de normalidad se comprobó con el test de Kolmogorov-Smirnov. Las variables que seguían una distribución normal se expresaron como media $\pm$ desviación típica. Las restantes se expresaron como mediana y rango intercuartílico.

La asociación entre variables categóricas se comprobó mediante el **test de chi-cuadrado** o el **test exacto de Fisher** cuando al menos el 25% de los valores presentaron una frecuencia esperada menor de 5. La asociación entre variables cuantitativas se determinó mediante la **correlación de Pearson o Spearman** según las variables cumplieren o no la condición de normalidad. La comparación de variables cuantitativas con categóricas dicotómicas se llevó a cabo con el “**t-test**” de Student (cuando cumplían la condición de normalidad) y con el **test no paramétricos de la “U” de Mann-Whitney** (cuando no la cumplían). Para comparaciones de variables continuas con más de 2 categorías se utilizó el **test de ANOVA**.

La valoración de la sensibilidad y especificidad así como la determinación de los puntos de corte con mayor poder predictivo se los diferentes parámetros analíticos se realizó mediante el **análisis de curvas ROC** (*Receiver Operator Characteristic curves*).

Para el análisis multivariado, se construyeron modelos de regresión logística donde se incluyeron aquellas variables estadísticamente significativas en el análisis univariado, junto con aquellas que se consideraron clínicamente relevantes. Se empleó un **análisis de regresión logística binomial** con el método de paso a paso hacia atrás.

Los análisis de supervivencia ajustados a variables se realizaron mediante la determinación de la Hazard Ratio por regresión de Cox. Las curvas de supervivencia “brutas” se obtuvieron mediante el **análisis de Kaplan Meier**,

valorándose la significación estadística mediante log-rank. Por su parte, las curvas de supervivencia ajustadas a variables confusoras se realizaron mediante el **análisis multivariable de regresión de Cox**.

Se consideraron como significativas diferencias encontradas con una probabilidad de error menor o igual a un 5% ($p \leq 0,05$).

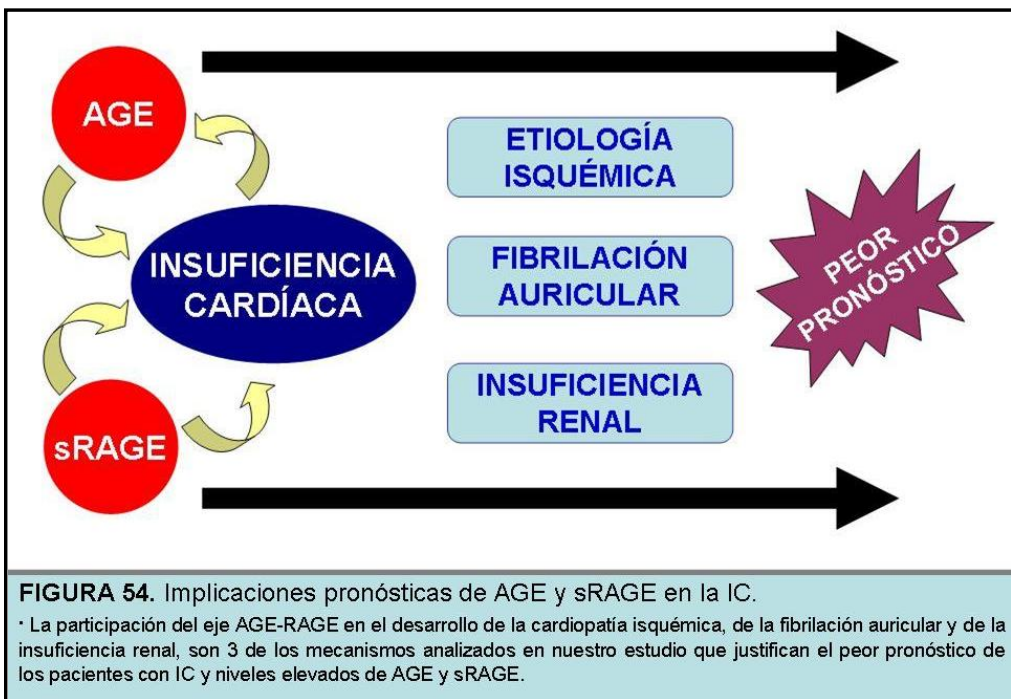
RESULTADOS

4.1. ARTÍCULOS PUBLICADOS

En esta sección se presentan los resultados más llamativos de nuestro estudio. En este primer subapartado se analizan los 4 trabajos publicados a fecha de hoy en relación con el valor pronóstico del eje AGE-RAGE en la IC y los posibles mecanismos implicados (ver figura 22).

Así en un primer estudio se realiza una valoración global del significado **pronóstico del eje AGE-RAGE en la IC crónica**, confirmandose que los pacientes con IC que fallecieron o reingresaron por empeoramiento de su clase funcional durante el seguimiento presentaban niveles plasmáticos de AGE y sRAGE más elevados que aquellos que no presentaron ninguno de esos eventos, siendo sRAGE un predictor independiente de la clase funcional y de la evolución desfavorable durante el seguimiento²⁶³.

Posteriormente mediante los 3 siguientes estudios se analizan las **posibles vías por las que el eje AGE-RAGE pueden implicar un peor pronóstico** en la IC.



- Un primer estudio pone de manifiesto que el sRAGE se encuentra aumentado en los pacientes con IC de etiología isquémica, siendo un predictor independiente de la presencia de enfermedad arterial coronaria en dichos pacientes²⁶⁴.
- Un segundo estudio objetiva la relación existente entre los AGE y el sRAGE con la presencia de fibrilación auricular en pacientes con IC, analizando las posibles causas de dicha asociación²⁶⁵.
- Finalmente, en un tercer estudio se analiza el valor predictivo de los AGE fluorescente como marcadores de disfunción renal en pacientes con IC²⁶⁶.

4.1.1. VALOR PRONÓSTICO DEL EJE AGE-RAGE EN LA IC

Se presenta un trabajo que hemos realizado y que se publicó en 2011 en el *American Journal of Cardiology*²⁶³. En él se analiza el valor pronóstico del sistema AGE-RAGE en el seguimiento de los pacientes con IC crónica, con una mediana ligeramente superior a 1 año. Si AGE fluorescente se asociaba con la diabetes, insuficiencia renal y fibrilación auricular, sRAGE lo hacía además de con estas dos últimas variables, con la etiología isquémica y con la peor clase funcional. Aunque **tanto AGE fluorescente como el sRAGE se encontraban incrementados en el plasma de los pacientes que fallecían o reingresaban por IC en el seguimiento**, solamente los **niveles elevados de sRAGE resultaron un predictor independiente de eventos adversos** durante el curso evolutivo, incluso ajustando por una validada escala de riesgo como es el *Seattle Heart Failure Score*²⁶⁷.

A continuación se expone el trabajo según fue publicado, en donde se presentan con más detalle los resultados obtenidos, que posteriormente se discuten con mayor profundidad.

Relation of Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products to Predict Mortality in Patients With Chronic Heart Failure Independently of Seattle Heart Failure Score

AGE-RAGE axis and prognosis of heart failure

Sergio Raposeiras Roubín¹

Bruno Kostka Rodiño Janeiro²

Lilian Grigorian Shamagian^{1,3}

María Moure González¹

Ana Seoane Blanco¹

Alfonso Varela Román¹

Luis Almenar Bonet⁴

Ezequiel Álvarez Castro²

José Ramón González-Juanatey^{1,2}

1. Cardiology Department and Coronary Unit of the Clinical Hospital of Santiago de Compostela. Spain.

2. Department of Medicine of the University of Santiago de Compostela. Spain.

3. Cardiology Department of the Hospital de Meixoeiro of Vigo. Spain.

4. Cardiology Department of the Hospital La Fe of Valencia. Spain.

American Journal of Cardiology (2011). Mar 15; 107(6): 938-944

Abstract

Introduction. Knowledge of the role of the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGEs) in chronic heart failure (CHF) is very limited. In the present study, we measured plasma sRAGE levels in patients with CHF and examined whether plasma sRAGE predicts prognosis in patients with HF independently of validated scores as the Seattle Heart Failure Score (SHFS). We measured plasma sRAGE in 106 outpatients with CHF.

Methods and results. Patients were prospectively followed during a median follow-up period of 1.3 years with end points of cardiac death or rehospitalization. Plasma sRAGE level increased with advancing New York Heart Association functional class, SHFS, age, and ischemic cause. Plasma sRAGE level was also higher in patients with cardiac death and/or events than in event-free patients. In Cox multivariate proportional hazard analysis, SHFS, sRAGE, and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide were independent risk factors for cardiac death (sRAGE hazard ratio 1.26, 95% confidence interval 1.09 to 1.45, $p = 0.002$) and/or cardiac events (sRAGE hazard ratio 1.07, 95% confidence interval 1.03 to 1.11, $p = 0.002$). Survival curves adjusted by Cox analysis clearly demonstrated that the high-sRAGE group (higher than median) had a significantly higher incidence of cardiac death than the low-sRAGE group ($p = 0.001$).

Conclusion. In conclusion, sRAGE is a novel, highly sensitive, and specific prognostic marker in current optimally treated patients with CHF with an additive and independent value compared to the multimarker SHFS.

KEYWORDS: Advanced glycation end products (AGEs); Soluble receptor for AGE (sRAGE); Seattle Heart Failure Score; Chronic heart failure; Prognosis.

Introduction

Advanced glycation end products (AGEs) are molecules that appear in plasma and tissues and are generated by nonenzymatic glycation and oxidation of proteins because of the Maillard reaction, which is driven by oxidative stress in its final step⁷². In the setting of chronic heart failure (CHF), excess free-radical generation leads to increased plasma levels of AGEs²⁶⁸. There is accumulating evidence that an interaction of AGEs with their receptor (RAGE) causes activation of intracellular signaling²⁶⁹, gene expression, and production of proinflammatory cytokines and free radicals, thus playing a central role in the pathogenesis of vascular and heart complications²⁷⁰. Biological function of the soluble form of RAGE (sRAGE) has not been clearly defined and its biological importance within the AGE-RAGE axis is only recently beginning to be understood^{271,272}.

In the present study, we sought to evaluate the relation of sRAGE to severity and prognosis of CHF and to analyze whether this parameter has an additional value in predicting outcomes compared to the widely accepted Seattle Heart Failure Score (SHFS)²⁶⁷. SHFS is a model used to predict CHF prognosis in outpatients that uses common CHF clinical risk predictors and incorporates the effects of medical therapy and device interventions. However, the model does not incorporate certain HF prognostic parameters such as renal function²⁷³, B-type natriuretic peptide levels (BNP)²⁷⁴, and other biomarkers.

Methods

a) Study population

One hundred six consecutive outpatients with stable CHF who visited our hospital (cardiology department of University Hospital of Santiago de Compostela) from September 008 through March 2009 were entered in this prospective study. Causes of CHF were identified as hypertensive in 34%, ischemic in 33%, valvular in 9%, and other in 24%. Diagnosis of CHF was based on clinic symptoms and signs and evidence of structural and/or functional cardiac abnormalities (according

to diagnostic criteria of the European Society of Cardiology⁶). All patients had been in a stable clinical state for ≥ 2 months before study entry. Patients with known tumoral disease, hematologic disorders, history of clinically relevant infection within 90 days, or acute and chronic inflammatory diseases involving organs other than the heart were excluded from analysis. We did not include patients undergoing long-term treatment with steroid or nonsteroid anti-inflammatory drugs. The entire study was planned according to ethical standards detailed in the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committee for human studies at Galicia (Spanish region).

b) Data collection

Collection of medical history, cigarette smoking status, and current use of medication were recorded from questionnaires and interviews. Weight and height were measured while wearing indoor clothing without shoes and body mass index was calculated. Blood pressure was measured 2 times in a supine position after a 10-minute rest with a random sphygmomanometer. During this visit, a cardiac transthoracic ultrasound study was done to determine left ventricular ejection fraction (LVEF). LVEF was measured by echocardiography using the biplane disk summation method (Simpson rule). LVEF was considered preserved when it was $> 45\%$.

c) Biochemical measurements

Peripheral venous blood was collected from 8 through 10 A.M. after an overnight fast. Blood samples were centrifuged at 2,000g for 10 minutes at room temperature, and serum or plasma samples were frozen at -40°C until assayed. Basic biochemical tests were performed with a Cobas Integra model 700 multichannel analyzer (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana). Estimated glomerular filtration rate was used as an indicator of renal function based on the abbreviated Modification of Diet in Renal Disease study formula²⁶¹. Serum lipid levels were measured by enzymatic colorimetric test (Boehringer Ingelheim, Mannheim, Germany) and low-density lipoprotein cholesterol was calculated from the Friedewald formula. Hemoglobin A1c was measured by a latex-enhanced turbidimetric immunoassay (Cobas Integra System, Roche Diagnostics,

Mannheim, Germany). Plasma levels of N-terminal pro-BNP (NT-pro-BNP) were measured using the Elecsys pro-BNP sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (Roche Diagnostics, Madrid, Spain). Plasma sRAGE levels were determined using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kit (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) according to the manufacturer's protocol. Measurements were performed in duplicate and results were averaged. Intra-assay and interassay coefficients of variation were <5% and <8%, respectively. AGEs were measured by fluorescence of plasma according to the method of Munch et al.¹⁰⁹ Plasma was aliquoted into black 96-well plates in duplicate and fluorescence (excitation 360/40 nm, emission 460/40 nm) measured in a multimode microplate reader (Synergy 2, Bio-Tek, Bad Friedrichshall, Germany) at room temperature to estimate levels of fluorescent AGE. Readings were subtracted from those of plasma-free wells to obtain measurements in arbitrary units and the mean of each pair of readings was calculated.

d) Seattle Heart Failure Score

SHFS was derived for all patients based on original risk factor coefficients as described by Levy et al.⁷ Mean life expectancy was derived using the Web-based SHFS tool (<http://depts.washington.edu/shfm>).

e) Follow up and end-points

All patients were monthly consulted in our hospital to assess adherence to medication. Follow-up data were based on patients' records available at our outpatient clinic. None of the patients were lost to follow-up. Median follow-up of event-free patients was 1.3 years (1.1 to 1.4 SD, range 1.0 to 1.7). End points were death and rehospitalization with worsening HF. We defined cardiac events as a combination of these end points.

c) Statistical analysis

All analyses were performed with SPSS 15.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, Illinois). Continuous variables were expressed as mean $\pm$ SD. Categorical variables were presented as count or proportion (percentage). Comparisons of

continuous variables between 2 different groups were performed with Student's t test. Continuous data from > 2 groups were compared with 1-way analysis of variance. Pearson chi-square test was used for comparing categorical variables. To study the correlation between quantitative variables, Pearson or Spearman test was used. To calculate the sensitivity and specificity for sRAGE cut-off values to predict mortality and/or cardiac events, a receiver operator characteristic curve was configured. Cox proportional hazard analysis was performed to determine the independent predictor of cardiac events for the entire population. All variables that showed a p value <0.10 in univariate Cox regression analysis were entered into multivariate Cox regression analysis, as were entered other variables with demonstrated clinical value. SHFS was expressed as percent mortality risk, NT-pro-BNP per 100 pg/ml, fluorescent AGE per arbitrary unit, and sRAGE per 100 pg/ml. Adjusted survival curves for these variables for groups with high and low levels of sRAGE (based on median of sRAGE) were shown to indicate the independent prognostic value of this parameter. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Baseline characteristics are presented in Table 1. There was no difference in gender, body mass index, presence of diabetes mellitus or hypertension, and decreased LVEF between groups without and with cardiac events. Mean values for age, SHFS, NT-pro-BNP, fluorescent AGE, and sRAGE were significantly higher in patients with cardiac events. The opposite was found for hemoglobin. Percent kidney failure and ischemic cause were higher in the group with cardiac events. Concerning therapy, the group with cardiac events received more treatment with diuretics without other significant differences between groups.

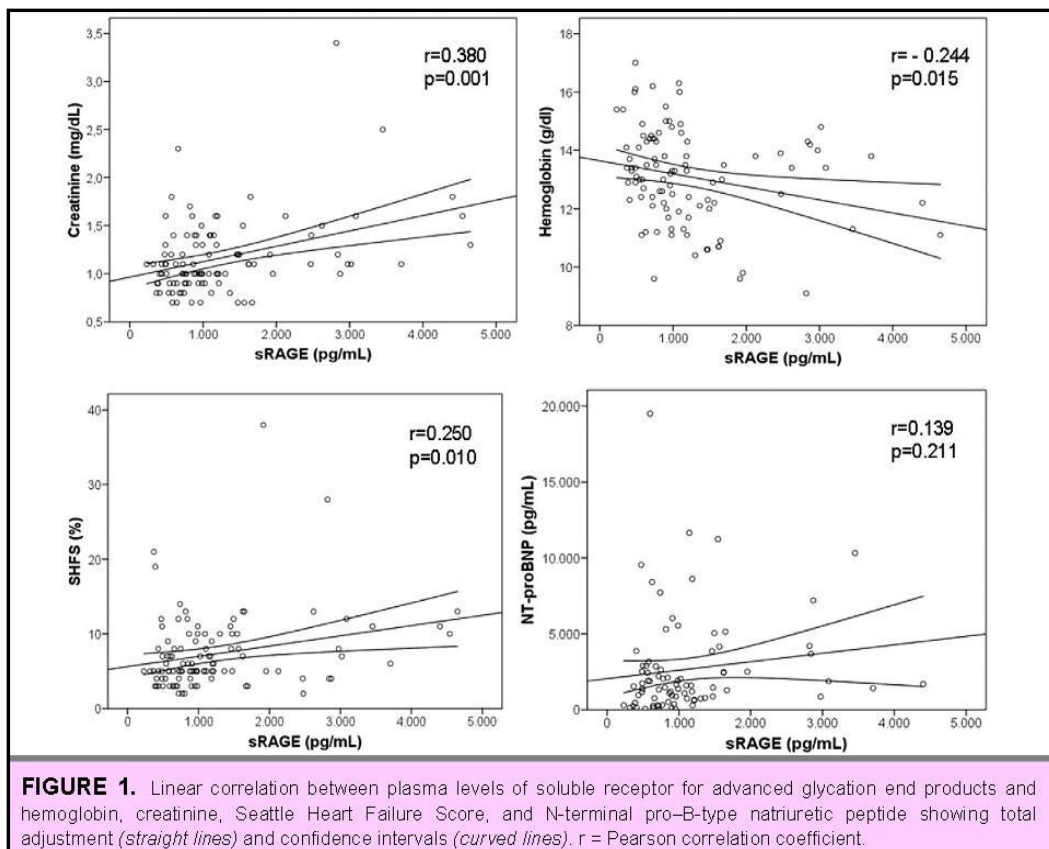
No difference existed in sRAGE levels between patients with and without diabetes mellitus, hypertension, and decreased LVEF. Plasma levels of fluorescent AGE were higher in patients with diabetes mellitus (70.4 ± 18.5 vs 58.3 ± 18.1 AU, p =

0.007) and kidney failure (79.2 ± 19.8 vs 54.8 ± 13.3 AU, $p = 0.001$). sRAGE levels were higher in patients with ischemic CHF ($1,321.1 \pm 1,105.2$ vs 895.8 ± 596.5 pg/ml, $p = 0.036$) and kidney failure ($1,545.2 \pm 1,142.8$ vs $1,039.5 \pm 717.7$ pg/ml, $p = 0.014$). sRAGE levels were also significantly higher in severe than in mild CHF ($1,663.2 \pm 1,135.9$ vs $1,090.3 \pm 770.6$ pg/ml for New York Heart Association classes III to IV vs I to II, respectively, $p = 0.007$). A significant inverse correlation existed between plasma levels of AGE and sRAGE with hemoglobin and creatinine (Figure 1). NT-pro-BNP correlated directly with fluorescent AGE ($r = 0.226$, $p = 0.040$) but not with sRAGE (Figure 1). Fluorescent AGE and sRAGE showed a positive correlation ($r = 0.283$, $p = 0.003$).

TABLE 1. Baseline characteristics

Characteristics	Total n = 106	Survivors n = 95	Nonsurvivors n = 11	P	No events n = 77	With events n = 29	P
Age (years)	72.0 (63.0-78.5)	69.6 $\pm$ 11.7	74.2 $\pm$ 9.8	0.233	68.0 $\pm$ 12.2	75.5 $\pm$ 7.4	0.001
Female	32.7%	34.0%	20.0%	0.368	33.8%	29.6%	0.693
IMC (Kg/m ²)	28.2 $\pm$ 4.4	28.4 $\pm$ 4.3	25.8 $\pm$ 4.4	0.202	28.5 $\pm$ 4.2	27.7 $\pm$ 4.7	0.678
Dyslipidemia	48.2%	52.7%	50.0%	0.869	50.0%	59.3%	0.419
Diabetes	35.8%	35.8%	36.4%	0.970	33.8%	41.4%	0.466
Hypertension	53.6%	57.6%	60.0%	0.884	53.3%	70.4%	0.124
NYHA III-IV	22.2%	21.3%	30.0%	0.533	19.2%	30.8%	0.222
Ischemic etiology	32.0%	30.1%	50.0%	0.200	25.0%	51.9%	0.010
Depressed LVEF	61.9%	63.6%	44.4%	0.259	63.9%	56.0%	0.484
eGFR < 60 ml/min	37.9%	37.6%	40.0%	0.883	30.3%	59.3%	0.008
Haemoglobin (g/dL)	13.1 $\pm$ 1.6	13.2 $\pm$ 1.5	11.7 $\pm$ 1.9	0.003	13.4 $\pm$ 1.5	12.4 $\pm$ 1.8	0.007
HDL-cholesterol (mg/dL)	42.9 $\pm$ 17.8	43.9 $\pm$ 18.3	33.3 $\pm$ 8.5	0.091	45.0 $\pm$ 19.3	36.9 $\pm$ 11.3	0.139
LDL-cholesterol (mg/dL)	110.2 $\pm$ 35.4	112.3 $\pm$ 34.2	87.8 $\pm$ 41.5	0.061	113.3 $\pm$ 31.1	100.4 $\pm$ 45.6	0.056
Glucose (mg/dL)	121.5 $\pm$ 43.4	122.6 $\pm$ 44.4	111.8 $\pm$ 33.0	0.458	118.6 $\pm$ 36.9	130.2 $\pm$ 58.9	0.254
Glycated haemoglobin	6.3 $\pm$ 1.3	6.3 $\pm$ 1.2	6.5 $\pm$ 2.1	0.709	6.2 $\pm$ 1.1	6.6 $\pm$ 1.6	0.146
Fluorescent AGE (a.u.)	67.3 $\pm$ 22.6	66.3 $\pm$ 21.4	76.5 $\pm$ 30.8	0.156	62.3 $\pm$ 19.0	80.6 $\pm$ 26.2	0.001
sRAGE (pg/mL)	1229.1 $\pm$ 931.4	1170.0 $\pm$ 909.6	1739.2 $\pm$ 1005.9	0.055	997.4 $\pm$ 766.2	1844.1 $\pm$ 1058.4	0.001
NT-proBNP (pg/mL)	2669.8 $\pm$ 3274.5	2356.2 $\pm$ 3139.0	5609.7 $\pm$ 3242.3	0.007	1971.8 $\pm$ 2944.1	5020.9 $\pm$ 3308.3	0.001
SHFS	7.3 $\pm$ 5.1	13.5 $\pm$ 10.7	6.6 $\pm$ 3.5	0.057	11.2 $\pm$ 7.6	5.8 $\pm$ 2.6	0.001
Treatment:							
ACEI/ARB-2	88.7%	89.6%	80.0%	0.315	0.9%	82.8%	0.198
Beta-blockers	85.1%	84.6%	90.0%	0.543	86.5%	81.5%	0.367
Diuretics	82.2%	80.2%	100.0%	0.127	75.7%	100.0%	0.002
Statins	41.7%	41.7%	50.0%	0.427	41.6%	44.8%	0.465
Insulin	10.4%	10.4%	10.0%	0.723	7.8%	17.2%	0.144

ACEI: ARB-2: IMC: Body Mass Index. HDL:High Density Lipoprotein. LDL: Low Density Lipoprotein. LVEF: Left Ventricular Ejection Fraction. NYHA: New York Heart Association. SHFS: Seattle Heart Failure Score

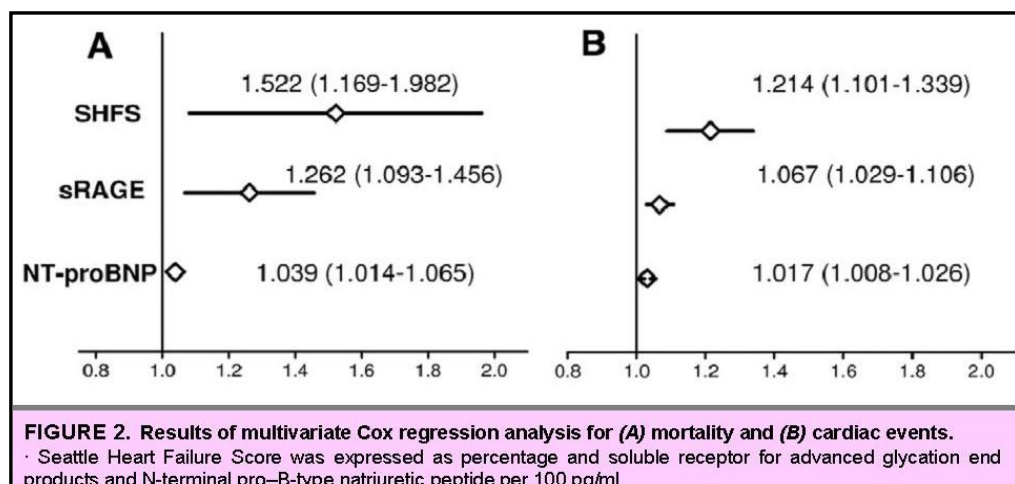


During the follow-up period, 11 patients died and 18 were hospitalized because of worsening CHF. Plasma levels of fluorescent AGE and sRAGE were higher in non survivors compared to survivors and in the group with cardiac events compared to the group without cardiac events (Table 1).

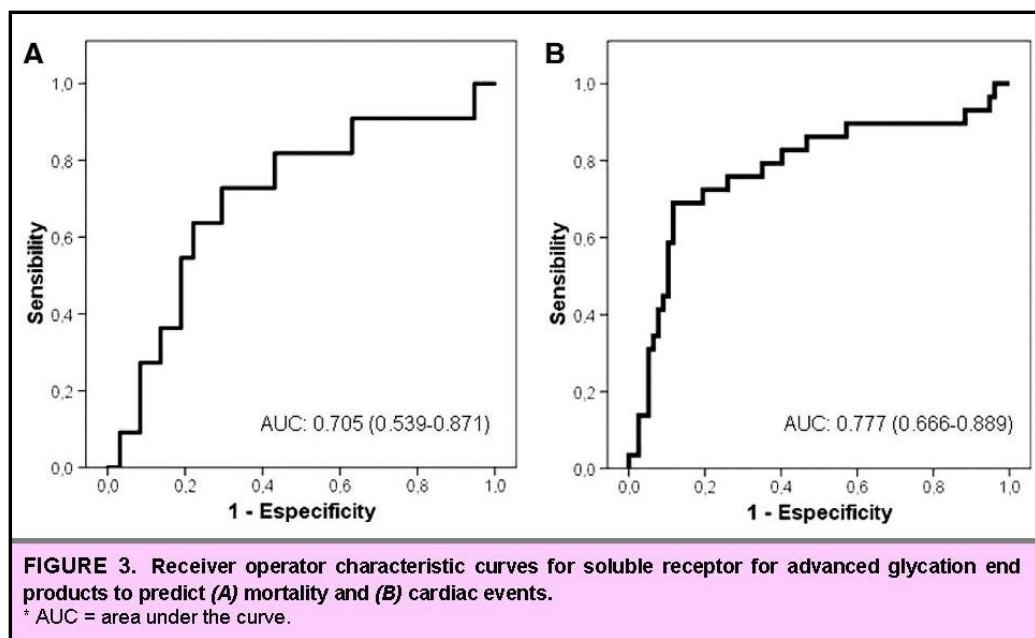
High levels of plasma sRAGE but not of fluorescent AGE (defined as higher than the median) were associated with a higher rate of mortality and rehospitalization because of worsening CHF in patients with stable CHF (Table 2). By univariate analysis, hemoglobin, high-density lipoprotein cholesterol, NT-pro-BNP, and sRAGE were significant predictors of mortality. Backward stepwise multivariate analysis showed that SHFS, NT-pro-BNP, and sRAGE were significant independent predictors for mortality (Figure 2). Model discrimination was assessed by a receiver operator characteristic curve and the c statistic was 0.88 (0.79 to 0.96). In relation to cardiac events in aggregate, in univariate analysis the same variables as for mortality plus age (per decade), severe CHF, ischemic cause,

kidney failure, and fluorescent AGE (per arbitrary unite) were significant predictors of morbidity / mortality. In stepwise multivariate analysis SHFS, NT-pro-BNP, and sRAGE remained significant (Figure 2). Neither serum creatinine nor estimated glomerular filtration rate reached statistical significance for morbidity and mortality in multivariate analysis.

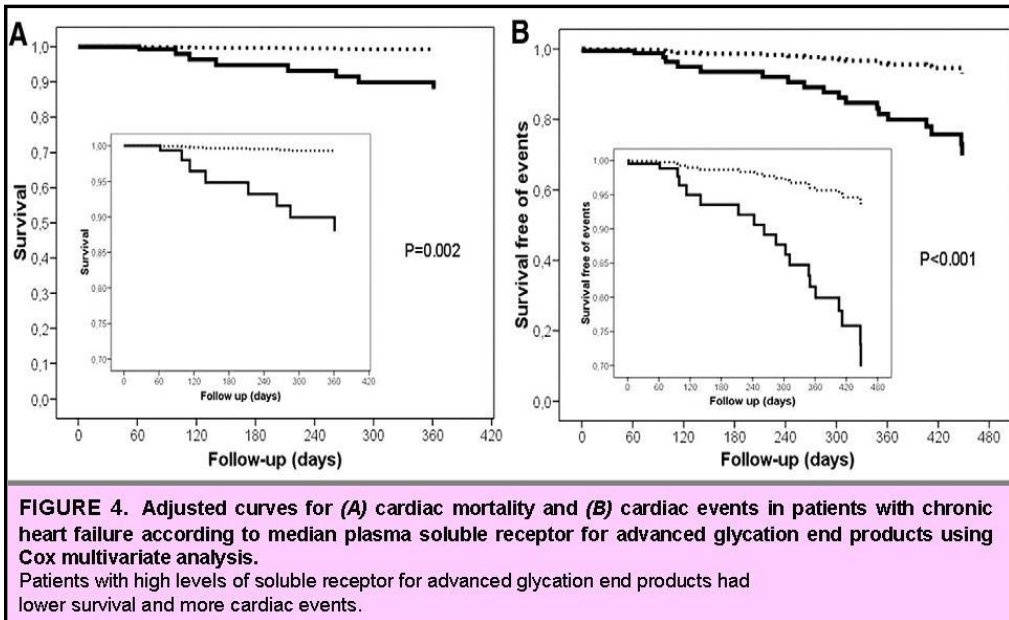
TABLE 2. Clinical characteristics of high and low sRAGE groups			
Characteristics	High sRAGE	Low sRAGE	P Value
Age (years)	72.6 ± 9.6	67.5 ± 12.8	0.023
Female	35.3%	30.2%	0.579
BMI (Kg/m²)	27.7 ± 4.2	28.7 ± 4.5	0.341
Hypertension	56.9%	58.8%	0.841
Dyslipidemia	58.0%	47.1%	0.271
Diabetes	36.5%	35.2%	0.885
NYHA III-IV	32.7%	12.0%	0.013
Ischemic etiology	43.1%	21.2%	0.017
Depressed LVEF	57.4%	66.0%	0.386
eGFR < 60 ml/min	49.0%	30.8%	0.045
Haemoglobin (g/dL)	12.6 ± 1.6	13.6 ± 1.5	0.002
HDL-cholesterol (mg/dL)	40.2 ± 12.8	45.5 ± 21.5	0.152
LDL-cholesterol (mg/dL)	109.8 ± 38.4	115.8 ± 31.9	0.921
Glucose (mg/dL)	127.6 ± 52.9	115.8 ± 31.9	0.178
Glycated haemoglobin	6.7 ± 1.5	5.9 ± 0.9	0.003
Fluorescent AGE (a.u.)	71.1 ± 23.2	63.7 ± 21.7	0.093
NT-proBNP (pg/mL)	3097.9 ± 3077.8	2325.4 ± 3418.9	0.288
SHFS	8.4 ± 5.9	6.2 ± 4.0	0.032
Treatment			
ACEI/ARA-2	84.6%	90.2%	0.195
Beta-blockers	83.7%	86.5%	0.686
Diuretics	95.7%	88.8%	0.666
Statins	44.9%	44.2%	0.946
Insulin	17.6%	3.8%	0.024
Death	17.6%	3.7%	0.022
Cardiac events	44.2%	11.1%	0.001
Abbreviations as in Table 1			



Concerning sRAGE we obtained receiver operator characteristic curves for prediction of mortality and cardiac events (Figure 3). For mortality, area under the curve for sRAGE was 0.705. For cardiac events, area under the curve was 0.724. Thus, it would appear that sRAGE is an excellent biomarker for CHF prognosis; using the cutoff-value of 1,183 pg/ml (based on previous receiver operator characteristic curves), we obtained sensitivity of 72.7% and specificity of 70.5% for mortality and sensitivity of 72.4% and specificity of 80.5% for cardiac events.



A significant direct correlation existed between plasma levels of sRAGE and SHFS, as shown in Figure 1. Adjusted curves of mortality and cardiac event rate by multivariable Cox analysis showed that high levels of sRAGE were a good predictor of mortality and worsening of CHF independently of SHFS, kidney function, and levels of NT-pro-BNP (Figure 4).



Discussion

Our study demonstrates for the first time that sRAGE is a highly sensitive and specific marker that provides additional prognostic information independently of multimarker SHFS and other known prognostic parameters such as BNP and creatinine in the currently treated CHF population. Moreover, we confirmed a previously reported association of sRAGE with worse survival and higher hospitalization rate in CHF.

The SHFS is the first and currently the best-validated multimarker risk assessment tool developed to predict outcomes in patients with HF, which incorporates not only clinical but also treatment variables²⁶⁷. However, this score presents some limitations, namely its limited generalization to the entire CHF population, because

it was based mainly on clinical trials, and differences in HF management, especially with more prevalent use of devices (in fact, 3.7% of our patients had an implanted cardioverter– defibrillator compared to 1.7% of the 11,232 patients included in all 6 SHFS derivation and validation cohorts). Thus, novel markers with proved and validated prognostic predicting capacity may be useful to improve former risk scores.

In the present study, sRAGE was associated with worse outcomes in addition to and independently of SHFS. sRAGE, the soluble form of RAGE, is a product of alternative splicing of the gene for RAGE (endogenously secreted RAGE) and cleavage of membrane-bound RAGE (cleaved RAGE)²⁷⁵. sRAGE has been recently related to oxidative stress and inflammation²⁶⁹ and, as we described, to coronary heart disease in patients with CHF²⁶⁴. In this study we demonstrated its association with worse prognosis (mortality and hospitalization rate), which is consistent with work by Koyama et al¹⁷⁵ and to our knowledge the only study on this issue. There are some hypotheses that justify this finding. Experimental studies have demonstrated that activation of RAGE by its ligands may trigger reactive oxygen species generation²⁷⁶, inflammation²⁶⁹, remodeling, and growth factor signaling and/or distinct events²⁷¹, which in the aggregate may lead to cell death and HF. Our hypothesis is that sRAGE plasma levels in patients with HF reflect increased activity of the AGE-RAGE axis.

Outpatients with CHF in the present study attended a tertiary reference unit and thus were treated optimally with almost 90% receiving prescriptions for angiotensin–aldosterone system blockers and B-blockers and 3.7% with implantable cardioverter– defibrillators/cardiac resynchronization therapy. High levels of sRAGE were associated with a fourfold increase in risk of cardiac death and cardiac events. It is also worth mentioning that almost 25.9% of patients presented normal LVEF, which is a proportion considerably larger than in the study of Koyama et al¹⁷⁵. There was no significant association between sRAGE and LVEF, and the prognostic impact of the former marker was independent of systolic function in our study. There is experimental evidence that may explain the deleterious role of RAGE in HF with normal LVEF²³⁰. Overexpression of RAGE decreased systolic and diastolic intracellular calcium concentrations and caused

significant delay in calcium reuptake. As a result, duration of the polarization phase of cardiac contraction might be expected to increase, thus causing or worsening diastolic dysfunction.

In the present study, sRAGE levels identified high-risk patients who were older, more frequently ischemic, with worse functional classes, more prevalent renal failure and anemia, and higher glycated hemoglobin levels. However, results of multivariable analysis adjusted for SHFS, BNP, and creatinine levels indicate that the association of sRAGE with mortality and morbidity are independent of these clinical conditions and co-morbidities, already considered in the SHFS with the exception of kidney function and glycated hemoglobin. In fact, sRAGE was the second more powerful predictor of worse outcomes after SHFS. Interestingly, renal function expressed as serum creatinine or glomerular filtration rate, which is a known prognostic predictor in patients with cardiovascular diseases, lost its significance as a risk marker when adjusted by SHFS, sRAGE, and BNP in our study. This finding repeats previous evidence from 2 population based studies^{273,277}. This prognostic inferiority of serum creatinine and glomerular filtration rate can be attributed to several factors. Regarding serum creatinine, it is known that it does not reflect accurately real renal function, particularly in elderly women. Concerning glomerular filtration rate, presence of the same variables in equations for estimation of glomerular filtration rate (Modification of Diet in Renal Disease and Cockcroft-Gault equations) and SHFS likely attenuates the prognostic capabilities of the former.

Limitations

Our study has several limitations. Although prospective, this is a small-sample study in a specific CHF population, so further larger-sample investigations are needed to confirm our results. In contrast, the proportion of high-risk patients according to SHFS was small; only 25.4% had a risk > 10%. It must be remembered that the population examined with SHFS came mainly from clinical trials of outpatients, whereas our patients with an expected worse prognosis were

recruited from a special tertiary referral unit. However, the lower risk observed in our population may reflect an improvement of prognosis by better implementation of guidelines in current outpatients with CHF, reinforcing the need to improve the former risk scores with novel markers. More sensitive parameters of renal function such as serum urea nitrogen or cystatin C may confer better prognostic value than serum creatinine or glomerular filtration rate evaluated in this study.

Conclusions

Despite these limitations, sRAGE was a novel, highly sensitive, and specific prognostic marker in current optimally treated patients with CHF, with an additive and independent value compared to the multimarker SHFS.

4.1.2. VÍAS PATOLÓGICAS ASOCIADAS A LA GLICACIÓN EN LA IC

Una vez comprobado el valor pronóstico predictivo del eje AGE-RAGE en la IC crónica, se presentan varios trabajos que tratan de demostrar qué mecanismos pueden estar implicados en el desarrollo de eventos adversos secundarios a la glicación.

Para ello se presentan a continuación, de forma ordenada, 3 trabajos - recientemente publicados- que versan sobre las siguientes temáticas:

- **Relación entre sRAGE y la etiología de la IC: predictor de cardiopatía isquémica.** Trabajo publicado en el European Journal of Heart Failure en 2010²⁶⁴.
- **Implicaciones del eje AGE-RAGE en la presencia de fibrilación auricular en pacientes con IC.** Trabajo publicado en el International Journal of Cardiology, en 2011²⁶⁵.
- **Asociación de los productos de glicación avanzada con la función renal: AGE fluorescente como marcador de disfunción renal en pacientes con IC.** Trabajo publicado en la revista Medicina Clínica, en 2011²⁶⁶.

Soluble receptor of advanced glycation end products levels are related to ischaemic aetiology and extent of coronary disease in chronic heart failure patients, independent of advanced glycation end products levels

New roles for Soluble RAGE

Sergio Raposeiras Roubín¹

Bruno Kostka Rodiño Janeiro²

Lilian Grigorian Shamagian^{1,3}

María Moure González¹

Ana Seoane Blanco¹

Alfonso Varela Román¹

Ezequiel Álvarez Castro²

José Ramón González-Juanatey^{1,2}

1. Cardiology Department and Coronary Unit of the Clinical Hospital of Santiago de Compostela. Spain.

2. Department of Medicine of the University of Santiago de Compostela. Spain.

3. Cardiology Department of the Hospital de Meixoeiro of Vigo. Spain.

European Journal of Heart Failure (2010) 12, 1092–1100

Abstract

Aims. Knowledge of the role of advanced glycation end products (AGE), their receptor (RAGE), and the receptor's soluble form (sRAGE), in heart failure (HF) is very limited. We evaluated the clinical role of the AGE–RAGE system in HF and in particular any association it might have with ischaemic aetiology.

Methods and results. We measured fluorescent AGE, glycated albumin and sRAGE in 103 patients with chronic HF. We showed that sRAGE but not AGE was related to ischaemic aetiology (1638.3 ± 207.4 ischaemic vs. 1065.1 ± 94.2 pg/mL non ischaemic group; $P = 0.016$) independent of age, sex, diabetes, renal function, clinical severity, or other variables (OR: 1.091; 95% CI (confidence interval): 1.032–1.153; $P = 0.007$). Moreover, sRAGE was directly associated with extent of coronary disease (OR for three vessel disease compared with non-coronary lesions: 1.186; 95% CI: 1.065–1.322; $P = 0.002$). We also found a correlation between sRAGE and severity of HF, which increased with New York Heart Association (NYHA) class (741.9 ± 88.9 pg/mL in class I, 1195.9 ± 113.2 pg/mL in class II, and 1724.8 ± 245.7 pg/mL in class III ($P < 0.05$)) and brain natriuretic peptide (BNP) levels (667.4 ± 68.0 vs. 1344.5 ± 126.0 pg/mL for BNP , and ≥ 400 pg/mL, respectively).

Conclusions. sRAGE is an indicator of chronic heart failure severity and an independent marker of coronary artery disease and its severity in patients with CHF.

KEYWORDS: Advanced glycation end products (AGE), (soluble) AGE receptor [(s)RAGE], Chronic Heart Failure (CHF), Coronary Artery Disease (CAD).

Introduction

Advanced glycation end-products (AGEs) are molecules that appear in plasma and tissues and are generated non-enzymatically by glycation and oxidation of proteins as a consequence of the Maillard reaction, which is driven by oxidative stress in its final step⁷³. Thus an increase in AGEs can be determined fundamentally by two factors: the existence of chronic hyperglycaemia and/or a high degree of oxidative stress²⁷⁸, while the pathophysiological role of AGEs in cardiovascular disease is not limited to diabetic patients⁹².

Activation of different pathways implicated in cardiovascular diseases by AGEs can occur via a specific receptor (RAGE) or independently of RAGE⁷². RAGE has a C-truncated secretory isoform, soluble RAGE (sRAGE) that circulates in plasma and has at least two variants: one that is secreted from cells, endogenously secreted RAGE (esRAGE), and the other which is formed by proteolytic cleavage from the cell-surface by matrix metalloproteinases, cleaved-RAGE (cRAGE)²⁷⁹.

In recent years the role of AGEs in the pathogenesis of cardiovascular diseases has become recognized. AGEs have been implicated in vascular and myocardial dysfunction, both diastolic and systolic^{95,280}, and in the development of atherosclerosis^{243,281,282}. Evidence of the role of sRAGE in cardiovascular disease, however, is much less clear. Several studies have shown that esRAGE has a protective role in cardiovascular disease¹⁶⁴, but in contrast the significance of total sRAGE is unclear. In patients without cardiovascular disease, sRAGE has been proposed to have an atheroscleroticprotective function, in particular by its acting as a decoy for AGE^{283,284}. However, in patients with cardiovascular disease the role of sRAGE is poorly defined^{285,286}.

Little is known about the role of the AGE–RAGE system in heart failure (HF)^{248,287}. In particular, to date only one study has been conducted on the prognostic value of sRAGE in patients with chronic HF (CHF)¹⁷⁵. The current study, therefore, aimed to evaluate the role of the AGE–RAGE system in HF, by analysing glycated albumin, fluorescent AGE and total sRAGE levels, and any

associations between these levels and clinical status. In particular, we have sought to ascertain any relationship that might exist between AGE–RAGE levels and ischaemic aetiology in HF.

Methods

a) Study population

We measured plasma concentrations of AGE and RAGE in 103 consecutive outpatients attending the HF consulting room of a tertiary hospital (Santiago University Clinical Hospital, Spain), between July 2008 and April 2009, who satisfied the following predefined inclusion and exclusion criteria. To be included, a patient had to have a confirmed diagnosis of HF based on clinical criteria and a structural and/or functional heart anomaly detectable by echocardiography, according to the diagnostic criteria for HF proposed by the European Society of Cardiology⁶. Patients with chronic inflammatory or malignant diseases, acute coronary syndrome and/or who had undergone myocardial revascularization in the previous three months, were excluded, as were patients with severe kidney dysfunction, classified according to the criteria of the National Kidney Foundation²⁸⁸ [estimated glomerular filtration rate < 30 mL/min/1.73 m² using the modification of diet in renal disease 4 (MDRD-4) formula²⁶¹]. Written informed consent was obtained from each included subject according to the protocol approved by the Ethics Committee for Human Studies at Galicia (Spanish region).

For all included patients, detailed information was gathered from medical history and appropriate physical examination and recorded in a database. In addition, blood samples were obtained for local laboratory analysis (haemogram, basic biochemistry and coagulation rate, lipid and thyroid hormone profiles, as well as specialized parameters such as levels of glycosylated haemoglobin, N terminal pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP) and cystatin C). An electrocardiogram and echocardiogram were also performed on each patient at the same visit. Left ventricular ejection fraction (LVEF) was calculated according to the modified Simpson's method.

b) Definitions of variables

HF was defined to be of ischaemic aetiology if any of the following criteria were satisfied: prior admission due to an acute coronary event (acute myocardial infarction or unstable angina), prior surgical or percutaneous myocardial revascularization, presence of myocardial necrosis signs on electrocardiogram or echocardiogram, or significant coronary disease as detected by angiography. Coronary artery disease was considered clinically relevant if there was a stenosis of at least 70% in any vessel lesions of at least 50% in the left main coronary artery were considered as a multi-vessel disease.

Diagnosis of type-2 diabetes was determined according to the criteria of the American Diabetes Association (ADA)⁸². We defined as hypertensive any patient taking an anti-hypertensive drug or whose systolic/diastolic blood pressure was $\geq 140/90$ mmHg. Similarly, a patient was considered hyperlipidaemic if s/he was either taking antihyperlipidaemic drugs or had at least one of the following plasma levels: total cholesterol ≥ 220 mg/dL, triglyceride ≥ 150 mg/dL, or high-density lipoprotein < 40 mg/dL. Severity of functional class was based on the New York Heart Association (NYHA) scale. An LVEF of .40% was defined as normal.

c) Measurements of soluble receptor of advanced glycation end products and advanced glycation end products

1.- AGE. Two different types of AGE (glycated albumin and fluorescent AGE) were measured in EDTA plasma, taken from patients after an overnight fast. Glycated albumin was quantified by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Briefly, appropriate dilutions of plasma proteins were adhered to 96-well plates by overnight incubation at 48C in coating carbonate/bicarbonate buffer (0.1 M, pH 9.5). The following day, adhered proteins were blocked in phosphatebuffered solution containing 0.25% bovine serum albumin and 0.025% Tween 20, and then incubated for 2 h in rabbit polyclonal anti-human AGE antibody (ab23722, Abcam, UK) at a final concentration of 1:2000. After washing in phosphate buffer solution with Tween 20, proteins were incubated in goat anti-rabbit IgG horseradishperoxidase-conjugated secondary antibody (ThermoFisher, Spain) at a final concentration of 1:10 000. Hydrogen peroxide was added in the presence of

tetramethylbenzidine (Across, ThermoFisher) and the reaction stopped with acid solution just before measuring optical density at 450 nm in a microplate reader (Multiscan Ex, Thermolabsystems). Quantification was carried out using glycated human serum albumin (Sigma-Aldrich, Spain) as the standard, and measurements made in duplicate for each sample. The ELISA was validated using plasma from apparently healthy control volunteers, and intra- and inter-assay precision calculated. Coefficients of variation were < 15% for both parameters. The mean value of glycated human serum albumin was 3.73 ng/mL (SD 1.19 ng/mL). Non-modified human serum albumin had a cross-reactivity < 3%.

AGEs have traditionally been detected using their fluorescent properties. 6 AGEs were measured by fluorescence of plasma according to the method of Munch et al¹⁰⁹. Fluorescence of plasma samples was measured in a multi-mode microplate reader (Synergy 2, Biotek) to estimate levels of fluorescent AGE in EDTA plasma. Plasma was aliquoted into black 96-well plates in duplicate, fluoresced at 360/40 nm and emission at 460/40 nm emission measured directly from the microplate reader; readings were subtracted from those of plasma free wells to obtain measurements in relative fluorescent units (AU), and the mean of each pair of readings calculated.

2.- sRAGE. As in previous clinical studies of total sRAGE (esRAGE plus cRAGE)^{175,279} we determined plasma sRAGE levels using a commercially available ELISA kit (Quantikine; R&D systems) according to the manufacturer's protocol. Briefly, a monoclonal anti-sRAGE antibody was used to bind plasma sRAGE, and bound sRAGE detected with a horseradish-peroxidase-linked polyclonal antibody specific for the extracellular domain of RAGE. After washing, a hydrogen peroxide solution was added to each well, and optical density at 450 nm determined with a microplate reader (Multiscan Ex, Thermolabsystems). Measurements were performed in duplicate and the results were averaged.

d) Statistical analysis

Assumptions of normality of continuous variables were checked with Kolmogorov–Smirnov tests. Non-skewed variables were summarized as mean+SD. Differences

between continuous variables were evaluated using Student's t-test. Categorical variables were expressed as percentages and compared using the chi-square test. Correlations between variables were calculated by Pearson's or Spearman's tests according to the normality of the variable, and two-tailed P-values are shown.

We used logistic regression analysis with the step by step method to identify predictors of ischaemic aetiology. In this analysis ischaemic HF was set as a dependent variable, and independent variables used were those with statistical significance in the univariate analysis between the groups with and without ischaemic aetiology and those with evidenced clinical relevance. Included variables were thus: age (in decades), male sex, presence of diabetes mellitus, arterial hypertension and dyslipidaemia, glomerular filtration rate estimated by the MDRD-4 formula (per 10 mL/min/1.73 m² decrease), LVEF < 40%, fluorescent AGE levels per AU) and sRAGE levels (per 100 pg/mL). The same model was used to analyse the severity of ischaemia, comparing patients with and without coronary disease. Results were expressed as odds ratios and 95% CI. Finally, the c-statistic of the model was calculated to assess its predictive capacity.

Statistical significance was defined as $P < 0.05$ or when the unit was outside the 95% CI. All analyses were performed using SPSS 15.0 software for Windows (SPSS Inc., Japan).

Results

a) Baseline characteristics and main differences between ischaemic and non-ischaemic patients

Of 103 patients included in the study, with a mean age of 69 years, 37 (35.9%) were diabetic and 31 (30.1%) ischaemic. Demographic characteristics of the population included in our study, together with the prevalence of cardiovascular risk factors, functional class, aetiology, analytical parameters, electrocardiographic and echocardiographic data are shown in Table 1. Comparing ischaemic with non-ischaemic HF patients showed similar distributions of these variables, with the

TABLE 1. Baseline clinical characteristics

Variables	All patients	Ischemic aetiology (n = 72)	Non-ischemic aetiology (n = 31)	p value
DEMOGRAPHIC FACTORS				
Age (years)	69.6 ± 1.2	70.1 ± 1.8	69.5 ± 1.5	0.804
Sex (male/female)	68.0 % / 35.0%	90.3 % / 9.7 %	55.6 % / 44.4 %	0.001
Blood pressure (mmHg)	94.4 ± 1.4	92.4 ± 2.3	95.3 ± 1.8	0.926
Body mass index (kg/m ²)	28.2 ± 0.5	28.6 ± 1.0	27.9 ± 0.6	0.928
CARDIOVASCULAR RISK FACTORS				
Arterial hypertension	64.1 %	64.5 %	63.9 %	0.951
Hyperlipidemia	60.2 %	74.2 %	54.9 %	0.067
Diabetes mellitus	35.9 %	48.4 %	30.6 %	0.084
Smoker	7.7 %	12.9 %	5.6 %	0.104
Ex-smoker	31.7 %	41.9 %	27.8 %	
FUNCTIONAL CLASS				
NYHA I	9.2 %	12 %	10 %	0.864
NYHA II	68.4 %	64 %	70 %	
NYHA III	22.4 %	24 %	20 %	
EKG				
Sinusal rythm	62.7 %	67.7 %	56.3 %	0.412
Pacemaker	8.0 %	12.9 %	8.5 %	
Atrial fibrilation	29.3 %	19.4 %	35.2 %	
Heart frecuece (bpm)	74.3 ± 1.4	72.8 ± 2.6	74.9 ± 1.7	0.508
ECHOCARDIOGRAPHY				
Depressed Ejection fraction	76 %	89.7 %	70.4 %	0.041
Left ventricular hipertrophy	50.0 %	38.5 %	54.8 %	0.161
Left ventricular dilatation	61.1 %	81.5 %	54.4 %	0.014
Left atrial dilatation	89.0 %	84.6 %	72.8 %	0.396
ANALITIC PARAMETERS				
Glucose (mg/dL)	121.4 ± 4.3	138.8 ± 10.8	113.9 ± 3.7	0.036
Fructosamine (mg/dL)	260.6 ± 11.6	285.6 ± 26.9	246.8 ± 9.8	0.191
Glycated haemoglobin (%)	6.6 ± 0.2	6.9 ± 0.3	6.4 ± 0.2	0.208
Glycated albumin (ng/mL)	21.3 ± 1.2	23.7 ± 12.5	20.2 ± 12.0	0.189
Fluorescent AGEs (AU)	65.5 ± 2.0	66.3 ± 3.40	65.1 ± 2.5	0.791
sRAGE (pg/mL)	1236.6 ± 94.1	1638.3 ± 207.2	1065.1 ± 94.1	0.016
Haemoglobin (g/dL)	13.2 ± 0.2	13.3 ± 0.3	13.2 ± 0.2	0.678
Creatinine (mg/dL)	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.553
Glomerular filtrate (ml/min)	58.9 ± 1.7	57.9 ± 1.8	59.3 ± 2.4	0.659
Cystatine (mg/L)	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.301
NTproBNP (pg/mL)	2663.2 ± 350.3	2468.7 ± 476.1	2741.1 ± 453.0	0.728
Total cholesterol (mg/dL)	181.4 ± 4.3	169.5 ± 9.5	184.5 ± 4.5	0.070
LDL (mg/dL)	111.5 ± 3.5	103.5 ± 8.0	115.3 ± 3.5	0.189
HDL (mg/dL)	44.2 ± 1.9	38.4 ± 2.9	46.9 ± 2.4	0.043
Triglicerides (mg/dL)	115.6 ± 6.2	112.9 ± 10.2	116.7 ± 7.8	0.777
TREATMENT				
B-blockers	86.4 %	93.3 %	83.1 %	0.147
ACE inhibitors/ARA	94.2 %	96.7 %	92.9 %	0.576
Espironolactone	64.1 %	53.3 %	70.4 %	0.099
Diuretics	90.6 %	80.0 %	80.3 %	0.770
Antiplatelets	41.7 %	66.6 %	31.0 %	0.001
Nitrates	16.5 %	45.2 %	4.2 %	0.000
Statins	46.6. %	80.0 %	32.4 %	0.000
Oral antidiabetic drugs	26.2 %	33.3 %	23.9 %	0.330
Insulin	9.7 %	16.1 %	6.9 %	0.149
ACE: angiotensin convorsor enzyme; AGE: advanced glycation end-products; ARA: angiotensin receptor antagonists; HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; NTproBNP: N-terminal pro-brain natriuretic peptide; sRAGE: soluble receptor for advanced glycation end-products				

following exceptions. First, ischaemic patients were predominantly males with depressed LVEF ($P = 0.012$). Second, the number of patients with diabetes mellitus and hyperlipidaemia was higher in the group with ischaemic aetiology, although statistical significance was not reached for these parameters. Statistically significant differences were not observed for age, arterial hypertension, functional class, renal function or other variables.

The average concentration of sRAGE was 1236 pg/mL. Mean serum fluorescent AGE, and glycated albumin levels are also shown in Table 1. Relationships between plasma sRAGE concentration and fluorescent AGE, fructosamine, glycated haemoglobin and glycated albumin levels are shown in Table 2. Fluorescent AGE was directly correlated with fructosamine ($r = 0.310$, $P = 0.032$) and glycated albumin ($r = 0.212$, $P = 0.031$), but not with glycated haemoglobin ($r = 0.124$, $P = 0.317$) or fasting glycaemia ($r = 0.089$, $P = 0.377$).

TABLE 2. Correlations between glycation parameters.

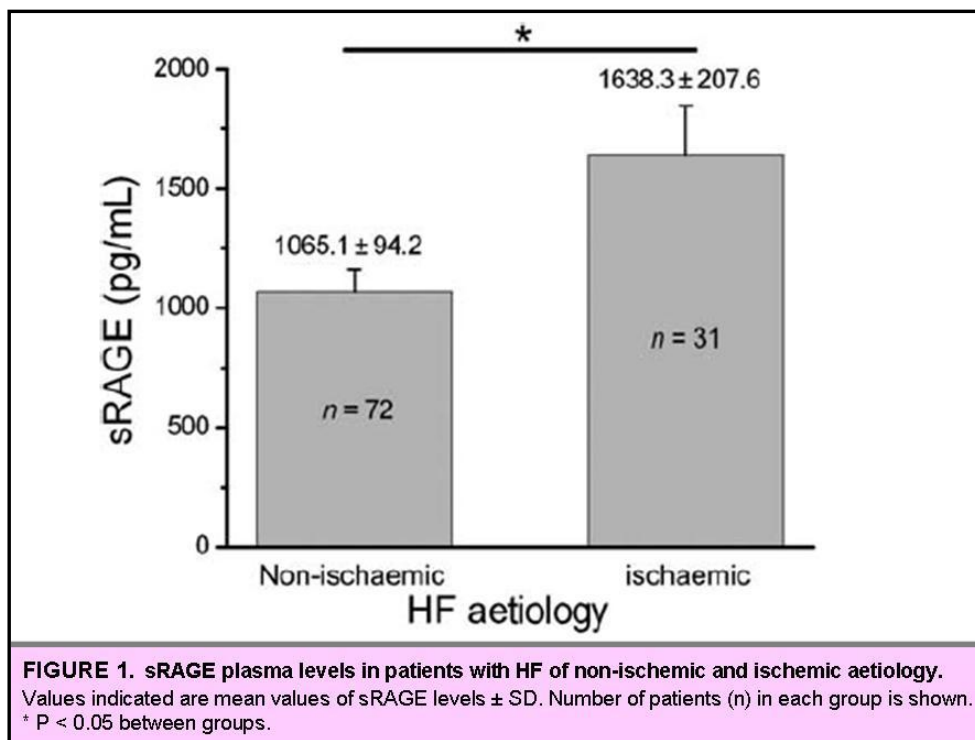
		Fructosamine	Glycated haemoglobin	Glycated albumin	Fluorescent AGE	sRAGE
Fructosamine	r		0.710	0.147	0.310	0.358
	p		0.000	0.319	0.032	0.012
Glycated haemoglobin	r	0.710			0.124	0.233
	p	0.000			0.317	0.057
Glycated albumin	r	0.147	0.186		0.212	0.045
	p	0.319	0.131		0.031	0.654
Fluorescent AGE	r	0.310	0.124	0.212		0.181
	p	0.032	0.317	0.031		0.067
sRAGE	r	0.358	0.233	0.145	0.181	
	p	0.012	0.057	0.654	0.067	

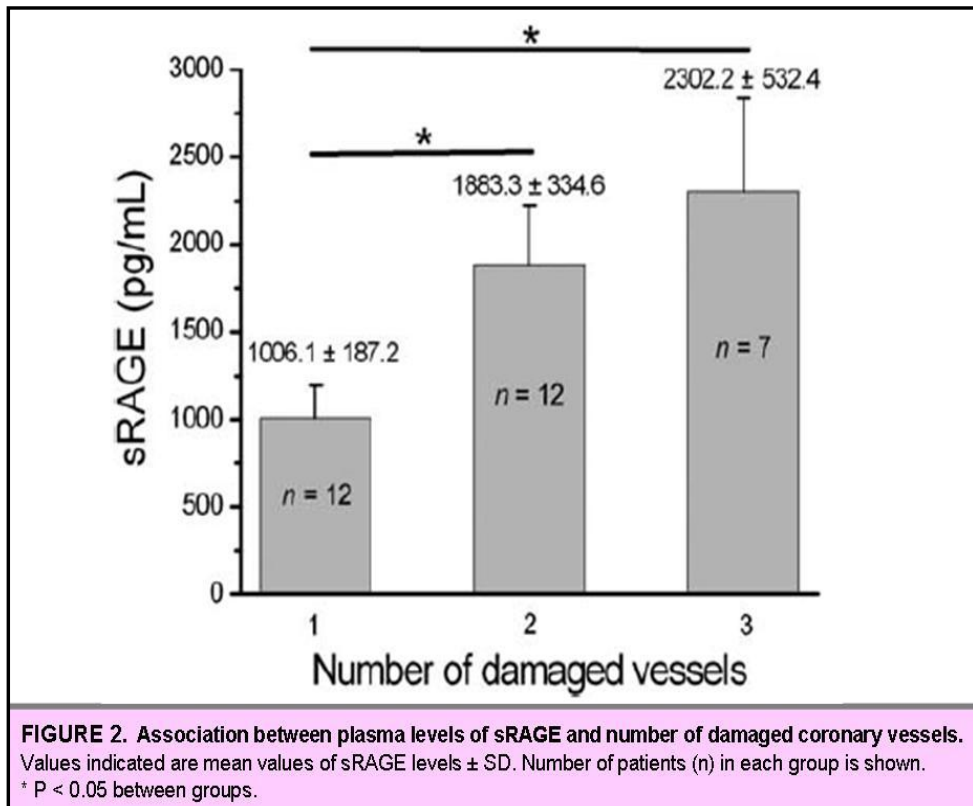
By contrast, concentrations of fluorescent AGE, glycated albumin and glycated haemoglobin were higher in the diabetic group (70.56 ± 3.46 vs. 62.70 ± 2.49 AU, $P = 0.066$; 25.63 ± 2.31 vs. 18.86 ± 1.27 ng/mL, $P = 0.013$; 7.30 ± 0.25 vs. $5.81 \pm 0.11\%$, $P < 0.001$, respectively). There were no differences in serum sRAGE levels

between patients with and without diabetes mellitus, although they were higher in the diabetic group with poorer glycaemic control, defined as glycated haemoglobin $\geq 7\%$, (1572.19 ± 257 vs. 841.64 ± 138 pg/mL, $P = 0.023$).

b) Correlation of the receptor of advanced glycation end products–advanced glycation end products system with heart failure of ischaemic aetiology

Analysing sRAGE–AGE plasma levels with respect to the presence of coronary artery disease, we found that plasma levels of sRAGE were higher in ischaemic patients (1638.32 ± 207 vs. 1065.09 ± 94 pg/mL, $P = 0.016$; Figure 1) than in patients with non-ischaemic aetiology, whereas fluorescent AGE, glycated albumin and glycated haemoglobin were similar in both groups (Table 1). Correction of these two parameters for plasma protein levels did not alter their observed relationships with the other parameters measured. Moreover, within the ischaemic group, plasma sRAGE levels increased according to the number of damaged vessels (Figure 2), with these differences being statistically significant.



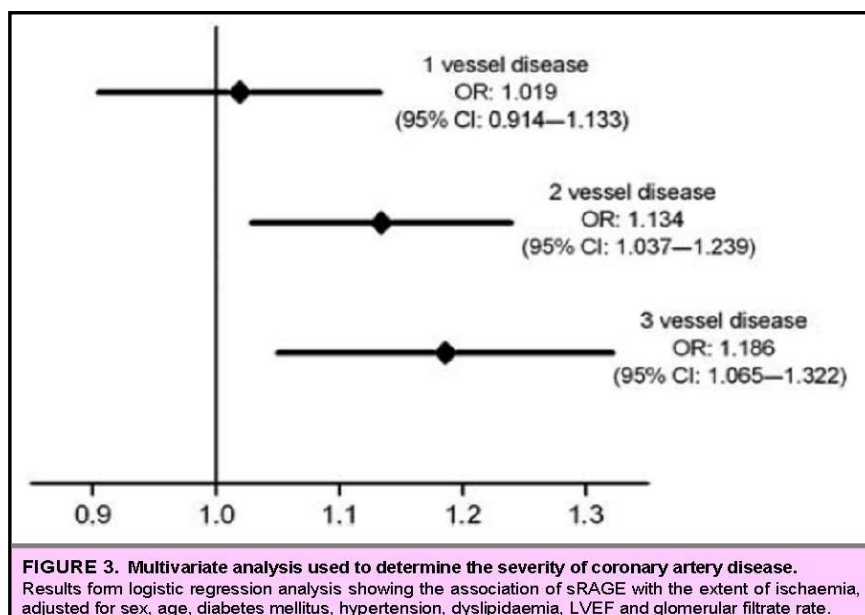


To predict ischaemic aetiology, we performed a receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. We found 986.0 pg/mL to be the cut-off value for sRAGE, with a sensitivity of 0.65 and specificity of 0.64. We then divided patients into two groups based on this sRAGE cut-off value; the high-sRAGE group comprised 46 patients and low-sRAGE 57 patients. Comparisons of clinical characteristics between these two groups are shown in Table 3. It was thus observed that patients with sRAGE levels greater than 986.0 pg/mL had a higher prevalence of ischaemic aetiology (43.5 vs. 19.3%, $P = 0.008$) and a higher number of affected coronary arteries: 32.7% of patients with sRAGE > 986.0 pg/mL had two or more damaged arteries vs. 7% with sRAGE ≤ 986.0 pg/mL, $P = 0.010$.

TABLE 3. Clinical characteristics of high and low sRAGE patients groups			
Variables	Low sRAGE (<1220 pg/mL) (n = 73)	High sRAGE (>1220 pg/mL) (n = 30)	p value
DEMOGRAPHIC FACTORS			
Age (years)	68.9 ± 1.4	71.30 ± 1.8	0.370
Sex (male/female)	67.1 % / 32.9 %	63.3 % / 36.7 %	0.712
Medium blood pressure (mmHg)	94.6 ± 1.7	93.9 ± 2.7	0.815
IMC (kg/m ²)	28.5 ± 0.6	27.4 ± 1.2	0.360
CARDIOVASCULAR RISK FACTORS			
Arterial Hypertension	65.8 %	60.0 %	0.690
Hyperlipidemia	62.5 %	56.7 %	
Diabetes mellitus	35.6 %	36.7 %	
Smokers	8.2 %	6.7 %	
Ex-smokers	34.2 %	26.7 %	
ISCHEMIC ETIOLOGY AND SEVERITY			
Ischemic	21.9 %	50.0 %	0.005
One damaged vessel	68.8 %	6.70 %	0.002
Two damaged vessels	18.8 %	53.3 %	
Three damaged vessels	12.5 %	40.0 %	
FUNCTIONAL CLASS (NYHA)			
NYHA I	17.4 %	3.3 %	0.046
NYHA II	66.7 %	63.3 %	
NYHA III	15.9 %	33.3 %	
EKG			
Rhythm (sinusal/non)	70.8 % / 29.2 %	33.3 % / 66.7 %	0.001
ECHOCARDIOGRAPHY			
Depressed LVEF	77.5 %	72.4 %	0.592
Left ventricular hipertrophy	52.5 %	44.4 %	0.322
Left ventricular dilatation	60.3 %	66.7 %	0.643
Left atrial dilatation	84.4 %	100 %	0.029
ANALITIC PARAMETERS			
Glucose (mg/dL)	116.6 ± 3.6	133.6 ± 12.0	0.185
Fructosamine (mg/dL)	248.5 ± 14.4	289.9 ± 16.9	0.106
Glycated haemoglobin (%)	6.5 ± 0.2	7.0 ± 0.3	0.178
Glycated albumin (ng/mL)	21.3 ± 1.5	21.25 ± 1.84	0.964
Fluorescent AGEs (AU)	63.1 ± 2.3	71.52 ± 3.97	0.061
Haemoglobin (g/dL)	13.5 ± 0.2	12.5 ± 0.23	0.002
Creatinine (mg/dL)	1.10 ± 0.03	1.18 ± 0.06	0.179
Estimated glomerular filtrate (ml/min)	61.51 ± 2.15	52.50 ± 2.77	0.054
Cystatine (mg/L)	0.98 ± 0.05	1.19 ± 0.10	0.020
NTproBNP > 400 pg/mL	75.4%	100%	0.009
LDL (mg/dL)	112.83 ± 3.73	108.53 ± 8.05	0.581
HDL (mg/dL)	44.63 ± 2.42	43.18 ± 3.34	0.738
Triglicerides (mg/dL)	120.01 ± 7.57	104.32 ± 10.80	0.262
TREATMENT			
B-blockers	89.0 %	80.0 %	0.224
ACE inhibitors/ARA	93.2 %	96.7 %	0.778
Espironolactone	61.6 %	70.0 %	0.422
Diuretics	79.5 %	83.3 %	0.218
Antiplatelets	46.6 %	30.0 %	0.618
Nitrates	12.2 %	26.7 %	0.075
Statins	45.2 %	50.0 %	0.658
Oral antidiabetic drugs	28.8 %	20.0 %	0.358
Insulin	6.8 %	16.7 %	0.126
Abbreviations as in Table 1			

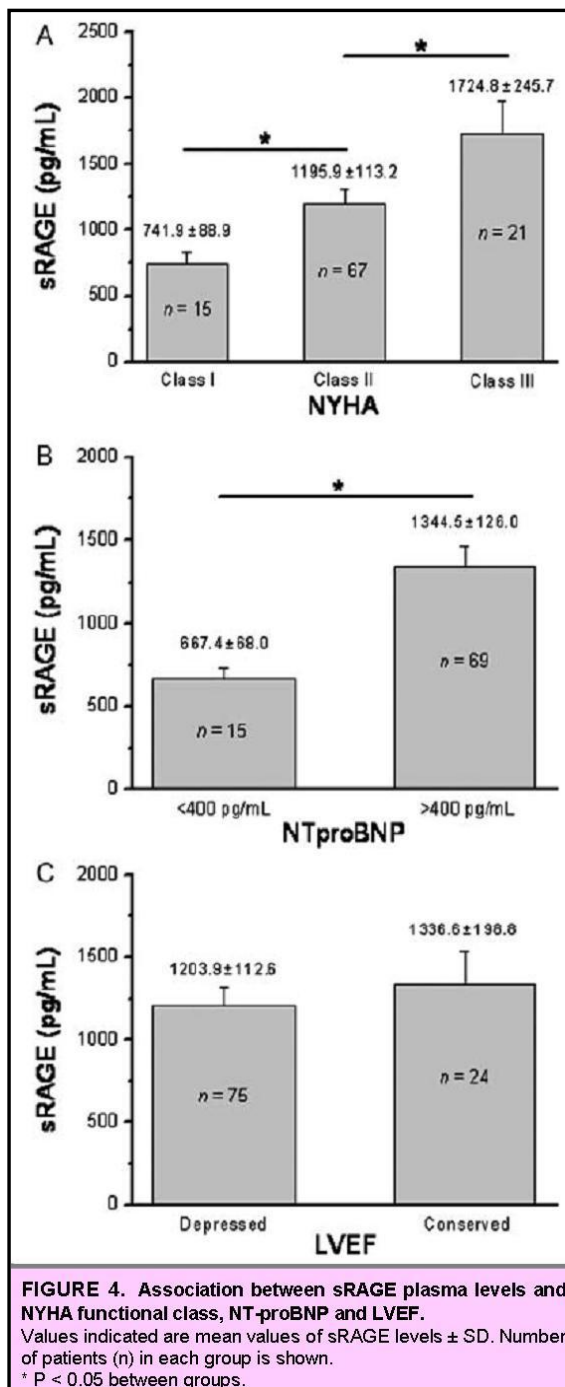
TABLE 4. Results of multivariable analysis in relation to ischemic aetiology		
Variables	OR (95% CI)	P-value
AGE (por AU)	0.997 (0.962-1.033)	0.862
sRAGE (per 100 pg/mL)	1.091 (1.032-1.153)	0.002
AGE (per decade)	1.303 (0.818-2.077)	0.265
Male sex	20.201 (3.143-129.852)	0.002
Diabetes mellitus	3.305 (1.088-10.035)	0.035
Arterial hypertension	1.440 (0.397-5.230)	0.579
Hyperlipidemia	1.989 (0.646-6.124)	0.231
LVEF < 40%	3.303 (0.912-11.970)	0.069
GFR (per 10 ml/min/1.73 m ² decrease)	0.852 (0.614-1.181)	0.335
Abbreviations as in Table 1		

In the multivariable analysis adjusted for several confounding factors (see the Statistical analysis section), sRAGE was the only variable together with male sex which was independently associated with ischaemic aetiology [odds ratio (OR): 1.091; 95% CI: 1.032–1.153; P = 0.002; Table 4] and was the only one related with the extent of coronary lesions (OR for three-vessel disease compared with non-coronary lesions: 1.186; 95% CI: 1.065–1.322; P = 0.002; Figure 3). Inclusion of protein levels as a onfounding factor did not alter the statistical significance of the multivariate analysis results.



c) Correlation between the receptor of advanced glycation end products–advanced glycation end products system and heart failure symptoms

A direct correlation was observed between sRAGE levels and NYHA functional class for dyspnoea (Figure 4). Likewise, using the cut-off point determined in the ROC analysis to predict ischaemic aetiology, we more frequently observed higher functional classes in the group of patients with sRAGE . 986.0 pg/mL (Table 3). Neither fluorescent AGE nor glycated albumin had a statistically significant association with severity of dyspnoea, although fluorescent AGE showed an increasing trend with functional class. With respect to brain natriuretic peptide (BNP), patients with values <400 pg/mL presented lower levels of fluorescent AGE and sRAGE as compared with patients with BNP 5400 pg/mL (53.71 ± 2.83 vs. 66.73 ± 2.67 AU, $P = 0.030$ for fluorescent AGE and 667.40 ± 68 vs. 1344.51 ± 126 pg/mL $P = 0.016$ for sRAGE). Finally, significant differences were not observed for sRAGE, fluorescent AGE or glycated albumin between patients with preserved or decreased LVEF (Figure 4).



Additionally, we observed that sRAGE and fluorescent AGE levels were higher in patients with atrial fibrillation as compared with those in sinus rhythm (1562.2 vs. 1051.3 pg/mL for sRAGE, $P = 0.015$ and 72.8 vs. 61.6 AU for fluorescent AGE, $P = 0.018$).

Discussion

Several conclusions may be derived from the current study. First, we have demonstrated that plasma levels of sRAGE, but not the AGEs evaluated in this study (fluorescent AGE and glycated albumin) are correlated with ischaemic heart disease in ambulatory HF patients, independently of age, sex, diabetes, renal function, clinical severity or other confounding variables. Moreover, sRAGE was directly associated with extent of coronary artery disease, but the same could not be said for the AGEs evaluated. We also confirmed the previously observed correlation between sRAGE and severity of HF, whereby sRAGE plasma levels are higher in patients with a higher NYHA dyspnoea class and/or higher BNP levels, although in the current study we did not find any significant correlation between these variables and AGE levels. We found a direct and statistically significant correlation between fluorescent AGE and glycated albumin, and a non significant tendency towards a positive correlation between fluorescent AGE and sRAGE. Finally, AGE-RAGE was significantly associated with plasma fructosamine levels, but not with other diabetes-related parameters such as glycated haemoglobin or fasting glycaemia. The current study also shows for the first time, a direct correlation between sRAGE and ischaemic cardiomyopathy as well as with the extent of coronary artery disease in HF patients, suggesting that the soluble AGE receptor could play a role in the pathophysiology of HF.

The involvement of RAGE in the initiation and progression of vascular atherosclerotic disease has been widely demonstrated in both animal and human studies^{282,284}. While cell-surface RAGE has been shown to be up-regulated and co-localized with inflammatory markers in atherosclerotic plaques¹⁷⁰, sRAGE has been found to slow progression of atherosclerosis¹⁶⁹ AGE cross-link breakers

have moreover been shown to reverse the atherosclerotic process in mice²⁴³. In a recent study of 2571 non-diabetic patients, Lindsey et al. showed by computed tomography that calcification in the coronary arteries is inversely related to plasma sRAGE levels, so that sRAGE may be considered a protective factor against atherosclerosis²⁸⁴. Similar results were obtained by Falcone et al. in 328 non-diabetic patients, in whom low sRAGE plasma levels were associated with coronary artery disease²⁸³. There are, however, other reports of a direct positive correlation between sRAGE levels and arterial coronary disease, one of which shows that in type-2 diabetic patients lower levels of sRAGE correlate with fewer angiographically documented coronary events²⁸⁹. With respect to these discrepancies it should be borne in mind that not all sRAGEs play a similar pathophysiological role in cardiovascular disease. The N-truncated form, for example, lacks the V-domain which is critical for binding of AGE and is thus unable to perform the decoy function of other types of soluble RAGE. Similarly, a study of 130 type-1 diabetic patients showed that esRAGE (the endogenous secretory form with the V-domain), but not sRAGE, levels were inversely correlated with carotid atherosclerosis (indicated from carotid intima-media thickness)²⁷⁹. Lu et al., moreover, have recently demonstrated an inverse association between esRAGE and arterial coronary disease in both non-diabetic and type-2 diabetic patients in 1320 subjects²⁸⁶. Yan et al²⁹⁰ have shown that in non-diabetic patients there is an inverse correlation between sRAGE, esRAGE and coronary artery disease, whereas in patients with diabetes mellitus an inverse correlation is only maintained between esRAGE and coronary damage, and a positive correlation appears between sRAGE and coronary disease. None of these studies, however, were carried out in patients with HF.

To date, the only study to analyse sRAGE in patients with HF is that by Koyama et al.¹⁷⁵ This prospective study of 160 patients with HF of different aetiologies followed up for 872 days, concluded that sRAGE serum levels are related to a worse prognosis of HF and to a more severe clinical condition. The study was able to determine a 1220 pg/mL cut-off point for sRAGE which was predictive with high sensitivity and specificity for the occurrence of a cardiac event in the short-middle term. These authors did not, however, take into account differences in sRAGE levels in the aetiology of HF. In the current study, we have not only confirmed the

findings of Koyama et al. with respect to the association of sRAGE with clinical severity of HF, specifically in relation to NYHA functional class and NT-proBNP levels, but we have also extended these findings to show an association between sRAGEe and coronary artery disease.

Several studies to date have concluded that esRAGE, but not other forms of sRAGE, has a protective role against coronary artery disease that is independent of other parameters. With respect to total sRAGE, however, there is some disagreement^{285,286}. Various hypotheses can explain such discrepancies. The first of these is that total sRAGE includes esRAGE and cRAGE forms, and that the latter is probably not functioning as a decoy for AGE. In ischaemic HF vascular inflammatory activity is enhanced, with the potential for increased cleavage of surface RAGE by metalloproteinases²⁹¹, and thus the cRAGE fraction. In this situation, total sRAGE levels would therefore be elevated without increasing its decoy function for AGE. On the other hand, sRAGE levels might be elevated in ischaemic HF patients as a compensatory mechanism for increased AGE production. Further investigations will be necessary to confirm this hypothesis.

We have not determined which sub-type of sRAGE was increased in our patients with ischaemic heart disease. However, based on previous studies we have assumed that it was not esRAGE, which is considered to be a protective factor and is expected to be present at low levels in patients with coronary heart disease. A biological role for this form of sRAGE (non esRAGE) remains to be elucidated, but one suggestion is that it is involved in angiogenic regulation by a mechanism independent of the classical RAGE signalling pathway^{284,291}. In our study, the association of sRAGE with ischaemic aetiology in HF was independent of AGE levels, which showed no correlation, either with coronary heart disease or with the severity of clinical HF, indicating that the role of AGEs in stable HF patients may be quite limited. Other sRAGE ligands, including inflammatory mediators such as S100, tumour necrosis factor α , and c-reactive protein, are also potential candidates for the regulation of plasma sRAGE levels in humans²⁷⁸.

An interesting additional result obtained in the present study was the relationship that both fluorescent AGE and sRAGE were found to have with atrial fibrillation.

There is increasing evidence that oxidative stress and inflammation are involved in the physiopathology of atrial fibrillation²⁹², and if AGE-sRAGE levels are considered inflammation biomarkers²⁹³, their involvement in atrial fibrillation, itself a situation of enhanced oxidative stress and inflammatory activity, is logical.

Finally, and confirming previous suggestions^{289,290}, our results demonstrate that the relationship between sRAGE levels and the ischaemic aetiology in HF is independent of diabetes, and that sRAGE levels are independent of the degree of glycaemic control in HF patients.

Limitations

It should be noted, first, that we analysed only fluorescent AGE and glycated albumin, and thus do not have any data on other AGEs that have previously been shown to be associated with clinical status and prognosis of HF, such as pentosidine and carboxymethyllysine. Second, the cross-sectional design of the current study does not allow conclusions to be drawn about causality of sRAGE in ischaemic HF; thus whether sRAGEs are a risk- or protective factor, or simply a marker, of HF remains to be established in future studies. Third, although our study sample size was sufficient for the differences observed between groups to reach statistical significance, our results will need verification in a larger study. Finally, our study was performed in ambulatory HF patients, so extrapolation of our results to patients with acute HF, would need to be supported by appropriate data collection.

Conclusions

In ambulatory HF patients, plasma sRAGE levels are correlated with ischaemic aetiology and extent of coronary artery lesions. Additionally, sRAGE constitutes a marker of clinical severity of HF, independent of AGE levels, diabetes or other confounding factors. The AGEs evaluated in this study (fluorescent AGE and

glycated albumin) are not, however, associated with coronary atherosclerotic disease, or with clinical parameters of the HF syndrome.

Future long-term prospective studies are warranted to elucidate the role of sRAGE in HF and to investigate whether modulation of the circulating levels of these receptors can modify progression of atherosclerosis and cardiovascular disease.

Evidence for a role of advanced glycation end products in atrial fibrillation

AGE-RAGE axis in atrial fibrillation

Sergio Raposeiras Roubín¹

Bruno Kostka Rodiño Janeiro²

Lilian Grigorian Shamagian^{1,3}

Ana Seoane Blanco¹

María Moure González¹

Alfonso Varela Román¹

Ezequiel Álvarez Castro²

José Ramón González-Juanatey^{1,2}

1. Cardiology Department and Coronary Unit of the Clinical Hospital of Santiago de Compostela. Spain.
2. Department of Medicine of the University of Santiago de Compostela. Spain.
3. Cardiology Department of the Hospital de Meixoeiro of Vigo. Spain.

International Journal of Cardiology (2011). Epub ahead of print

Abstract

Background: Recent studies suggested that advanced glycation end-products (AGEs) and their receptor (RAGE) interaction may be promoted by inflammation and oxidative stress. These processes could also contribute to the pathogenesis of atrial fibrillation (AF), but their roles remain poorly defined. We studied the association of AGE–RAGE axis with AF in diabetic and non-diabetic patients, since the axis appears to play a key role in the process.

Methods: Ninety-seven consecutive outpatients were included in this transversal study. Fifty-nine patients were in sinus rhythm (SR) and 38 in permanent AF. Plasma fluorescent AGEs and soluble RAGE (sRAGE) were measured and comparisons between patients with and without AF were performed. A multivariate logistic regression analysis was made to define the independent factors associated with AF.

Results: Fluorescent AGEs and sRAGE were higher in AF group (74.9 ± 25.6 vs. 61.8 ± 20.1 a.u. for fluorescent AGEs, $p=0.006$; 1714.2 ± 1105.5 vs. 996.1 ± 820.7 pg/mL for sRAGE, $p=0.001$). These differences were specially marked in non-diabetic patients. Both AGEs and sRAGE directly correlated with left atrial dimensions ($r=0.496$; $r=0.536$ for atrial area and $r=0.491$; $r=0.511$ for atrial volume, for fluorescent AGEs and sRAGE, respectively, $p<0.001$). In a multivariate analysis, fluorescent AGEs and sRAGE resulted as markers of AF independent of left atrial distension, diabetes and other confounding variables.

Conclusions: AGEs and sRAGE plasma levels were higher in patients with AF, independently of diabetes mellitus, and they positively correlated with atrial dimensions, indicating a role for the AGE–RAGE axis in the arrhythmogenic structural atrial remodelling.

KEYWORDS: Advanced glycation end products (AGEs); Soluble receptor for AGE (sRAGE); Atrial fibrillation; Oxidative stress; Left atrial remodelling.

Introduction

Atrial fibrillation (AF) is the most common cardiac rhythm disturbance²⁹⁴. The fundamental mechanisms underlying AF have been long debated. A growing body of evidence indicates that inflammation and oxidative stress contribute to the pathogenesis of AF^{295,296}, mediating atrial fibrosis²⁹⁷. Related to this, there is a controversy about the relation between AF and diabetes mellitus (DM)²⁹⁸, a chronic illness with one of the most rapidly growing incidence in the western countries population. The presence of both pathologies increases the risk of major cardiovascular events²⁹⁹. So, the understanding of this pathophysiological linkage would be essential to achieve a therapeutic risk reduction.

Non-enzymatic glycation of proteins and lipids occurs with ageing³⁰⁰, but the process is markedly accelerated in the setting of DM and oxidative stress³⁰¹. The resulting newproducts are defined as advanced glycation end-products (AGEs). The increase of AGEs level is determined fundamentally by two factors: long-standing hyperglycaemia and high degree of oxidative stress⁹⁵. Several lines of evidence have emerged recently, indicating that the interaction of AGEs with their receptor (RAGE) is an important player in the initiation and propagation of inflammatory responses³⁰². In this sense, the soluble form of RAGE (sRAGE) may reflect the activity of the AGE–RAGE axis²⁷². Infact, high levels of AGEs and sRAGE are associated with oxidative stress and inflammatory activity, and they are even implicated in atrial fibrosis in animal models³⁰³.

AGEs promote protein cross-linking which alters protein structure and function, as in the case of type I collagen and elastin in the extracellularmatrix, resulting in atrial fibrosis³⁰⁴. In addition to extracellular actions, AGE–RAGE interaction results in enhanced production of proinflammatory mediators by the activation of nuclear factor NF- κ B³⁰⁵. These findings might explain a linkage between AGE–RAGE axis and AF³⁰⁶. Another mechanism by which AGEs may contribute to AF is by the generation of reactive oxygen species (ROS)³⁰⁷ which contributes to atrial remodelling. Taken together, these observations support an important

pathophysiological role of AGE–RAGE axis in AF through inflammation, oxidative stress and atrial fibrosis.

Therefore, our purpose was to analyse the possible implication of plasmatic AGEs and sRAGE in AF and atrial remodelling, comparing patients with AF and in sinus rhythm (SR), in an attempt to study the interaction between DM and atrial remodelling. To the best of our knowledge, this is the first study to analyse the relation between AF and AGE–RAGE axis in humans.

Materials and methods

a) Study population

A total of 97 consecutive outpatients attended at the cardiology consultation of a tertiary hospital in the second semester of 2008 were included in the study under informed consent. From this population, 37% (n=36) presented hypertensive cardiomyopathy, 34% (n=33) ischemic cardiopathy, 6% (n=6) valvulopathy and 23% (n=22) were catalogued as other causes. Fifty-nine patients were in SR and 38 in permanent AF. All patients had been in a stable clinic state for at least the last 3 months at the time of the inclusion. Patients with a known tumoral disease, history of infection within 45 days, or acute and chronic inflammatory diseases were excluded from the study. We also excluded patients undergoing chronic treatment with steroid or non-steroid anti-inflammatory drugs. The whole study was approved by the Ethics Committee for Human Studies at Galicia in accordance with the 1975 Declaration of Helsinki.

b) Definitions

Permanent AF was designated if there was no indication of cardioversion or failed cardioversion. DM was defined base on the 2010 ADA diagnostic criteria⁸². Hypertension was defined as systolic/diastolic blood pressure > 140/90 mm Hg or current use of any antihypertensive medication. Dyslipidemia was defined by total cholesterol $\geq$ 220 mg/dL, triglyceride $\geq$ 150 mg/dL, HDL-cholesterol < 40 mg/dL, or

current use of antihyperlipidemic drugs. Renal failure was defined as an estimated glomerular filtrate rate (eGFR) < 60 mL/min/1.73 m². Left atrial (LA) distension was defined as LA area >20 cm² or as LA volume > 52 cm³ in women and > 58 cm³ in men. Left ventricular ejection fraction (LVEF) ≥ 50% was considered as preserved.

c) Biochemical measurements

Peripheral venous blood was collected between 8 and 10 AM after an overnight fast. Blood samples were centrifuged at 1800×g for 10min at room temperature, and plasma samples were frozen at -40°C until assayed. Basic biochemical tests were performed with Cobas Integra model 700 multichannel analyzer. eGFR was calculated using the Modification of Diet in Renal Disease equation (MDRD-4). The serum lipid levels were measured by enzymatic colorimetric test and LDL-cholesterol was calculated from Friedewald's formula. HbA1c was measured by a latex-enhanced turbidimetric immunoassay and fructosamine was measured in a photometric analyzer. Plasma sRAGE levels were determined using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kit (Quantikine; R&D systems) according to the manufacturer's protocol²⁶⁴. The intra-assay and interassay coefficients of variation were < 5% and < 8%, respectively. AGEs were measured by fluorescence according to the Munch's method¹⁰⁹. Total fluorescence AGEs were expressed as arbitrary units (a.u.).

d) Technical studies

An echocardiogram was realised in order to determine the LVEF (using Simpson's method). Measurements of LA area and volume were realised by modified Simpson's rule using apical 4 chamber and apical 2 chamber views at ventricular end-systole. The presence of coronary artery disease was determined by a coronary angiography.

e) Statistical analysis

All analyses were performed with the Statistical Package for Social Sciences version 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Continuous variables are expressed as mean ± standard deviation and categorical variables as proportions (%).

Comparisons of characteristics between individual with or without AF were performed with Student's t or Mann–Whitney U test for continuous variables and Pearson's χ^2 for categorical variables. Continuous data from more than two groups were compared with one-way ANOVA. To study the correlation between quantitative variables, Pearson's test was used. Variables statistically associated to AF in the univariate analysis and those with clinical relevance were entered into a forward stepwise logistic-regression model to identify variables independently associated with AF. A p value < 0.05 was considered as statistically significant.

Results

a) Baseline patient characteristics

The basal characteristics of patients are detailed in Table 1, on the basis of the presence or absence of AF. In AF group, subjects had a statistically significant higher prevalence of previous mitral surgery, LA distension and renal failure. AF patients showed a statistical trend to be older, and more prevalence of hypertension and preserved LVEF. Likewise, patients with AF had statistically significant higher plasma levels of fructosamine, HbA1c, fluorescent AGEs and sRAGE. With regard to pharmacotherapy, AF group received less angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEI) and angiotensin receptor blockers (ARB) ($p=0.025$) and showed a trend to be less treated with statins ($p=0.185$).

b) DM, AGEs and AF

Table 2 shows the characteristics of diabetic and non-diabetic patients with and without AF. Among the 59 patients without DM, 24 (40.7%) had AF. This group of patients, compared with those in SR, was older and presented higher proportion of hypertension, renal failure and preserved LVEF. Plasma levels of fluorescent AGEs and sRAGE were higher in non-diabetic AF group versus non-diabetic SR group, but we did not observe any statistically significant differences between these groups with respect to HbA1c or fructosamine values. Within the group of diabetic patients ($n=38$), 13 presented AF (34.2%). These patients showed higher

TABLA 1. Baseline characteristics

	Sinus Rhythm (n = 59)	Atrial fibrillation (n = 38)	p Value
Sex (female)	35.0	35.1	0.989
Age (years)	67.6 ± 12.7	71.9 ± 9.3	0.062
Body mass index (Kg/m ²)	27.9 ± 4.2	29.2 ± 4.6	0.299
Diabetes mellitus	40.7	34.2	0.522
Dyslipidemia	52.5	52.8	0.982
Hypertension	50.8	70.3	0.060
Ischemic cardiopathy	35.0	27.0	0.413
Heart rate (bpm)	75.3 ± 15.2	75.3 ± 15.5	0.993
Renal failure	25.0	64.9	0.001
LDL-cholesterol (mg/dL)	111.6 ± 30.5	110.6 ± 42.0	0.904
HDL-cholesterol (mg/dL)	45.1 ± 20.8	40.8 ± 10.9	0.288
Fructosamine (mg/dL)	235.3 ± 53.1	276.6 ± 78.5	0.020
HbA1c	6.0 ± 0.9	6.8 ± 1.6	0.009
Fluorescent AGEs (a.u.)	61.8 ± 20.1	74.9 ± 25.6	0.006
sRAGE (ng/mL)	996.1 ± 820.7	1714.2 ± 1105.5	0.001
Left atrial area (cm ²)	23.3 ± 6.2	28.9 ± 6.9	0.001
Left atrial volume (cm ³)	54.8 ± 13.6	65.4 ± 8.4	0.002
LVEF < 50 %	76.7	60.6	0.103
ACEI/ARB	96.7	83.8	0.025
Insulin	10.0	13.5	0.596
Statins	51.7	37.8	0.185

ACEI/ARB: angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers; AGEs: advanced glycation end-products; HbA1c: glycated haemoglobin; LVEF: left ventricular ejection fraction; sRAGE: soluble receptor for advanced glycation end-products.

TABLE 2. Comparison between SR and AF groups depending on the presence or absence of DM.

	NON DIABETIC			DIABETIC		
	SR (n = 35)	AF (n = 24)	p Value	SR (n = 25)	AF (n = 13)	p Value
Sex (female)	28.6	29.2	0.960	44.0	46.2	0.899
Age (years)	64.8 ± 13.6	71.7 ± 9.5	0.028	71.4 ± 10.6	72.3 ± 9.1	0.775
Body mass index (Kg/m ²)	27.8 ± 4.4	29.6 ± 5.8	0.337	28.1 ± 4.1	28.6 ± 2.9	0.668
Dyslipidemia	44.1	39.1	0.708	64.0	76.9	0.333
Hypertension	32.4	70.8	0.004	76.0	69.2	0.468
Ischemic cardiopathy	22.9	29.2	0.585	52.0	23.1	0.085
Heart rate (bpm)	73.1 ± 16.5	70.9 ± 15.0	0.614	78.3 ± 12.9	84.1 ± 13.0	0.217
Renal failure	17.1	62.5	0.001	36.0	69.2	0.050
LDL-cholesterol (mg/dL)	119.7 ± 24.9	106.2 ± 35.9	0.135	99.2 ± 34.6	120.3 ± 54.1	0.197
HDL-cholesterol (mg/dL)	49.3 ± 24.5	41.6 ± 9.9	0.121	39.0 ± 12.0	39.1 ± 13.4	0.991
HbA1c	5.6 ± 0.6	5.8 ± 0.3	0.271	6.6 ± 1.1	8.4 ± 1.6	0.001
Fructosamine (mg/dL)	206.1 ± 35.8	234.0 ± 53.9	0.088	249.1 ± 59.8	314.1 ± 69.4	0.012
Fluorescent AGEs (a.u.)	57.8 ± 20.3	72.3 ± 25.2	0.018	67.3 ± 18.9	79.6 ± 26.7	0.107
sRAGE (ng/mL)	934.9 ± 778.5	1614.7 ± 1068.5	0.011	1081.7 ± 885.5	1897.8 ± 1192.4	0.022
Left atrial area (cm ²)	21.9 ± 5.3	28.3 ± 7.3	0.001	25.2 ± 6.9	30.1 ± 6.3	0.037
Left atrial volume (cm ³)	52.0 ± 14.9	65.4 ± 8.4	0.001	56.2 ± 11.4	65.3 ± 8.8	0.017
LVEF < 50 %	85.3	60.0	0.036	65.4	61.5	0.813
ACEI/ARB	97.1	79.2	0.036	96.0	92.3	0.573
Statins	37.1	37.5	0.978	72.0	38.5	0.045

Abbreviations as in Table 1.

percentages of previous mitral valve replacement surgery, LA dilatation and chronic renal failure, being statistically less treated with statins. HbA1c and fructosamine levels were higher in the AF group. Plasma levels of fluorescent AGEs showed a strong tendency to be higher in the AF group with respect to SR patients and sRAGE levels were significantly higher in patients with AF. Although in our study there was no difference in AF incidence between diabetic and non-diabetic groups (34.2% AF vs. 40.7% AF for diabetics and non-diabetics, respectively, $p=0.522$), the AF percentage in diabetic patients with poor metabolic control ($\text{HbA1c} \geq 7.5\%$) was clearly higher than in diabetic patients with good metabolic control ($\text{HbA1c} < 7.5\%$) and higher than in non-diabetic patients (69.2% AF, 16.0% AF and 40.7% AF, respectively; $p=0.005$). Likewise, as shown in Fig. 1, the levels of fructosamine, HbA1c, fluorescent AGEs and sRAGE increased when

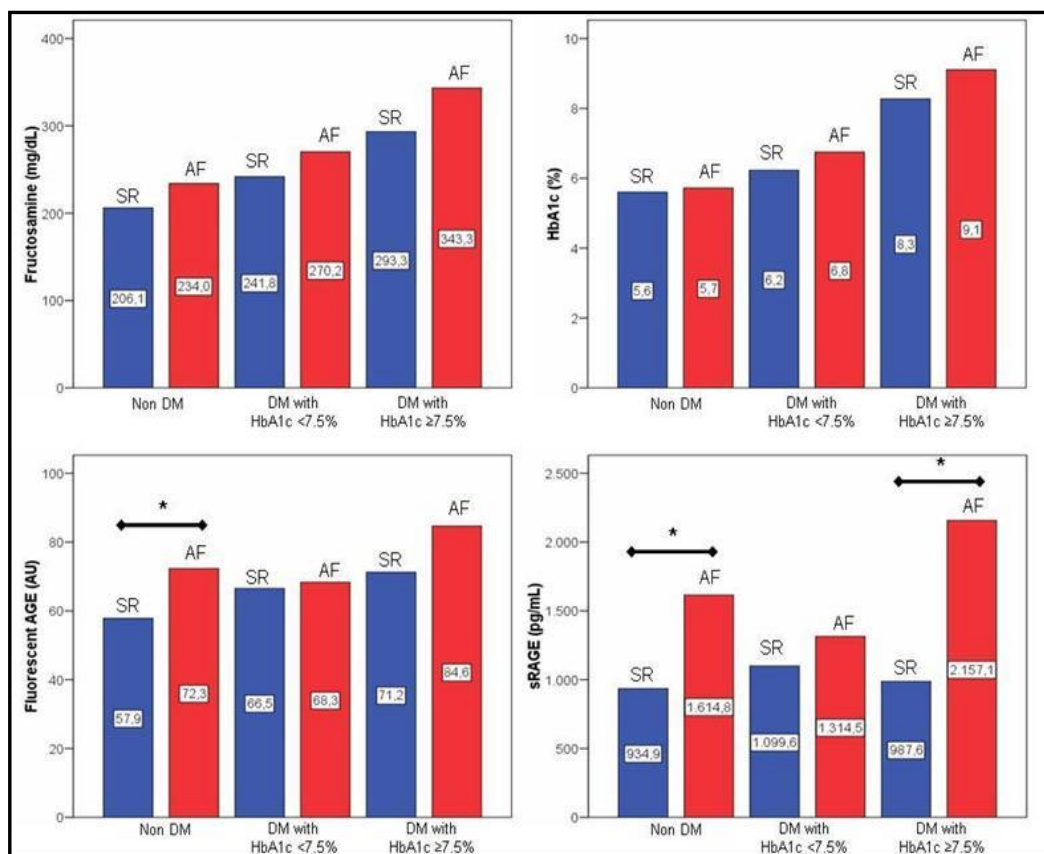


FIGURE 1. Relation between serum levels of fructosamine (A), HbA1c (B) and plasma levels of fluorescent AGEs (C) and sRAGE (D) with atrial fibrillation (AF) or sinus rhythm (SR) in non diabetic patients and in diabetic patients with optimal ($\text{HbA1c} < 7.5\%$) and poor glycaemic control ($\text{HbA1c} \geq 7.5\%$).

Columns represent mean values. *Indicates statistically significant differences ($p < 0.05$).

glycaemic control was worse, particularly in the AF groups. However, only statistically significant differences between the AF group and the SR group were found for the values of sRAGE in non-diabetic and in poorly controlled diabetic patients (Fig. 1). With regard to fluorescent AGEs values, only in the nondiabetic group statistically significant difference was found between the AF group and SR group (Fig. 1).

c) Relation between AGEs and sRAGE with other parameters of glycaemic control

Plasma levels of fluorescent AGEs correlated significantly with levels of fructosamine, HbA1c and sRAGE ($r=0.409$, $p=0.002$; $r=0.279$, $p=0.011$; $r=0.220$, $p=0.030$, respectively). The same occurred for sRAGE with fructosamine ($r=0.599$, $p=0.001$) and with HbA1c ($r=0.307$, $p=0.005$).

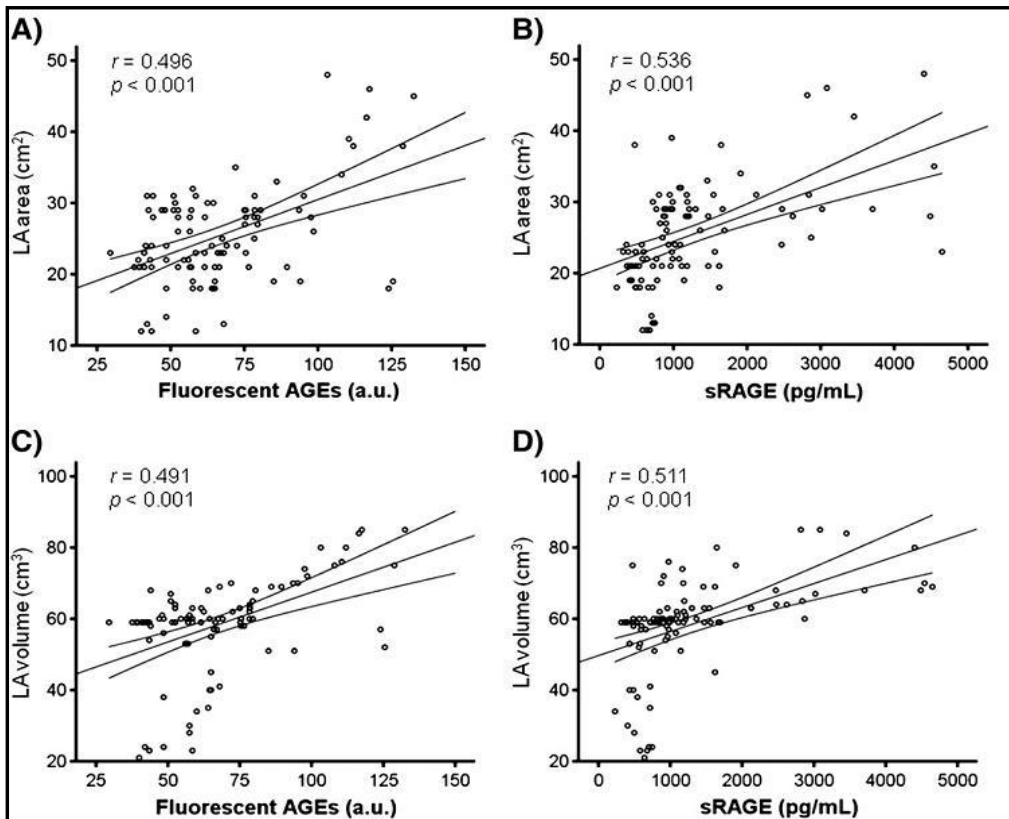


FIGURE 2. Relation between fluorescent AGEs (A, C) or sRAGE (B, D) with left atrial area (A, B) or left atrial volume (C, D).

Straight lines represent total adjustment with the confidence interval represented as curved lines. r =Pearson's correlation coefficient. Value of p is indicated in each case.

d) Relation between LA enlargement and glycaemic control

We found a positive correlation between fluorescent AGEs and sRAGE with LA area and volume (Fig. 2). Fructosamine also correlated with LA area ($r=0.383$, $p=0.010$) and LA volume ($r=0.312$, $p=0.039$), but not HbA1c ($r=0.216$, $p=0.089$ for LA area and $r=0.195$, $p=0.126$ for LA volume).

e) Multivariate analysis

A stepwise logistical regression analysis was performed with AF as dependent variable and including fluorescent AGEs, sRAGE, age (per decade), DM, hypertension, kidney failure, depressed LVEF, LA distension, ACEI/ARB and statin therapy as co-variables. From this analysis, fluorescent AGEs and sRAGE resulted as independent factors associated with AF, together with hypertension and LA (Table 3).

Table 3. Multivariate analysis			
Variable	Odds Ratio	95% CI	p value
Fluorescent AGEs (per a.u.)	1.332	1.033-1.717	0.027
sRAGE (per 100 pg/mL)	1.071	1.013-1.133	0.016
Age (per decade)	1.181	0.676-2.064	0.560
Left atrial dilatation	9.119	1.014-81.996	0.049
Hypertension	3.190	1.028-9.903	0.045
Diabetes mellitus	2.330	0.741-7.331	0.148
LVEF < 50%	0.399	0.129-1.229	0.109
Chronic renal failure	2.335	0.675-8.071	0.180
Statins	0.610	0.197-1.885	0.391
ACEI/ARB	0.682	0.072-6.467	0.739
ACEI/ARB: angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers; AGEs: advanced glycation end-products; CI: confidence interval; LVEF: left ventricular ejection fraction; sRAGE: soluble receptor for advanced glycation end-products.			

Discussion

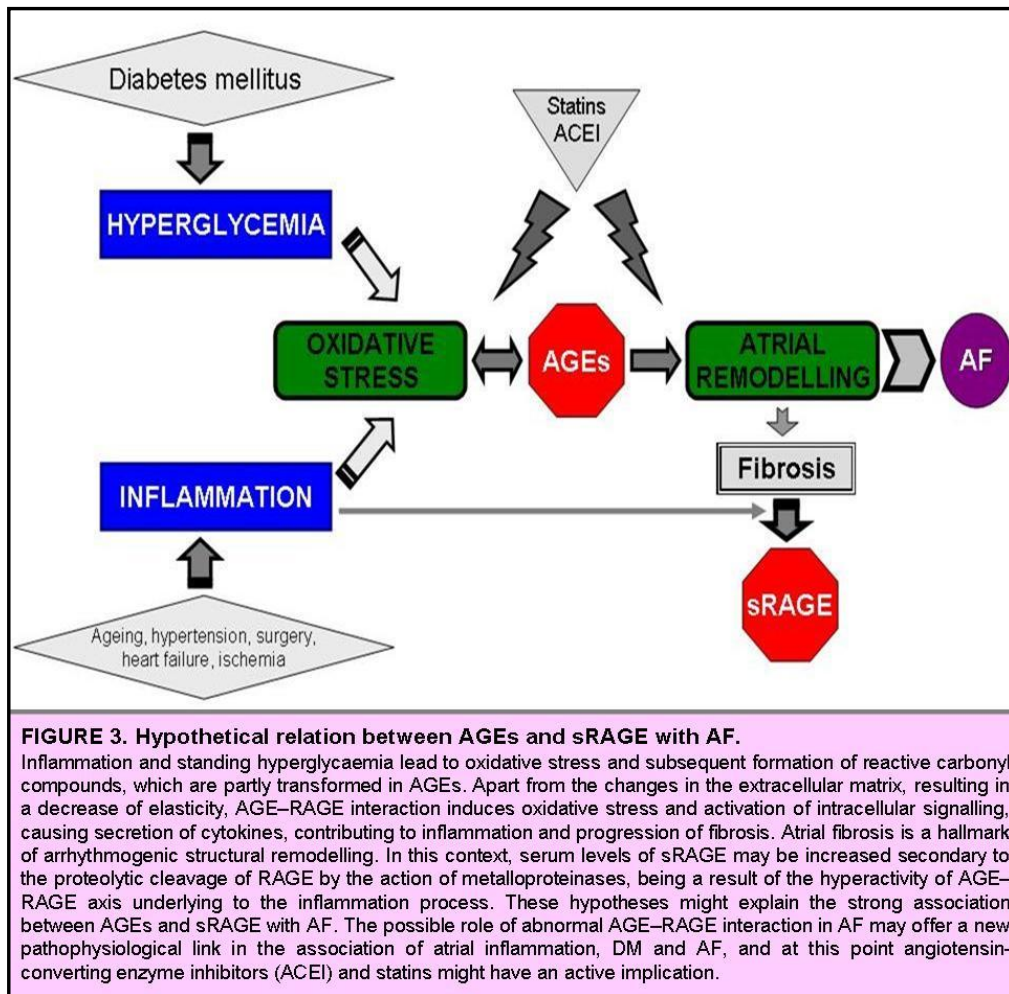
Our study is the first to demonstrate an association between AGE–RAGE axis and AF in humans. The main finding was the clear relationship observed between AGEs and sRAGE levels with the presence of AF, particularly evident in non-diabetic patients. Even more, plasma levels of fluorescent AGEs and sRAGE correlated positively with LA area and volume, and showed an independent association with AF, adjusted by the presence of DM, LA distension and other confounding variables.

There is a controversy about the relation between DM and AF²⁹⁸. From a general point of view, our study showed no relationship between DM and AF. However, this lack of association may be influenced, in the case of this study, by the good metabolic control showed in the DM group of patients: up to 2/3 had levels of HbA1c < 7%. If we focus on the group of poor metabolic control, we observed a higher prevalence of AF in comparison with non-diabetic patients.

In addition to diabetic patients, fluorescent AGEs levels were also found to be high in non-diabetic patients with cardiovascular complications⁹⁵. Formation of AGEs under non-diabetic conditions is difficult to explain. However, several studies have suggested an important role for oxidative stress and inflammation at this point³⁰². Therefore, it might be postulated that reactive oxygen species may accelerate the rate of AGEs formation through reactive oxoaldehydes, and, vice versa, AGEs might induce oxidative stress through chemical mechanisms. This can account for the increase of AGEs in non-diabetic patients (euglycaemic conditions) with AF, through inflammatory oxidation.

Our hypothesis for explaining the active role of AGE–RAGE axis in the initiation and progression of AF involves two pathways (Fig. 3). Firstly, AGEs affect the physiological properties of proteins in the extracellular matrix by creating cross-links, which alters proteins, resulting in fibrosis, tissue stiffening and loss of elasticity³⁰⁴. This fact agrees with the positive correlation between AGE and sRAGE levels with LA distension in area and volume. Secondly, the interaction of

AGEs with RAGE results in an enhanced production of pro-inflammatory cytokines³⁰⁵. This hypothesis has been previously probed in animal models³⁰³, supporting the important pathophysiological effects of AGE–RAGE interaction in AF.



Plasma levels of sRAGE may be increased secondary to the proteolytic cleavage of RAGE by the action of matrix metalloproteinases (MMP), being a result of an enhanced activity of the AGE–RAGE axis underlying to an inflammatory process³⁰⁵. Activation of AGE–RAGE axis has been shown to stimulate production of MMPs³⁰⁹, whereas enzymes such as MMP-9 are associated with the presence of AF³⁰⁹, which could have contributed to the atrial structural remodelling and atrial dilatation during AF. This fact might explain that our patients with AF showed higher plasma levels of sRAGE.

All these pathophysiological considerations would explain the association of high levels of AGEs and sRAGE with the presence of AF. In our study, fluorescent AGEs were associated with AF only in patients without DM, whereas sRAGE was associated with AF regardless of the presence or absence of DM. A possible explanation for this finding could be the fact that sRAGE in patients with AF accurately reflects a high proinflammatory state and enhanced oxidative stress at atrial level, independently of the quality of the glycaemic control. On the contrary, fluorescent AGEs levels are more influenced by the existence of high levels of glucose. Therefore, fluorescent AGEs could serve as good markers of AF in patients without DM (in whom there is no influence of hyperglycaemia) in comparison with DM patients. So, in non-diabetic patients the levels of AGEs and sRAGE are not dependent of the sustained hyperglycaemic levels being a clear reflection of the oxidative stress and inflammatory process at atrial level (Fig. 3).

Study limitations

This was the first study demonstrating a positive association between plasma sRAGE levels and AF in non diabetic patients. Although our findings are provocative, there are several limitations. 1) Our results share the limitations of cross-sectional, observational studies. We evaluated association, but not prospective prediction or causation. However, no longitudinal data of this type exist and therefore, this crosssectional study may serve as a reasonable starting point to further explore these associations. 2) The population studied was a very discrete population and therefore the present data cannot be generalised to other populations without structural and functional heart disease. 3) Despite recruiting a small number of subjects for the study; the present findings have clearly demonstrated that there is a strong correlation between AGE–RAGE axis with atrial remodelling and AF. 4) AGEs are a heterogeneous group of compounds and although fluorescent AGEs measured in this study represent most of the circulating AGEs, we were unable to distinguish which of them was the main contributing species and, if non-fluorescent AGEs also reproduce the associations observed.

Conclusion

In this study over a multivariate population with structural or functional heart disease, AGEs and sRAGE levels correlated positively with AF, indicating a role for AGE–RAGE axis in the arrhythmogenic atrial remodelling. AGEs and sRAGE levels were found to be significantly associated with AF and this was independent of DM, atrial distension and other confounding variables, suggesting that the AGE–RAGE axis can play an important role in the development of AF. Our results strongly suggest that AGEs are one of the clinically important molecules associated with AF and the inhibition of their formation might help to attenuate the development of atrial fibrosis, so they could be a new therapeutic target for the treatment of atrial structural remodelling. This early work sets the stage for future, larger investigations which will hopefully better define the biological role of AGE–RAGE axis in AF.

Productos de glicación avanzada: nuevo marcador de disfunción renal en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica

Glicación avanzada y función renal

Sergio Raposeiras Roubín¹

Bruno Kostka Rodiño Janeiro²

Lilian Grigorian Shamagian^{1,3}

María Moure González¹

Ana Seoane Blanco¹

Alfonso Varela Román¹

Ezequiel Álvarez Castro²

José Ramón González-Juanatey^{1,2}

1. Servicio de Cardiología y Unidad Coronaria del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. España.

2. Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela. España.

3 Servicio de Cardiología del Hospital Meixoeiro de Vigo. España.

Medicina Clínica (2011); 136(12):513–521

Resumen

Fundamento y objetivo: Los productos finales de glicación avanzada (AGE) están involucrados en la fisiopatología y pronóstico de la insuficiencia cardíaca (IC), acumulándose en situaciones como la insuficiencia renal (IR). El objetivo del estudio fue analizar la relación de AGE e IR en pacientes con IC crónica.

Material y método: Se incluyeron un total de 102 pacientes de forma consecutiva procedentes de la consulta de IC. Se obtuvieron datos clínicos y analíticos, con medición de hemoglobina glicada, péptido natriurético cerebral, cistatina C y AGE fluorescente, estimándose de cada paciente la tasa de filtración glomerular (TFG).

Resultados: El 40,2% de los pacientes presentaron una TFG <60 mL/min/1,73m² y el 11,7% enfermedad renal oculta. Los AGE presentaron una clara correlación positiva con la creatinina ($r=0,685$, $p<0,001$) y la cistatina C ($r=0,682$, $p<0,001$) y negativa con la TFG ($r= -0,720$, $p<0,001$). La media de AGE fluorescentes en pacientes con IR fue mayor que en aquellos sin IR (83,4 [3,3] URF vs 56,8[2,1] URF, $p<0,001$). En cuanto a su valor para el diagnóstico de enfermedad renal oculta, los AGE fluorescentes presentaron un área bajo la curva ROC superior a la de otros parámetros de IR como la cistatina C. El análisis multivariado demostró que los AGE fluorescentes son un marcador independiente de IR (OR 1,060; IC 95% 1,024-1,097; $p= 0,001$).

Conclusiones: Los AGE actúan como un marcador de IR en pacientes con IC crónica, tanto diabéticos como no diabéticos, siendo superiores a la cistatina C en la detección de enfermedad renal oculta.

PALABRAS CLAVE: Productos finales de glicación avanzada (AGE); Insuficiencia cardíaca crónica; Insuficiencia renal; Enfermedad renal oculta.

Introducción

La insuficiencia cardíaca (IC) es una de las pocas patologías cardiovasculares cuya incidencia aumenta de forma continua en los países occidentales debido al envejecimiento de la población, a una mayor supervivencia y a una mayor eficacia de la prevención primaria y secundaria³¹⁰. Asimismo en nuestro medio es la primera causa de hospitalización en pacientes mayores de 65 años². Aunque cada vez se conoce más acerca de sus bases fisiopatológicas y de su abordaje terapéutico, sigue presentando altas tasas de morbilidad²⁶. Por todo ello, constituye uno de los principales problemas de salud pública en los países occidentales.

La disfunción renal se asocia a la IC en un alto porcentaje³¹¹. Hasta en un 39% de los pacientes con IC existe algún grado de deterioro de la función renal³¹². Su prevalencia aumenta con la gravedad de la IC, la existencia de diabetes mellitus o hipertensión arterial sistémica. Además, se ha descrito como un potente factor de riesgo de mortalidad y complicaciones cardiovasculares en pacientes con IC³¹³, estableciéndose una relación directa entre el deterioro de la función renal y el peor pronóstico de pacientes con IC³¹⁴.

Los productos de glicación avanzada (advanced glycation end products - AGE) son proteínas modificadas que aparecen a nivel tisular y plasmático como consecuencia de la reacción de los monosacáridos presentes en la sangre con los aminoácidos básicos de las proteínas⁷². Los AGE se forman en situaciones de hiperglucemia mantenida y/o alto estrés oxidativo³¹⁵, eliminándose en parte por vía renal³¹⁶. Así pues, los niveles séricos de AGE aumentan con la edad, la diabetes, la insuficiencia renal, la IC o el tabaco, entre otros muchos procesos³¹⁷, y dichos productos pueden acumularse en la piel, vasos sanguíneos, sistema nervioso, corazón y riñón³¹⁸. Los AGE se han implicado en la fisiopatología de la IC⁹⁵, tanto de forma directa como indirecta, estando además demostrado que los niveles elevados de los mismos se asocian con un peor pronóstico de la IC^{248,249}. Por otra parte, también se ha descrito la correlación de los AGE con la

insuficiencia renal tanto en pacientes diabéticos como no diabéticos^{319,320}, pero se desconoce si ésta se mantiene en pacientes con IC.

Los objetivos del presente estudio fueron: 1) analizar en pacientes con IC crónica estable la asociación de los AGE con la función renal medida a través de la tasa de filtración glomerular estimada (TFG), y 2) determinar la relación de los niveles plasmáticos de los AGE con otros parámetros establecidos de función renal, valorando la capacidad que tienen dichos productos para identificar enfermedad renal oculta, en este grupo de pacientes.

Material y método

a) Pacientes

Se incluyeron consecutivamente 102 pacientes ambulatorios con IC que fueron seguidos en una consulta especializada del Servicio de Cardiología de un hospital terciario entre el último trimestre de 2008 y el segundo de 2009. Los pacientes prestaron su consentimiento informado de acuerdo con los protocolos del estudio supervisados por la Comisión de Investigación del Hospital Clínico de Santiago de Compostela, aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia y conforme a la Declaración de Helsinki. El diagnóstico de IC se estableció en base a los criterios propuestos por la Sociedad Europea de Cardiología⁶ (combinación de síntomas y signos típicos y evidencia objetiva de una anomalía estructural o funcional del corazón en reposo). Se registraron una serie de características demográfico-antropométricas y clínicas. Además, para la inclusión en el presente estudio era necesario un control analítico de sangre en ayunas, con hemograma, bioquímica básica y parámetros especiales como la hemoglobina glicada, el péptido natriurético cerebral (BNP) o la cistatina C. Junto con la analítica también se realizó un electrocardiograma y un ecocardiograma. Se excluyeron aquellos pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas, tumorales o con síndrome coronario agudo en los tres últimos meses.

b) Definiciones

Se consideró como hipertensos a aquellos pacientes con cifras de presión arterial sistólica mayor o igual a 140 mmHg y/o diastólica mayor o igual a 90 o aquellos a tratamiento con fármacos antihipertensivos. En la misma línea se consideraron dislipémicos aquellos pacientes con cifras de colesterol total mayor o igual a 200 mg/dL y/o triglicéridos mayor o igual a 150 mg/dL y/o LDL mayor de 130 mg/dL y/o HDL menor de 40 mg/dL. El diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 se realizó en base a los criterios de la American Diabetes Association (ADA) del año 2010⁸². La clase funcional en la que se encontraban los pacientes se describió utilizando la clasificación de la New York Heart Association. Por otra parte se consideró como depresión de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo cuando ésta era menor del 50%.

La función renal se ha representado a través de la TFG obtenida con la ecuación del estudio Modification of Diet in Renal Disease (MDRD-4)²⁸⁸ ($186 \times \text{creatinina sérica}^{-1,154} \times \text{edad}^{-0,203} \times 1,210$ [si raza negra] $\times 0,742$ [si mujer]). En base a ella se consideraron cuatro grupos en función de los valores de la TFG²⁶¹: (>90, 60-90, 30-60 y <30) mL/min/1,73m². El valor normal de función renal se consideró a partir de TFG ≥ 60 mL/min/1,73m²³²¹. Se definió disfunción renal cuando el paciente presentaba una creatinina $\geq 1,3$ mg/dL y/o TFG <60 mL/min/1,73 m². El diagnóstico de enfermedad renal oculta³²² se realizó en aquellos pacientes con valores de creatinina <1,3 mg/dL en hombres y <1,2 mg/dL en mujeres que presentaban una TFG <60 mL/min/1,73 m².

c) Mediciones

Las mediciones de los parámetros bioquímicos se realizaron con el analizador multicanal Cobas Integra 700 (Roche Diagnostics, Indianápolis, EE.UU.). Para la medición de la urea se utilizó el método enzimático de ureasa/GLDH y para la creatinina la reacción de Jaffe con el kit de Bayer. La medida de cistatina C se realizó mediante nefelómetro, con el kit de Dade Behring N Latex Cystatin C.

Para la medición de los AGE se recogió una muestra de sangre en un tubo con EDTA. Teniendo en cuenta la propiedad fluorescente de una determinada parte de los AGE³²³, se estimaron los niveles de AGE fluorescentes por el método de Munch et al¹⁰⁹. Este método no permite la medida de un único AGE de manera

específica, pero sirve para detectar una amplia variedad de formas diferentes de AGE, mayoritariamente procedentes de la formación de puentes entre lisinas, lo que permite valorar de una forma global la actividad de glicación avanzada en la circulación. El plasma se obtuvo por centrifugación de la muestra sanguínea. Alícuotas de este plasma de 80 μ L se colocaron en placas multipocillo oscuras y la fluorescencia (excitación 360/40: emisión 460/40) se midió por duplicado en un lector multi-modo (Synergy 2, Biotek) y se expresó como unidades relativas de fluorescencia (URF). Este método, al tratarse de una medida directa en la muestra, no emplea reactivos y por lo tanto, disponiendo del lector de fluorescencia, tiene un coste nulo.

d) Análisis estadístico

Las variables continuas se expresan como media y desviación estándar (DE). Las variables categóricas se describen a través de frecuencia absoluta y relativa. La comparación de variables continuas entre grupos de pacientes con y sin insuficiencia renal y/o enfermedad renal oculta se realizó mediante el test t-Student para variables independientes o el test no paramétrico de Mann-Whitney, según correspondiese. Para variables categóricas se empleó el test de χ^2 de Pearson. Para comparaciones de variables continuas entre más de dos grupos se empleó un análisis ANOVA. Para estudiar la correlación entre variables cuantitativas se utilizó el test de Pearson. Para calcular la sensibilidad y especificidad de AGE para predecir insuficiencia renal y/o enfermedad renal oculta se utilizaron las curvas receiver operator characteristic (ROC).

Para analizar la correlación entre los diferentes parámetros de la función renal se llevaron a cabo regresiones logísticas univariadas, tomando como respuesta los niveles de AGE y como variables explicativas los marcadores establecidos de disfunción renal. La determinación de los predictores independientes de la TFG, se realizó mediante una regresión logística binominal ajustada por todas aquellas variables significativas en el análisis univariado conjuntamente con otras, consideradas determinantes de la función renal según la evidencia científica previa. La bondad de ajuste del modelo de regresión logística fue evaluada

mediante el test de Hosmer and Lemeshow, analizándose la discriminación del modelo mediante curva ROC.

Se consideraron significativos valores de $p < 0,05$. El tratamiento estadístico de los datos se efectuó con el paquete SPSS versión 15.0 (SPSS, Chicago, EE.UU.).

Resultados

a) Características basales

En nuestro estudio se incluyeron un total de 102 pacientes, 68 hombres (66,7%), con una edad media de 69,7(1,1) años, siendo el 36% diabéticos. El resto de características demográficas, junto con el porcentaje de factores de riesgo cardiovascular, clase funcional, etiología, ritmo cardíaco, parámetros analíticos, electrocardiográficos y ecocardiográficos, así como el tratamiento, quedan reflejados en la Tabla 1. Cabe destacar que el 40,2% de los pacientes presentaban una TFG <60 mL/min/1,73m², de los cuales el 26,8% presentaban valores normales de creatinina ($<1,3$ mg/dL en hombres y $<1,2$ mg/dL en mujeres), siendo el porcentaje de enfermedad renal oculta en el total de la población del estudio del 11,7%. Así mismo un 55,5% de los pacientes presentaban valores alterados de cistatina C, considerando el punto de corte en 0,95 mg/L³²⁴.

Tal y como se puede ver en la Tabla 1, los pacientes con TFG <60 mL/min/1,73m² presentaban mayor edad, mayor número de mujeres, menor fracción de eyección del ventrículo izquierdo, mayor prevalencia de anemia, así como mayor porcentaje de tratamiento con diuréticos, digoxina e insulina y menor con inhibidores del enzima convertidor de angiotensina / antagonistas del receptor de angiotensina II (IECA/ARAI, todo ello estadísticamente significativo con respecto a la población con TFG >60 mL/min/1,73m²). La prevalencia de diabetes mellitus, hipertensión arterial e hiperlipidemia fue mayor en el grupo de individuos con TFG disminuida, aunque sin que esas diferencias alcanzaran significación estadística, de forma similar a los valores de NT-pro-BNP que fueron menores en el grupo con función

renal preservada. El resto de características basales, clínicas y terapéuticas en función de la TFG quedan reflejadas en la Tabla 1.

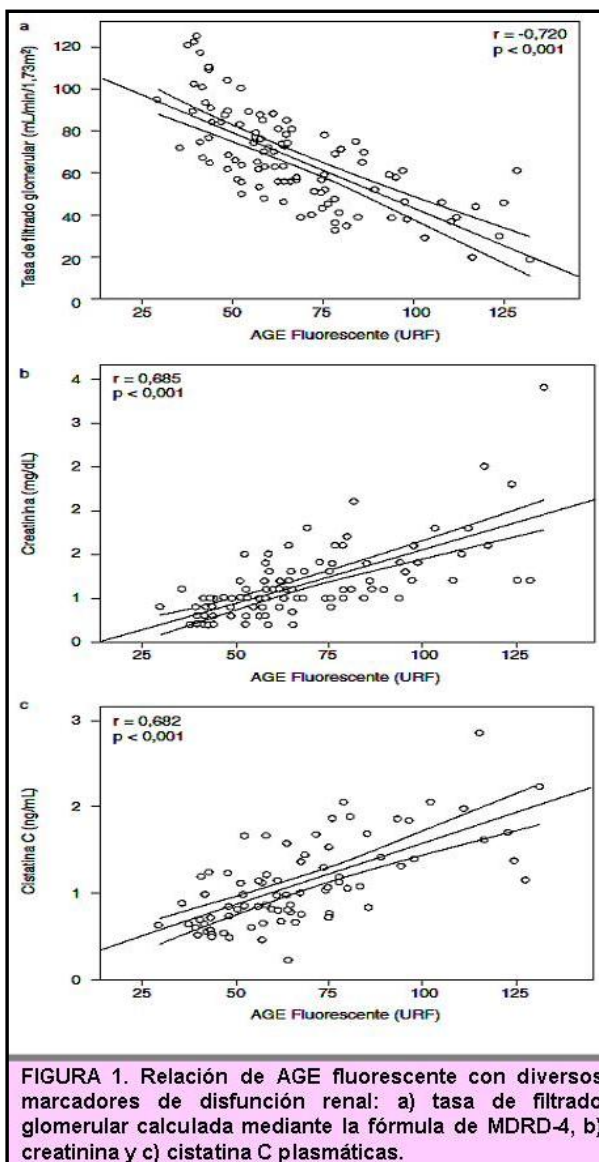
TABLA 1. Características basales

<i>Variables</i>	<i>Valores</i>	<i>TFG ≤ 60 mL/min</i>	<i>TFG > 60 mL/min</i>	<i>P</i>
Edad (años)	69,7(1,1)	75,4(1,2)	66,0(1,2)	<0,001
Sexo (hombres/mujeres)	66,7% / 33,3%	51,2% / 48,8%	78,7% / 21,3%	0,002
IMC (kg/m ²)	28,4(0,6)	29,8(0,8)	27,7(0,7)	0,066
Factores de riesgo cardiovascular				
Hipertensión arterial	58,0%	65,0%	53,3%	0,185
Hiperlipidemia	50,5%	55,0%	47,5%	0,349
Diabetes mellitus	36,0%	43,9%	30,5%	0,170
Etiología				0,907
Isquémica	34,1%	28,1%	37,5%	
Valvular	10,2%	12,5%	8,9%	
Hipertrófica	2,3%	3,1%	1,8%	
Otras	53,4%	56,3 %	51,8%	
Clase funcional				0,455
NYHA I	9,2%	3,7%	12,2%	
NYHA II	68,4%	74,1%	65,3%	
NYHA III	22,4%	22,4%	22,2%	
Ritmo cardíaco				0,062
Sinusal	59,2%	44,4%	67,3%	
Fibrilación auricular	28,9%	40,7%	22,4%	
Marcapasos	9,2%	7,4%	10,2%	
Ecocardiografía				
Fracción de eyección <50%	61,5%	48,6%	69,5%	0,041
Parámetros analíticos				
Hemoglobina (g/dL)	13,0(0,2)	12,5(0,3)	13,4(0,2)	0,007
Glucosa (mg/dL)	120,2(4,3)	118,7(5,6)	121,1(6,2)	0,689
Fructosamina (mg/dL)	265,3(13,2)	286,5(20,0)	250,6(17,8)	0,283
Hemoglobina glicada (%)	6,5(0,2)	6,8(0,4)	6,3(0,2)	0,237
Urea (mg/dL)	64,4(2,8)	86,7(4,8)	50,5(2,2)	<0,001
Creatinina (mg/dL)	1,2(0,1)	1,5(0,1)	0,9(0,1)	<0,001
Cistatina C (mg/L)	1,1(0,1)	1,5(0,1)	0,9(0,1)	<0,001
Sodio (mM)	137,8(0,3)	137,8(0,6)	137,8(0,4)	0,929
Potasio (mM)	4,5(0,1)	4,6(0,1)	4,5(0,1)	0,293
Ácido úrico (mg/dL)	7,3(0,2)	8,1(0,3)	6,8(0,2)	0,004
LDL (mg/dL)	110,0(3,8)	108,6(7,4)	110,9(4,3)	0,644
HDL (mg/dL)	43,3(1,9)	38,0(2,1)	46,2(2,7)	0,038
Triglicéridos (mg/dL)	114,6(6,4)	135,6(12,4)	102,1(6,7)	0,007
NTproBNP (pg/mL)	2674,8(355,5)	3163,9(604,2)	2416,8(439,7)	0,321
AGE fluorescentes (AU)	67,5(2,3)	83,4(3,3)	56,8(2,1)	<0,001
Tratamientos				
B-bloqueantes	84,8%	76,9%	90,5%	0,076
IECA/ARA-II	91,9%	82,1%	98,3%	0,013
Espironolactona	61,6%	57,9%	63,9%	0,390
Diuréticos	81,8%	97,4%	71,7%	0,005
Estatinas	42,4%	39,5%	44,3%	0,820
Antidiabéticos orales	25,3%	21,1%	27,9%	0,777
Insulina	10,9%	20,5%	4,8%	0,017

TFG = tasa de filtrado glomerular estimada por MDRD-4. NYHA = New York Heart Association. LDL = lipoproteínas de baja densidad. HDL = lipoproteínas de alta densidad. NTproBNP = pro-péptido natriurético cerebral N-terminal. IECA = Inhibidor del enzima convertidor de angiotensina. ARA II = Antagonista del receptor de angiotensina II.

b) Asociación entre AGE fluorescente y parámetros de función renal.

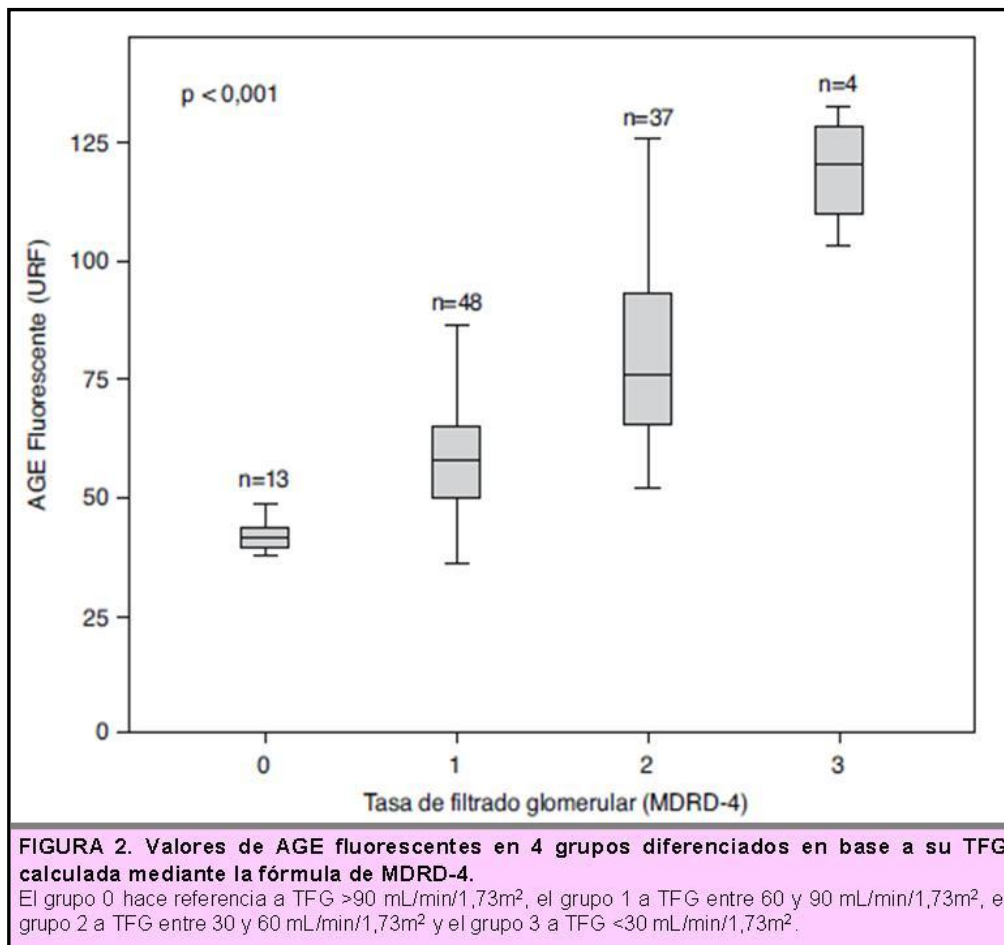
Los AGE fluorescentes presentaron una correlación positiva con los niveles de creatinina ($r=0,685$, $p<0,001$) y de cistatina C ($r=0,682$, $p<0,001$) y negativa con la TFG ($r= - 0,720$, $p<0,001$), como se refleja en la Figura 1. Además, se observó que la media de AGE fluorescentes en los pacientes con TFG <60 mL/min/1,73m² fue mayor que en aquellos sin disfunción renal, siendo estadísticamente significativa la diferencia [83,4 (3,3) RF vs 56,8 (2,1) URF, $p<0,001$]. Asimismo, estratificando a los pacientes en cuatro grupos en función de la TFG, dependiendo de si ésta es >90 mL/min/1,73m², entre 60 y 90 mL/min/1,73m², entre 30 y 90 mL/min/1,73m², o <30



mL/min/1,73m², observamos diferencias estadísticamente significativas ($p<0,001$) en los valores de AGE fluorescente entre los diferentes grupos (Figura 2).

En cuanto a su valor para el diagnóstico de disfunción renal, tal y como se puede observar en la Figura 3, los AGE fluorescentes presentaron un área bajo la curva ROC similar a la de la cistatina C. En base al análisis de la curva ROC, el punto

de corte de AGE fluorescentes para la determinación de la existencia de TFG <60 mL/min/1,73m² es de 67,0 URF. Con ese valor se obtuvo una sensibilidad del 82,1% y una especificidad del 82,7%. Comparando con el punto de corte definido para cistatina C (0,95 mg/L), se vio que este valor presentó mayor sensibilidad (92,9%) con una menor especificidad (69,2%), lo contrario que ocurrió con la creatinina (con el punto de corte de 1,3 mg/dL, la sensibilidad fue del 75,0% con una especificidad del 98,1%). Así, valorando uno a uno los distintos marcadores de disfunción renal analizados, en base a las curvas ROC para TFG <60 mL/min/1,73m², se determinó que el área bajo la curva (AUC) para los AGE fluorescentes fue de 0,846 (IC 95%: 0,761-0,932), para cistatina C de 0,852 (IC 95%: 0,759-0,945) y para creatinina 0,908 (IC 95%: 0,838-0,978). La combinación de dichos marcadores presentó un AUC de 0,947 (IC 95%: 0,902-0,992).



Aplicando el punto de corte para los AGE anteriormente citado, se observa que aquellos pacientes con niveles plasmáticos $>67,0$ URF, que representan el 40,2% de la población global del estudio, presentaban una mayor edad, mayor prevalencia de enfermedad renal oculta, mayores niveles de creatinina, cistatina C y menor TFG (Tabla 2).

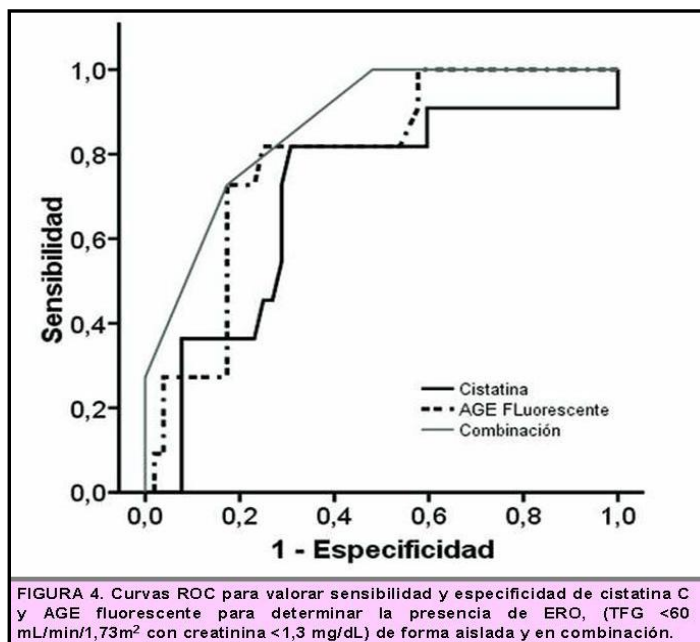
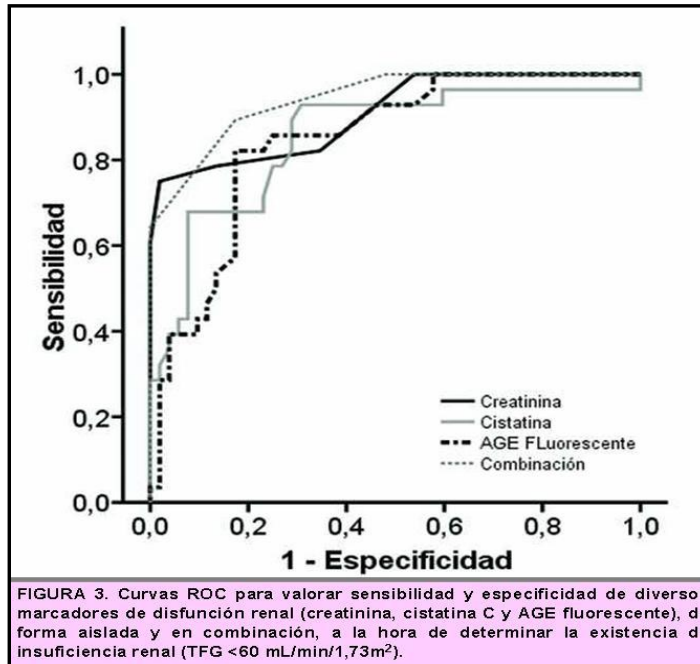


TABLA 2. Comparación entre grupos con altos y bajos niveles de AGE

Variables	AGE fluorescente <67 URF	AGE fluorescente >67 URF	p
Edad (años)	66,3(1,6)	74,8(1,2)	<0,001
Sexo femenino	26,2%	43,9%	0,063
Índice de masa corporal (kg/m ²)	28,6(0,7)	28,1(0,8)	0,628
Factores de riesgo cardiovascular			
Hipertensión arterial	52,5%	65,9%	0,185
Hiperlipidemia	46,6%	56,1%	0,349
Diabetes mellitus	30,5%	43,9%	0,170
Etiología			0,010
Isquémica	33,3%	35,3%	
Valvular	3,7%	20,6%	
Hipertrófica	0,0%	5,9%	
Otras	63,0%	38,2%	
Clase funcional			0,226
NYHA I	12,0%	3,8%	
NYHA II	62,0%	80,8%	
NYHA III	26,0%	15,4%	
Ritmo cardíaco			0,050
Sinusal	68,0%	42,3%	
Fibrilación auricular	26,0%	34,6%	
Marcapasos	6,0%	15,4%	
Ecocardiografía			
Fracción de eyección <50%	70,7%	47,4%	0,022
Parámetros analíticos			
Hemoglobina (g/dL)	13,4(0,2)	12,4(0,3)	0,003
Glucosa (mg/dL)	119,1(6,1)	121,8(5,9)	0,761
Fructosamina (mg/dL)	239,5(14,9)	293,6(21,0)	0,039
Hemoglobina glicada (%)	6,3(0,3)	6,7(0,2)	0,333
Urea (mg/dL)	51,2(2,5)	84,8(4,6)	<0,001
Creatinina (mg/dL)	0,9(0,1)	1,4(0,1)	<0,001
Cistatina C (mg/L)	0,8(0,1)	1,4(0,1)	<0,001
TFG (mL/min/1.73m ²)	78,8(2,4)	48,7(2,2)	<0,001
Ácido úrico (mg/dL)	6,8(0,2)	7,9(0,3)	0,010
LDL (mg/dL)	112,5(4,1)	106,4(7,1)	0,433
HDL (mg/dL)	47,0(2,8)	37,8(2,0)	0,018
Triglicéridos (mg/dL)	105,7(6,7)	127,6(12,2)	0,093
NTproBNP (pg/mL)	2050,6(337,8)	3639,4(714,8)	0,028
Enfermedad renal oculta	7,4%	43,8%	<0,001
Tratamientos			
B-bloqueantes	90,0%	76,9%	0,076
IECA/ARA-II	95,0%	87,2%	0,367
Espironolactona	63,3%	59,0%	0,663
Diuréticos	75,0%	92,3%	0,078
Estatinas	45,0%	38,5%	0,520
Antidiabéticos orales	23,3%	28,2%	0,123
Insulina	8,2%	15,0%	0,283

Igual que en la tabla 1

Considerando los pacientes con cifras de creatinina <1,3 mg/dL en hombres y <1,2 mg/dL en mujeres, a la hora de determinar la existencia de enfermedad renal oculta, se comprobó que los AGE fluorescentes presentaron en la curva ROC correspondiente un AUC de 0,759 (IC 95%: 0,604-0,913) frente a 0,700 (IC 95%: 0,542-0,858) de la cistatina

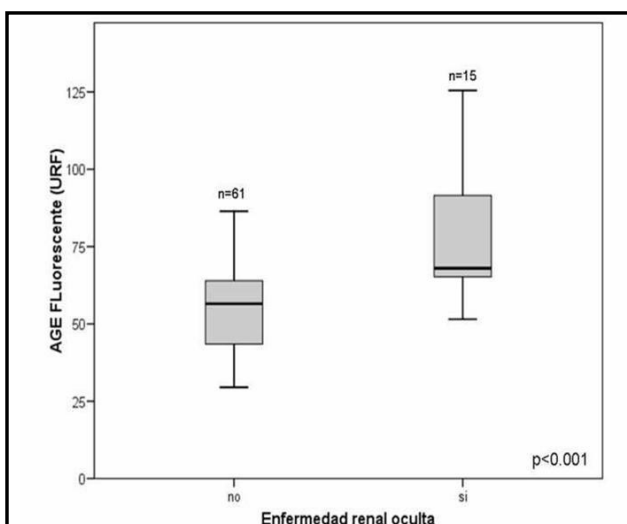


FIGURA 5. Comparación entre los valores de AGE fluorescente en individuos con y sin enfermedad renal oculta.

C y a 0,869 (IC 95%: 0,768-0,970) de la combinación de ambos (Figura 4). Tal y como se ve en la Figura 5 la media de AGE fluorescentes es significativamente mayor en el grupo de pacientes con enfermedad renal oculta (71,2(12,7) URF vs 56,5(17,0) URF, $p = 0,006$).

Por otra parte, en el estudio multivariado (Tabla 3), teniendo en cuenta las variables que habían resultado significativas con la insuficiencia renal en el estudio univariado, así como otras de relevancia clínica en relación con la función renal, se demostró que los AGE fluorescentes son un marcador de disfunción renal independiente de la edad, del sexo, de la hemoglobina, de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, de la presencia de hipertensión arterial o diabetes mellitus. La capacidad predictiva del modelo fue estimada mediante el cálculo del estadístico C, obteniéndose un valor de 0.881.

TABLA 3. Análisis multivariado		
Variables	OR (95% IC)	P
Edad	1,956 (0,975-3,926)	0,059
Sexo masculino	0,275 (0,080-0,940)	0,039
Diabetes Mellitus	0,854 (0,239-3,054)	0,808
Hipertensión arterial	1,219 (0,340-4,369)	0,761
Hiperlipidemia	1,906 (0,539-6,739)	0,317
Fracción de eyección <50%	0,341 (0,106-1,091)	0,070
Hemoglobina	0,824 (0,557-1,220)	0,335
AGE fluorescente	1,060 (1,024-1,097)	0,001

Discusión

Los resultados de este estudio indican por primera vez, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, que en pacientes con IC crónica estable los valores plasmáticos de los AGE fluorescentes se asocian de forma inversa con la función renal, siendo un marcador altamente sensible y específico de la existencia tanto de insuficiencia renal manifiesta como de enfermedad renal oculta. En la población de estudio se observa que los valores de AGE eran mayores en aquellos pacientes con menor TFG, independientemente de la edad, el sexo, diabetes mellitus, otros factores de riesgo cardiovascular y diversos marcadores clínicos de IC. Además, se ha demostrado que los AGE fluorescentes presentan una combinación de sensibilidad/especificidad para detectar la alteración de la función renal similar a la creatinina y la cistatina C. Por otra parte, en comparación con la cistatina C, este nuevo marcador parece presentar una mayor capacidad de predicción de la enfermedad renal oculta, no detectable mediante medición de los niveles de creatinina.

Aunque anteriormente ya se había hecho referencia a la posible influencia que podría tener la insuficiencia renal en el deterioro pronóstico en la IC asociado a niveles elevados de los AGE en plasma³²⁵, nuestro trabajo analiza por primera vez de forma directa la relación existente entre los AGE con la función renal en pacientes con IC crónica estable.

Cabe destacar la relevancia clínica de los resultados. Por una parte, es de especial importancia disponer de un marcador accesible en la práctica clínica diaria como son los AGE fluorescentes, con capacidad para detectar precozmente alteraciones de la función renal en pacientes con IC, con las implicaciones que ello tiene en las decisiones terapéuticas (posibilidad/limitación de uso de determinados fármacos y/o realización de pruebas diagnóstico-terapéuticas) y de estratificación del riesgo global. El método de Munch et al.¹⁰⁹ empleado en este estudio no es el único disponible para la medida de AGE. Otros métodos ampliamente utilizados se fundamentan en la detección mediante anticuerpos específicos contra modificaciones por glicación avanzada en las proteínas, tales

como la medida de carboxi-metil-lisina o pentosidina. La medida de los AGE fluorescentes no es específica de un AGE en concreto, si no que abarca una serie de modificaciones diferentes que tienen la misma propiedad fluorescente. Sin embargo, el hecho de cuantificar en la misma medida varios tipos de AGE simplifica el análisis y permite obtener una visión general del contenido en AGE del plasma. Además, el método de Munch et al.¹⁰⁹, al tratarse de una medida directa no emplea reactivos y por ello es más sencillo y económico que la medición de los niveles de creatinina o cistatina C (ver métodos en la Sección de Material y Método). Basándose en la misma propiedad autofluorescente de determinados AGE, la acumulación de éstos también se puede medir en tejidos accesibles como la piel, si se dispone del lector apropiado. Esta medida proporcionaría una información similar a la medida de AGE fluorescente en plasma, pero de proteínas con una mayor vida media.

Por otro lado, niveles más elevados de AGE se asocian de forma independiente con una peor función renal en pacientes con IC, lo que probablemente podría contribuir al peor pronóstico de la IC descrito en estudios previos en pacientes con niveles elevados de los AGE en plasma^{248,249}. Se ha descrito que los niveles de AGE se incrementan en diversos estados fisiológicos y patológicos³¹⁷. A destacar su incremento en situaciones de IC e insuficiencia renal^{248,249,319,320}. En este trabajo se estudiaron pacientes con IC crónica estable, en los que los niveles de AGE se encuentran elevados respecto a la población sana²⁸⁷. Son varios los autores que hacen referencia al valor pronóstico intrínseco de los AGE en la IC^{95,248,249}, de una forma independiente de la función renal. Cada vez existe más evidencia de que la relación entre insuficiencia renal e IC es bidireccional²⁴⁸: la insuficiencia renal acelera la progresión de la IC mientras que la IC a medida que avanza influye en el desarrollo de insuficiencia renal^{313,314}, en el contexto del llamado síndrome cardiorrenal.

En pacientes con TFG disminuida la elevación de los niveles plasmáticos de AGE es secundaria principalmente a una menor excreción renal^{97,316}. Además, en este estudio, la mayor prevalencia de edad avanzada y diabetes mellitus en pacientes con disfunción renal podrían contribuir a que los niveles de AGE sean más elevados en este grupo, a pesar de que en el análisis estadístico multivariado se

mantiene significativa la relación AGE-TFG independientemente de dichos factores. A su vez, en pacientes con niveles de AGE elevados, la edad media de los pacientes es superior y existe una mayor prevalencia de hipertensión arterial sistémica, lo cual podría explicar el mayor riesgo de insuficiencia renal por mecanismos vasculares³²⁰ secundarios a aterosclerosis o nefroangioesclerosis^{326,327}. Por tanto, los AGE podrían ser considerados como un eslabón más en el círculo vicioso del proceso patogenético del síndrome cardiorrenal, actuando no solo como marcador sino también como factor de riesgo para la disfunción renal en pacientes con IC asociada principalmente a disfunción endotelial secundaria al estrés oxidativo que inducen^{95,97}.

En este estudio comparamos AGE con otros parámetros ya establecidos de disfunción renal en pacientes con IC. Así, se observó una correlación lineal entre los niveles plasmáticos de los AGE, la creatinina y la cistatina C. En la población de estudio la potencia que presentan los AGE a la hora de detectar insuficiencia renal es similar a la de dichos parámetros de forma aislada en el total de la muestra, sin embargo la combinación de AGE con creatinina y cistatina C supone una mayor, aunque no estadísticamente significativa, área bajo la curva ROC, lo que se traduce en un aumento de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de insuficiencia renal. Por otra parte, en el grupo de pacientes en los que la TFG se encuentra disminuida y la creatinina es normal, se comprobó que los AGE constituyen un buen marcador de la existencia de disfunción renal. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que los AGE resultan un buen marcador de la existencia de enfermedad renal oculta en pacientes con IC.

Por último, otro factor a tener en cuenta a la hora de manejar el síndrome cardiorrenal es el uso de antagonistas del sistema renina-angiotensina-aldosterona en el manejo terapéutico de estos pacientes. Los resultados de nuestro estudio asociaron niveles más altos de AGE y peor función renal en el grupo con una menor tasa de prescripción de IECA / ARAII. Se ha descrito que el bloqueo del sistema renina-angiotensina-aldosterona puede interferir en la acción de los AGE modulando la expresión de sus receptores y su función^{328,329}, lo cual sin duda, constituye una justificación añadida que parece proporcionar otro elemento de juicio para la utilización razonable (siguiendo las recomendaciones

de las guías con las precauciones individuales apropiadas) de este grupo farmacológico en el manejo terapéutico de pacientes con IC e insuficiencia renal asociadas.

En base a nuestros resultados creemos que los AGE fluorescentes juegan un papel importante en la estratificación de los pacientes con IC crónica estable, permitiéndonos identificar en dicha población a pacientes con insuficiencia renal manifiesta o enfermedad renal oculta, en los cuales habría que insistir en el óptimo control de los factores de riesgo cardiovascular.

Limitaciones

En este trabajo se miden los AGE fluorescentes, que obviamente no son la totalidad de los AGE presentes en el plasma. Por tanto nuestros resultados deben interpretarse considerando dicha limitación. Al tratarse de AGE plasmáticos no tienen la potencia retrospectiva de los valores de AGE acumulados en tejidos (con mayor vida media). Si bien pueden reflejar el nivel de producción de AGE en menor plazo.

Por otra parte la población del estudio incluyó únicamente a pacientes con IC crónica seguidos en la consulta externa de IC. Es decir, pacientes estables desde el punto de vista clínico, lo que limita la extrapolación de estos resultados a la totalidad de pacientes con IC.

Aunque nuestros resultados sugieren que los AGE podrían actuar además como factor de riesgo, dicha asociación causal no se puede establecer por el diseño transversal del presente estudio.

Conclusión

Los AGE fluorescentes actúan como un marcador de disfunción renal en pacientes con IC crónica estable, tanto diabéticos como no diabéticos. Además,

presentan una gran capacidad de predicción de enfermedad renal oculta en estos pacientes, siendo similares a la cistatina C en la detección de dicha patología, aunque con un menor coste.

Sin duda, son necesarios más estudios que permitan determinar si los AGE juegan un papel causal en la patogenia de la IC y las enfermedades cardiovasculares en general y la trascendencia clínica que puede llegar a tener la modulación terapéutica de estos productos.

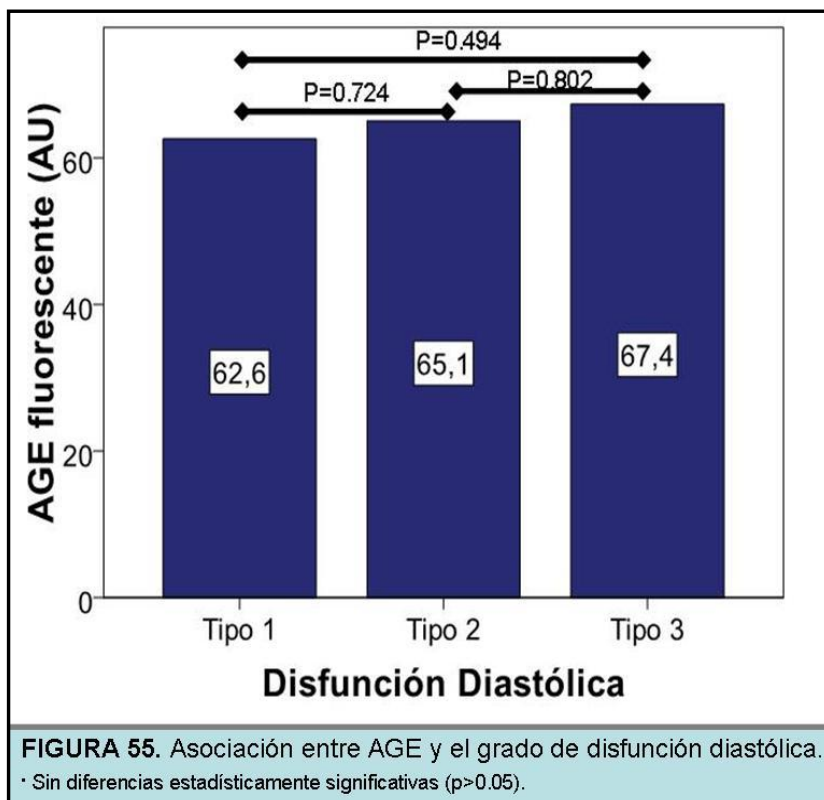
4.2. OTROS RESULTADOS

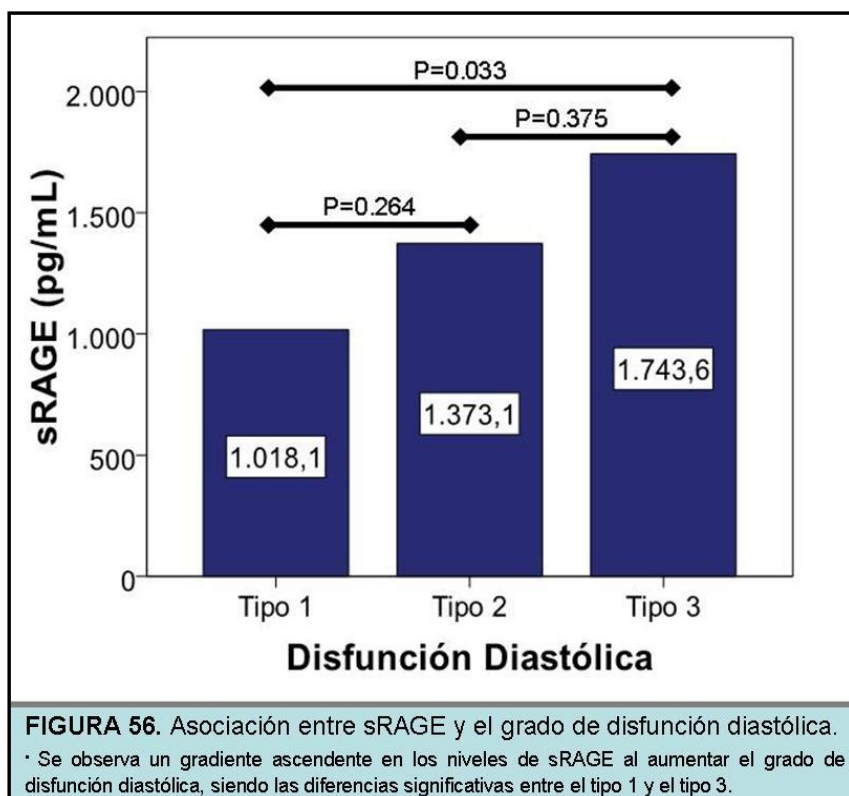
A continuación vamos a presentar otros resultados y trabajos, que aunque todavía no han sido publicados, recalcan la importancia de la glicación avanzada en la fisiopatología y etiopatogenia de la IC.

4.2.1. IMPLICACIONES DEL EJE AGE-RAGE EN LA DISFUNCIÓN DIASTOLICA.

En relación con la disfunción diastólica, se realizó una valoración entre la concentración de AGE y sRAGE con el grado de disfunción diastólica.

Como se puede ver en la siguiente figura, a medida que aumenta el grado de disfunción diastólica los niveles tanto de AGE fluorescente como del sRAGE aumentan, aunque las diferencias sólo son estadísticamente significativas en relación al sRAGE.

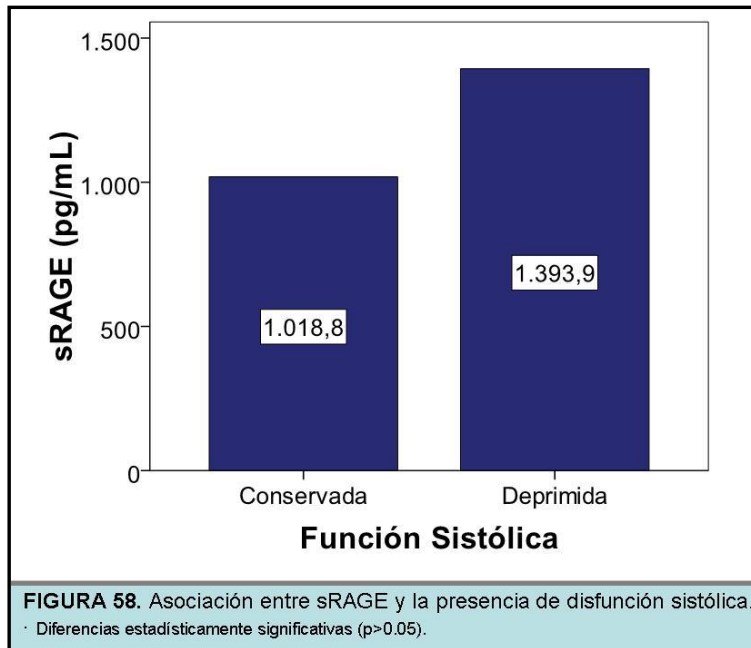
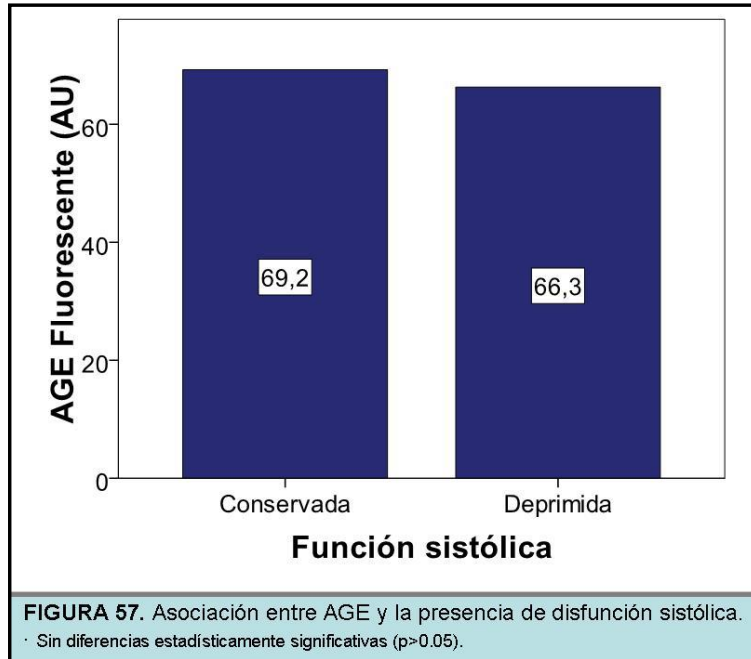




De todas formas, hay que tener en cuenta que solamente disponíamos de información sobre la función diastólica en 52 de los 108 pacientes (52.9% de valores perdidos).

4.2.2. IMPLICACIONES DEL EJE AGE-RAGE EN LA DISFUNCIÓN SISTÓLICA.

Considerando como función sistólica conservada una FEVI $\geq 45\%$, hemos observado que sRAGE pero no AGE fluorescente se asociaba con la función sistólica deprimida (1393.9 ± 1141.2 pg/mL vs 1018.0 ± 439.9 pg/mL, $p=0.016$), tal y como se muestra en las siguientes figuras.



Sobre las implicaciones de los productos de glicación avanzada en la disfunción miocárdica, se presenta un trabajo realizado en pacientes con síndrome coronario agudo, en el cual se puso de manifiesto que tras un infarto agudo de miocardio, niveles de AGE fluorescente elevados predecían de forma independiente el desarrollo de IC a corto-medio plazo.

Implicaciones clínicas de la glicación avanzada en el desarrollo de insuficiencia cardíaca post-infarto

CLINICAL IMPLICATIONS OF ADVANCED GLYCATION IN DEVELOPMENT OF POST-INFARCTION HEART FAILURE

Sergio Raposeiras Roubín^{1,2}

Bruno Kostka Rodiño Janeiro²

Beatriz Paradelo-Dobarro²

Lilian Grigorian-Shamagian³

José María García-Acuña¹

Pablo Aguiar-Souto¹

Michel Jacquet Herve¹

María Victoria Reino-Maceiras¹

Ezequiel Álvarez^{2,4}

José Ramón González-Juanatey^{1,2,4}

1. Servicio de Cardiología y Unidad Coronaria. Hospital Clínico Universitario. Santiago de Compostela.

2. Laboratorio de Investigación Cardiovascular. Instituto de Investigaciones Sanitarias de Complejo Hospitalario Universitario. Santiago de Compostela.

3. Servicio de Cardiología. Hospital Meixoeiro. Vigo.

4. Departamento de Medicina. Facultad de Medicina y Odontología. Santiago de Compostela.

En revisión

Resumen

Introducción y objetivos. Teniendo en cuenta que la insuficiencia cardiaca (IC) post-infarto condiciona una gran morbilidad, y dada las implicaciones fisiopatológicas de los productos finales de glicación avanzada (AGE) en la génesis de disfunción miocárdica, se pretendió analizar el valor pronóstico de dichas moléculas para la predicción del desarrollo de IC tras un evento coronario.

Métodos. Mediante fluorescencia, se midieron los niveles de AGE en 194 pacientes ingresados de forma consecutiva en la unidad coronaria por infarto de miocardio. En aquellos pacientes que habían sobrevivido al evento coronario, se analizó la asociación entre los parámetros glucémicos y el desarrollo de IC post-infarto. Finalmente mediante un análisis multivariado de Hazard Ratio por regresión de Cox se identificaron aquellas variables con valor predictor independiente.

Resultados. De los 194 pacientes incluidos, 11 (5,6%) desarrollaron IC durante el seguimiento (mediana: 1,0 año; RIQ: 0,8-1,5 años) . Aunque tanto la glucosa basal, como la fructosamina y la hemoglobina glicada resultaron factores predictores significativos en el análisis univariado, al ajustar por variables confusoras y AGE, perdían su significación estadística. Solamente AGE (HR 1,016, IC 95%: 1,006-1,026; $p < 0,001$), junto con NT-proBNP y la extensión del infarto (medida mediante el pico de troponina I) resultaron predictores del desarrollo de IC post-infarto, de tal forma que valores por encima de la mediana de AGE multiplicaban por 5 el riesgo de desarrollar IC durante el seguimiento.

Conclusiones. Los productos finales de glicación avanzada (AGE) son un marcador independiente de riesgo de desarrollar IC post-infarto.

PALABRAS CLAVE: Productos de Glicación Avanzada; Insuficiencia cardiaca; Infarto de Miocardio; Remodelado; Metabolismo; Glucosa; Diabetes Mellitus.

Introducción

La insuficiencia cardíaca (IC) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. Su incidencia sigue aumentando, en parte secundariamente a que cada vez más y más pacientes sobreviven a infartos de miocardio, debido a los avances en la terapéutica farmacológica y en la cardiología intervencionista³³⁰. Después de un infarto, el ventrículo se somete a una progresiva transformación fisiológica y anatómica. La dilatación ventricular izquierda, la hipertrofia excéntrica, el adelgazamiento de la pared del miocardio en la zona de la cicatriz y, finalmente, la alteración de la geometría ventricular izquierda, son aspectos que caracterizan esta transformación³³¹. Estos cambios son colectivamente conocidos como remodelado ventricular, comienzan al poco tiempo del infarto (incluso en ausencia de sintomatología) como un proceso progresivo³³² y denotan un peor pronóstico para el paciente³³³.

La explicación del remodelado ventricular pivota sobre un modelo neurohormonal, según el cual se ponen en marcha una serie de mecanismos de compensación de naturaleza hormonal y peptídica que actúan en el riñón, el sistema vascular periférico y el propio miocardio³³⁴. Hay, además, una reacción de índole inflamatorio, con liberación de citocinas, radicales libres de oxígeno y factores de crecimiento, que se activa tanto en el ámbito sistémico como tisular (miocárdico y vascular)³³⁵. Todo ello contribuye, en parte, a perpetuar la disfunción ventricular, motivo por el cual puede tener importantes implicaciones en el pronóstico³³⁶.

Estudios recientes han demostrado las implicaciones que supone la hiperglucemia en el desarrollo de IC^{337,338}, estableciendo un valor pronóstico independiente a la hemoglobina glicada (HbA1c) en la predicción del riesgo de aparición de IC, tanto en pacientes diabéticos como no diabéticos^{339,340}. La HbA1c no es más que un producto temprano de la glicación³⁴¹. Sin embargo, no hay ningún estudio realizado en humanos que demuestre las implicaciones fisiopatológicas y pronósticas de los productos de glicación avanzada (AGE: advanced glycation end products) en la IC post-infarto.

Teniendo en cuenta que los AGE incrementan su concentración sérica en estados proinflamatorios y situaciones de estrés oxidativo^{98,269,342}, y que, o bien por su interacción directa con las proteínas tales como el colágeno extracelular, o bien por su interacción con su receptor (RAGE), los AGE pueden conducir a disfunción diastólica, sistólica y vascular⁹⁵, no resulta difícil de hipotetizar que estos productos finales de glicación desempeñan un rol importante en la IC post-infarto, más que un simple marcador.

Con este trabajo pretendemos analizar el valor pronóstico de la glucemia y de los productos de glicación, tanto precoces (fructosamina y HbA1c) como tardíos (AGE), en el desarrollo de IC post-infarto.

Métodos

a) Población de estudio. Se trata de un estudio prospectivo y unicéntrico, que englobó de forma consecutiva a todos los pacientes ingresados con infarto agudo de miocardio (en base a la definición universal de infarto³⁴³) en la unidad coronaria de nuestro centro entre octubre de 2009 y enero de 2011, y que habían sobrevivido al evento coronario durante la fase intrahospitalaria. Los criterios de exclusión abarcaban la presencia de embarazo, antecedentes de IC, miocardiopatías, valvulopatías de grado moderado-severo y cardiopatía isquémica previa, enfermedad arterial periférica, accidente cerebrovasculares en el pasado, disfunción renal en el momento del ingreso (definida por TFG según MDRD-4 < 60 ml/min/1.73 m²), disfunción hepática crónica, enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias crónicas, proceso infecciosos recientes (últimas 3 semanas) así como tratamiento reciente (últimas 3 semanas) con corticoides o antiinflamatorios no esteroideos, procesos tumorales conocidos en el momento de la inclusión en el estudio, alteraciones hematológicas e ingresos hospitalarios en el último mes (de índole quirúrgico y/o médico). En total, 194 pacientes fueron incluidos en el estudio. Todo el estudio fue llevado a cabo bajo los estándares éticos propuestos en la Declaración de Helsinki y aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico de Santiago de Compostela.

b) Protocolo de actuación. En todos los pacientes se realizó la sistemática de estudio habitual en nuestro centro que incluye: historia clínica completa, hemograma, bioquímica sérica y ecocardiograma en las primeras 24 horas. El diagnóstico de diabetes mellitus (DM) se basó en los últimos criterios diagnósticos de la American Diabetes Association⁸², y se consideró como disfunción sistólica la presencia de una fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) menor o igual al 45%. La estrategia terapéutica a seguir en cada paciente así como su tratamiento farmacológico se pautó de acuerdo a las directrices de la Guías de Práctica Clínica publicadas por la Sociedad Europea de Cardiología^{344,345}, siempre según el criterio clínico de los médicos cardiólogos que se encargaron de la asistencia de los pacientes en la unidad coronaria.

c) Parámetros de laboratorio. Para la medición de AGE, previa información al paciente y/o familiares y obtención del consentimiento informado, se procedió a recoger una muestra sanguínea mediante venopunción del antebrazo, extrayéndose un volumen total de sangre de aproximadamente 6 ml (2 tubos con ácido etilendiaminotetraacético, EDTA, del inglés Ethylene-Diamine-Tetraacetic Acid), para la medición de AGE. Esas muestras fueron centrifugadas a 1800 revoluciones por minuto durante 10 minutos, a temperatura ambiente, y posteriormente fueron congeladas a -40°C hasta que se procedió al análisis. Los AGE se midieron por espectrometría de fluorescencia (método de Munch¹⁰⁹), teniendo en cuenta la propiedad fluorescente de los AGE, que emiten fluorescencia intensa a 460 nm tras ser sometidos a una fuente de excitación a 360 nm). Para ello se utilizaron muestras de plasma de 80 µL en placas multipocillo oscuras, midiéndose la fluorescencia por duplicado en un lector multimodo (Synergy 2, Biotek), con un coeficiente de variación inferior al 8%. Los resultados de estas mediciones se expresaron en unidades arbitrarias de fluorescencia (AU: arbitrary units). Los AGE se midieron en la totalidad de la muestra. La hemoglobina glicada (Hb A1c) se determinó por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC: High-performance Liquid Chromatography) usando los analizadores automáticos HA-8121 y HA-8140 del grupo Menarini (Menarini Diagnostics, Reino Unido) con un coeficiente de variación < 1,6%. En 25 pacientes (12,8%) no se disponía de información acerca de los valores de HbA1c.

La fructosamina se midió mediante el método enzimático GlyPro (con kits de Genzyme), usando el analizador Cobas Mira (Roche Diagnostics, Indianápolis, Estados Unidos). En 53 pacientes (27,3%) no se pudo disponer del valor de fructosamina. El NT-proBNP (fracción amino terminal del Péptido Natriurético Cerebral) se midió mediante el método de ELISA de la casa comercial Roche Diagnostics (Indianápolis, Estados Unidos). 40 pacientes (20,6%) carecían de su valor. La troponina I cardíaca fue determinada usando un kit ultrasensible de tercera generación. Las mediciones de los parámetros bioquímicos básicos restantes se realizaron con el analizador multicanal Cobas Integra 700 (Roche Diagnostics, Indianápolis, Estados Unidos).

d) Seguimiento y eventos. Los pacientes fueron seguidos durante una mediana de tiempo de 367,5 días (301,8-530,5). Cada paciente se reevaluó cada 3 meses, aproximadamente. La información sobre la presencia de eventos durante el seguimiento se obtuvo de las revisiones clínicas, así como del programa de asistencia sanitaria IANUS y en ocasiones por vía telefónica. Durante el seguimiento, 4 pacientes (2.1%) fallecieron. Se definió como objetivo primario el desarrollo de insuficiencia cardíaca (comprobada mediante ingreso hospitalario) tras el alta post-infarto.

e) Análisis estadístico. Para la recogida tanto de los datos clínicos como de los datos de laboratorio en cada paciente, se utilizó un cuaderno de recogida de datos, así como una base de datos en Microsoft Access 2007. Para el análisis de los datos se utilizó el programa SPSS (SPSS Inc, Chicago, Illinois, versión 17.0). Las variables categóricas se expresaron mediante frecuencias y porcentajes. En relación con las variables continuas, la asunción de normalidad se comprobó con el test de Kolmogorov-Smirnov. Las variables que seguían una distribución normal se expresaron como media $\pm$ desviación típica. Las restantes se expresaron como mediana y rango intercuartílico. La asociación entre variables categóricas se comprobó mediante el test de chi-cuadrado, la relación entre variables cuantitativas se determinó mediante la correlación de Pearson y para la comparación de variables cuantitativas con categóricas dicotómicas se llevó a cabo el “t-test” de Student (cuando cumplían la condición de normalidad) o el test no paramétrico de la “U” de Mann-Whitney (cuando no la cumplían). Para estudiar

el poder discriminativo independiente de las diferentes variables a la hora de predecir IC post-infarto, se realizó un análisis multivariado de Hazard Ratio (HR) por regresión de Cox. Para tal análisis, se construyeron modelos de regresión donde se incluyeron aquellas variables estadísticamente significativas en el análisis univariado, junto con aquellas que se consideraron clínicamente relevantes, obteniéndose las curvas de desarrollo de IC post-infarto ajustadas a las variables confusoras. Se consideraron como significativas diferencias encontradas con una probabilidad de error menor o igual a un 5% ($p \leq 0,05$).

Resultados

a) Características basales y consideraciones clínicas

En la tabla 1 se resumen las características demográficas, clínicas y analíticas de los pacientes, así como su manejo terapéutico, estratificándose en dos grupos, en función del desarrollo de IC durante el seguimiento. Como se puede observar, los pacientes que desarrollaron IC post-infarto en el momento del ingreso tenían peor clase funcional Killip, mayor frecuencia cardíaca, mayor daño miocárdico expresado como un pico de troponina I más alto así como mayor disfunción ventricular sistólica, niveles más bajos de hemoglobina y concentración sérica mayor de NT-proBNP así como de los parámetros de control glucémico (a pesar de no haber diferencias en función de la presencia o no de DM). En cuanto al manejo no había diferencias significativas en temas de intervencionismo coronario percutáneo o cirugía de revascularización coronaria. La terapia farmacológica fue similar en ambos grupos, con la diferencia que los antialdosterónicos se emplearon más en el grupo de pacientes con IC post-infarto, secundario a la existencia de mayor disfunción ventricular sistólica.

b) Significado clínico de los parámetros de glicación

La glucosa, la fructosamina y la HbA1c estaban fuertemente interrelacionadas entre sí. Sin embargo, AGE fluorescente únicamente se correlacionaba de forma significativa con la fructosamina ($r=0,169$; $p=0,045$), no con la HbA1c (a pesar de

CAPÍTULO IV

mostrar una tendencia a una débil asociación positiva, con $r=0,144$; $p=0,061$) ni con la glucosa ($r=0,108$; $p=0,136$).

TABLA 1. Características basales

	Total	Insuficiencia cardíaca		
		SI	NO	p
Datos demográficos				
Edad (años)	62,8 ± 13,3	67,4 ± 11,6	62,6 ± 13,4	0,244
Sexo femenino, %	24,7	27,3	35,0	0,841
Historia médica				
IMC (Kg/m ²)	27,0±3,3	25,7±3,9	27,1±3,5	0,225
Tabaquismo activo, %	34,5	27,3	35,0	0,703
Diabetes, %	26,8	36,4	26,2	0,461
Hipertensión, %	47,9	63,6	47,0	0,283
Dislipemia, %	44,8	45,5	44,7	0,957
Datos del ingreso				
IAM-CEST, %	52,1	72,7	50,8	0,158
Clase Killip ≥ II, %	13,9	36,4	12,6	0,027
TAS (mmHg)	137,0 ± 26,4	135,8 ± 25,7	137.1 ± 26,5	0,881
Frecuencia cardíaca (bpm)	75,2 ± 18,8	93,8 ± 16,4	74,1 ± 18,4	0,001
Fibrilación auricular, %	8,2	18,2	7,7	0,217
Hemoglobina (g/dL)	14,3 ± 1,6	13,1 ± 1,5	14,4 ± 1,6	0,011
Leucocitos (/mL)	9,8 ± 4,0	9,6 ± 4,1	10,9 ± 4,0	0,314
Creatinina (mg/dL)	0,95 ± 0,15	0,99 ± 0,12	0,95 ± 0,16	0,396
Biomarcadores				
Pico de troponina I (ng/dL)	17,1 (5,6-68,2)	114,7 (23,5-171,5)	15,3 (5,2-59,4)	0.024
NT-proBNP (pg/mL)	801,5 (352,7-1779,3)	2938,0 (1400,0-3655,0)	769,5 (320,5-1663,2)	0.011
Productos de glicación				
Glucosa (mg/dL)	152,9 ± 74,1	203,0± 96,7	149,9 ± 71,7	0,021
Fructosamina (mg/dL)	192,4 ± 71,5	243,5 ± 95,3	188,5 ± 68,2	0,019
HbA1c (%)	6,2 ± 1,4	7,1 ± 2,3	6,1 ± 1,3	0,017
AGE fluorescente (AU)	57,3 ± 45,0	95,9 ± 83,1	54,9 ± 40,9	0,003
Procedimientos				
FEVI ≤ 45%, %	19,6	54,5	17,5	0,003
Enfermedad multivaso, %	52,1	63,6	51,4	0,429
ICP, %	82,0	72,7	82,5	0,412
CABG, %	5,7	9,1	5,5	0,617
Revascularización completa, %	80,2	37,5	82,3	0,002
Tratamiento médico				
Ácido acetil-salicílico	100,0	100,0	100,0	-
Clopidogrel	99,0	98,9	100,0	0,722
AntiIIb-IIIa	19,1	9,1	19,7	0,386
B-bloqueantes	86,1	90,8	85,8	0,634
IECA-ARA/II	89,7	89,6	90,9	0,767
Anitaldosterónicos	20,1	63,6	17,5	<0,001
Estatinas	94,9	90,0	95,2	0,463
Insulina	5,7	18,2	4,9	0,065
Antidiabéticos orales	11,8	20,0	11,3	0,408

b) Significado clínico de los parámetros de glicación

La glucosa, la fructosamina y la HbA1c estaban fuertemente interrelacionadas entre sí. Sin embargo, AGE fluorescente únicamente se correlacionaba de forma significativa con la fructosamina ($r=0,169$; $p=0,045$), no con la HbA1c (a pesar de mostrar una tendencia a una débil asociación positiva, con $r=0,144$; $p=0,061$) ni con la glucosa ($r=0,108$; $p=0,136$).

En cuanto a su relación con la DM (tabla 2), todos los parámetros se encontraban elevados en los pacientes diabéticos de forma significativa, salvo los AGE fluorescentes, cuyos valores no diferían de los encontrados en pacientes no diabéticos.

TABLA 2. Parámetros de glicación					
	Diabetes	N	Media	Desviación típica	P
Glucosa (mg/dL)	SI	52	204,6	95,9	<0,001
	NO	142	134,0	53,2	
Fructosamina (mg/dL)	SI	40	254,9	85,4	<0,001
	NO	101	167,6	46,1	
HbA1c (%)	SI	48	7,2	1,8	<0,001
	NO	121	5,6	0,8	
AGE (AU)	SI	52	67,3	60,8	0,132
	NO	142	53,5	37,1	

En la tabla 3 se agrupan a los pacientes en función de altos y bajos niveles de productos de glicación precoces (HbA1c) y tardíos (AGE fluorescente), tomando como punto de corte la mediana. Se vio que los pacientes con altos niveles de HbA1c presentaban un mayor perfil de riesgo cardiovascular (en el sentido de mayor edad, mayor IMC y mayor porcentaje de DM, hipertensión arterial y dislipemia), lo que se traducía en una mayor porcentaje de enfermedad multivaso, con una tendencia a mayor porcentaje de fibrilación auricular y clase funcional Killip más elevada al ingreso. Frente a ello, niveles elevados de AGE fluorescente solamente se asociaron a un mayor porcentaje de hipertensión, con una tendencia a menor tasa de infarto con elevación del segmento ST, sin

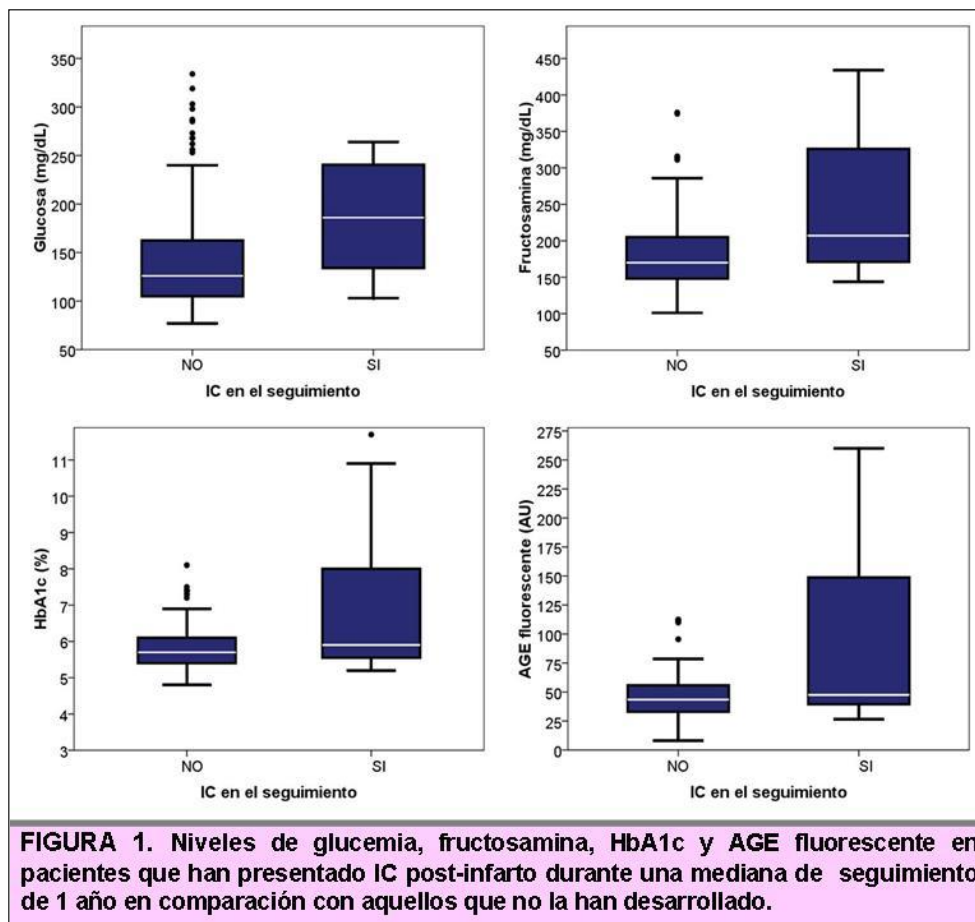
relacionarse con la DM, ni con la enfermedad multivaso, ni con la disfunción ventricular.

TABLA 3. Caracterización de la población de estudio en función de los niveles de AGE y HbA1c

	AGE		p	HbA1c		p
	ALTO	BAJO		ALTO	BAJO	
Datos demográficos						
Edad (años)	62,7 ± 14,7	62,9 ± 11,7	0,913	67,5 ± 12,5	58,1 ± 12,7	0,001
Sexo femenino, %	22,9	26,5	0,560	28,9	21,5	0,272
Historia médica						
IMC (Kg/m ²)	27,1 ± 3,6	26,9 ± 3,6	0,839	27,6 ± 4,0	26,2 ± 3,0	0,020
Tabaquismo activo, %	39,6	29,6	0,290	24,4	39,2	0,116
Diabetes, %	28,1	25,5	0,681	43,3	11,4	0,001
Hipertensión, %	55,2	40,8	0,045	60,0	35,4	0,001
Dislipemia, %	51,0	38,0	0,086	51,1	32,9	0,017
Datos del ingreso						
IAM-CEST, %	45,8	58,2	0,086	48,9	53,2	0,579
Clase Killip ≥ II, %	11,5	16,3	0,327	18,9	8,9	0,062
TAS (mmHg)	137,9 ± 25,1	136,0 ± 27,8	0,603	141,2 ± 29,2	133,3 ± 22,2	0,050
Frecuencia cardíaca (lpm)	74,7 ± 18,3	75,7 ± 19,4	0,714	78,1 ± 19,8	72,2 ± 16,0	0,035
Fibrilación auricular, %	7,3	9,2	0,632	13,3	5,1	0,067
Hemoglobina (g/dL)	14,3 ± 1,8	14,4 ± 1,4	0,829	14,1 ± 1,7	14,5 ± 1,4	0,104
Leucocitos (/mL)	10,6 ± 3,8	10,9 ± 4,1	0,622	10,5 ± 3,8	10,9 ± 4,1	0,453
Creatinina (mg/dL)	0,97 ± 0,15	0,93 ± 0,17	0,126	0,96 ± 0,15	0,94 ± 0,16	0,418
Biomarcadores						
Troponina I (ng/dL)	13,9 (6,4-70,1)	22,2 (4,5-69,4)	0,700	17,3 (6,2-85,6)	17,0 (5,1-63,2)	0,649
NT-proBNP (pg/mL)	783,0 (342,0-1712,7)	826,0 (376,5-1780,7)	0,348	1173,0 (450,2-2376,5)	568,5 (225,8-1235,2)	0,128
Procedimientos						
FEVI ≤ 45%, %	15,6	23,5	0,169	23,3	15,2	0,183
Enfermedad multivaso, %	58,3	45,9	0,084	61,1	39,2	0,005

c) Parámetros de glicación y su asociación con la IC post-infarto

En la figura 1 se observa como tanto la glucemia al ingreso, como la fructosamina, HbA1c y AGE, se asociaron de forma significativa con el desarrollo de IC durante el seguimiento.

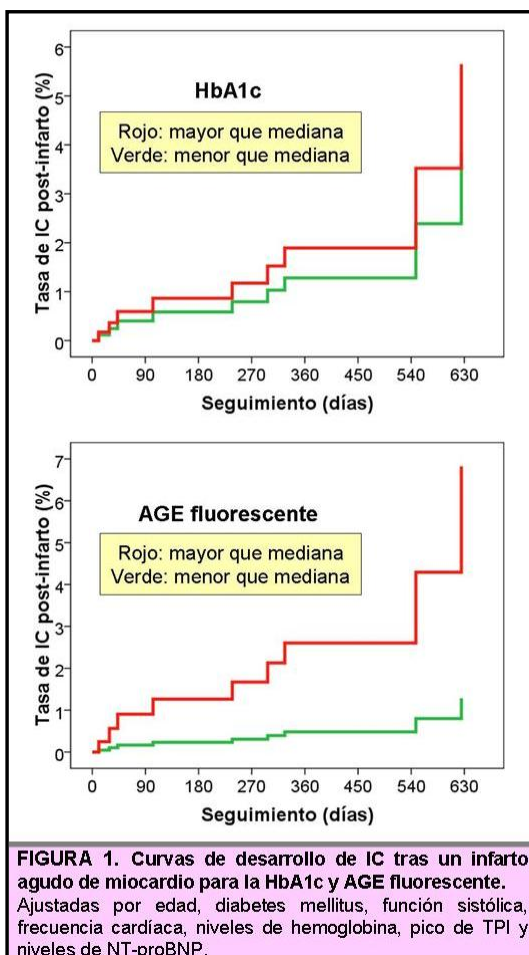


Teniendo en cuenta aquellas variables que se asociaron de forma significativa con el desarrollo de IC post-infarto (tabla 1), y incluyendo aquellas otras que sin presentar significación estadística si poseían significación clínica documentada en estudios previos (GISSI³³⁰ y PEACE³⁴⁶), se realizó un análisis multivariado, con el fin de determinar el carácter predictor independiente de cada uno de los parámetros de control glucémico (tabla 4). Como se puede observar, el pico de troponina I, los niveles de NT-proBNP y AGE fluorescente fueron las únicas variables que persistieron como predictores independientes del desarrollo de IC post-infarto. La HbA1c, tras ajustar por la presencia de DM y por los AGE, entre

TABLA 4. Análisis multivariado

Variables	Hazard Ratio	IC 95%	p
Edad (años)	1,046	0,964 – 1,135	0,284
Diabetes mellitus	0,526	0,053 – 5,267	0,585
Frecuencia cardiaca (lpm)	1,012	0,971 – 1,054	0,572
FEVI $\leq$ 45%	1,643	0,251 – 10,758	0,605
Hb al ingreso (g/dL)	0,957	0,564 – 1,624	0,871
Pico de troponina I (ng/dL)	1,006	1,001 – 1,011	0,025
NTproBNP (por 100 pg/mL)	1,030	1,006 – 1,054	0,015
HbA1c (%)	1,153	0,679 – 1,955	0,598
AGE fluorescente (AU)	1,016	1,007 – 1,026	0,001

otras variables, perdía su carácter predictivo. Así mismo se desarrollaron dos modelos alternativos del mismo análisis multivariado en donde se sustituyó en uno la HbA1c por fructosamina y en otro por la glucemia al ingreso (se decidió separar de dicha forma para evitar la interacción entre ambas dichas variables y la HbA1c, dada la fuerte correlación positiva que mostraron). Los resultados fueron iguales a los obtenidos con HbA1c, persistiendo AGE fluorescente, junto con el pico de troponina I y el NT-proBNP, como únicos marcadores independientes del desarrollo de IC. La HR ratio de la fructosamina fue de 1,007 (IC 95%: 0,989-1,025; p=0,440) y de la



glucosa basal 1,003 (IC 95%: 0,991-1,014; $p=0,666$). En la figura 2 se pueden observar las curvas ajustadas del desarrollo de IC durante el seguimiento para valores de AGE y HbA1c por encima de la mediana. Como se puede observar, niveles elevados de AGE pero no niveles elevados de HbA1c predecían el desarrollo de IC post-infarto (HR 5,467, IC 95%: 1,015-29,443; $p=0,048$).

Discusión

El principal hallazgo de nuestro estudio es que los productos finales de glicación avanzada (AGE), medidos de forma fluorescente, son un marcador predictivo independiente del riesgo de desarrollar IC en el seguimiento tras un infarto agudo de miocardio, mientras que los productos precoces de glicación, como la hemoglobina glicada, pierdan su valor predictivo una vez que se realiza el ajuste multivariado. Hemos visto que altos niveles de AGE (por encima de la mediana) multiplicaban por 5 el riesgo de desarrollar IC durante el seguimiento, independientemente de la edad del paciente, de la presencia de DM así como de los niveles de otros parámetros glucémicos, de la gravedad del infarto (en términos de disfunción ventricular y pico de troponina I) y de otros biomarcadores como el NT-proBNP. Sin embargo, la HbA1c, la fructosamina y la glucosa basal, que sí se asociaron de forma significativa con mayor tasa de IC post-infarto en el análisis univariado, perdieron su significación cuando se ajustaron por otras variables confusoras en el análisis multivariado, como los AGE.

En los últimos años se han publicado varios estudios que relacionaban la hiperglucemia y la HbA1c con mayor riesgo de desarrollar IC, tanto en pacientes diabéticos como en no diabéticos³³⁷⁻³⁴⁰, postulándose la hipótesis de que la hiperglucemia mantenida, incluso antes de cumplir criterios diagnósticos de DM, juega un papel importante como agente lesivo miocárdico⁹⁸, siendo uno de sus mecanismos de acción principales la glicación avanzada³⁴². Varios estudios se han centrado en investigar acerca del rol del eje AGE-RAGE en el desarrollo de IC^{95,248,249}, poniendo fundamento al nexo entre hiperglucemia e IC.

Los AGE ven aumentada su concentración en el contexto de una hiperglucemia mantenida³⁴², activando cascadas de señalización intracelular que confluyendo en el factor de transcripción NF- κ B promueven el estrés oxidativo²⁶⁹, que a su vez retroalimenta la formación de AGE³⁴². Los AGE, ya sea mediante la unión proteica directa, como mediante interacción con su receptor celular (RAGE), conducen a la disfunción miocárdica⁹⁵. Y lo hacen generando tanto disfunción diastólica como sistólica. En cuanto a la disfunción diastólica señalar 3 mecanismos documentados: 1) Los AGEs son capaces de establecer enlaces cruzados con proteínas de la matriz como el colágeno, la laminina y la elastina. El exceso de esas uniones altera la flexibilidad de las proteínas de la matriz, con un consecuente aumento de la rigidez miocárdica que de forma mantenida puede inducir disfunción diastólica³⁴⁷. 2) Otra vía por la que los AGEs pueden contribuir al desarrollo de disfunción diastólica es a través de la activación de los receptores (eje AGE-RAGE). Uno de los efectos mediados por RAGE es el de la inducción de la fibrosis a través de la regulación positiva (al alza) del factor transformador de crecimiento β (TGF- β)²⁸². 3) La activación del sistema AGE-RAGE también parece influir en el metabolismo del calcio en los miocitos cardíacos, reduciendo la concentración intracelular secundaria a un retraso importante en la reincorporación de calcio²³⁰. Como consecuencia, la duración de la repolarización aumenta, causando secundariamente disfunción diastólica. En cuanto a la disfunción sistólica, destaca, por la repercusión clínica que tiene, el mecanismo de la aceleración de la progresión de la enfermedad arterial coronaria. La interacción AGE-RAGE puede inducir aterosclerosis, trombosis y vasoconstricción¹⁶. Por la influencia negativa sobre el metabolismo de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), los AGE aumentan el riesgo de desarrollar aterosclerosis y consecuentemente infarto de miocardio. Así son capaces de formar enlaces cruzados con esas partículas de colesterol-LDL, formando moléculas más aterogénicas y menos susceptibles al receptor de LDL celular, con lo que se disminuye su degradación y eliminación³⁴⁸. Además, el LDL modificado por AGE es más susceptible a los receptores de los macrófagos, creando células espumosas²⁴². Y todo ello ocurre en un contexto vascular acompañado de disfunción endotelial secundaria a la menor expresión de óxido nítrico mediada por los radicales libres inducidos por AGE³⁴⁹. Pero a mayores de todas estas anotaciones fisiopatológicas, AGE puede inducir también disfunción sistólica por

la anteriormente mencionada alteración del metabolismo cálcico²³⁰, ya que la reducción de los niveles de calcio intracelular inducida por los AGEs puede traducirse en una disminución de la contractilidad del miocardio. Sea por la vía que sea, es indudable que en un miocardio post-infartado el proceso de remodelación se va a ver acelerado por el eje AGE-RAGE, generando un círculo de retroalimentación que autopotenciaría sus efectos nocivos. De hecho, varios estudios relacionan el eje renina-angiotensina-aldosterona, un sistema de gran relevancia en el remodelado ventricular y cuyas implicaciones fisiopatológicas han sido ampliamente demostradas, con el eje AGE-RAGE^{350,351}. Así se sabe que los inhibidores de la enzima convertidor de angiotensina (IECA) y los antagonistas del receptor de angiotensina II (ARA-2) reducen los niveles de AGE plasmáticos³⁵². En contrapartida, también se ha demostrado que los AGE promueven la formación de angiotensina II³⁵³. Todo ello realza el rol que pueden jugar los AGE en la génesis de IC post-infarto, siendo piezas clave del remodelado ventricular. Sin embargo, en base a nuestro conocimiento y hasta la fecha, ningún trabajo había determinado si los niveles de AGE se relacionaban o no con el desarrollo de IC post-infarto.

Así, y muy probablemente, todos esos estudios que relacionan la glucemia y la HbA1c con el riesgo de desarrollar IC³³⁷⁻³⁴⁰ tengan su explicación en el eje AGE-RAGE, ya que toda esa vía glucosa-fructosamina-HbA1c finaliza en los AGE³⁴², tales como la pentosidina o la carboximetil-lisina, y sean estos los que medien de verdad el remodelado miocárdico que conduce a la disfunción cardíaca. De hecho, en nuestro estudio, tanto la glucosa, como la fructosamina y la HbA1c, resultaron predictores de desarrollo de IC en el análisis univariado; sin embargo al ajustar por variables confusoras y por AGE, todas esas variables pierden su significación, indicativo de que su carácter predictor está influenciado por alguna de estas variables.

Implicaciones clínicas

La determinación de que los niveles de AGE se encuentran más elevados en los pacientes con IC post-infarto pone de relieve el rol fisiopatológico que juegan

dichas moléculas en el remodelado ventricular. Ello implica algo más que el hecho de ser un simple biomarcador de riesgo tras un infarto agudo de miocardio; traduce una nueva vía etiopatogénica en donde se puede focalizar la investigación terapéutica con la finalidad de mitigar los efectos nocivos del remodelado. Así en la actualidad existen diversos compuestos que bloquean el eje AGE-RAGE que han sido estudiados en modelos animales. Los más conocidos son I aminoguanidina, un inhibidor de la formación de AGE, y el alagebrium, (ALT-711), un destructor de los AGE²²⁷. Ambos se han probado tanto en ratas como en perros y monos, objetivando una mejoría franca de la distensibilidad miocárdica²³¹, además de aumentar el gasto cardíaco en modelos animales con disfunción contráctil²⁴⁵. El efecto del alagebrium (ALT-711) en la disfunción diastólica también se ha estudiado en seres humanos^{238,239}. En el ensayo DIAMOND se trataron a 23 pacientes estables con insuficiencia cardíaca diastólica con ALT-711. Después de 16 semanas, la masa ventricular izquierda (medida por resonancia magnética) se había reducido y la función diastólica (medida por Doppler tisular) había mejorado³⁸. Otro ensayo clínico (PEDESTAL trial) pretendió investigar los efectos de la ALT-711 en pacientes con IC y función sistólica conservada (FEVI >45%), y resultados preliminares pusieron de manifiesto una tendencia hacia una mejoría de la función sistólica medida mediante ecocardiografía³⁹. Nuestro trabajo abre el campo de estudio a la valoración del rol que pueden tener estos bloqueantes del eje AGE-RAGE en la prevención del desarrollo de IC post-infarto al limitar los efectos nocivos del remodelado ventricular.

Limitaciones

A pesar del impacto y euforia que pueden generar nuestros resultados, somos conscientes de las limitaciones que tiene nuestro estudio y que se deben de tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados. Principalmente se debe considerar que nuestra población de estudio, que incluía a todos los pacientes que ingresaron por infarto agudo de miocardio en la unidad coronaria de forma consecutiva en un plazo de 15 meses, fue sometida a unos criterios de

inclusión/exclusión muy estrictos, para eliminar posibles interacciones entre el sistema AGE-RAGE y otras variables confusoras (procesos inflamatorios y tumorales, insuficiencia renal, arteriopatía periférica, IC previa...). Esto supuso una reducción importante del tamaño muestral (n=194) con una muestra muy selecta y de riesgo cardiovascular más bajo que la población real, generándose pocos eventos (11 pacientes con IC en un seguimiento con un rango intercuartílico comprendido entre 10 y 17 meses), que condiciona la potencia estadística de los análisis realizados. A su vez los valores de determinados parámetros analíticos estaban ausentes en un determinado porcentaje de los pacientes. Así, mientras los AGE se midieron en el 100% de los pacientes, los valores de HbA1c solo estaban disponibles en el 87,2%, los de fructosamina en el 72,7% y los de NT-proBNP en el 79,4% de los pacientes. Por otro lado en nuestro trabajo AGE se midió de forma global (espectrometría de fluorescencia), sin especificar el tipo de AGE analizado (pentosidina, carboximetil-lisina...). A pesar de todas estas limitaciones, consideramos que este trabajo mantiene las implicaciones fisiopatológicas y clínicas expuestas, siendo de una gran perspectiva de futuro en cuanto a próximas investigaciones en el tema.

Conclusiones

Los productos finales de glicación avanzada (AGE) son un marcador independiente de riesgo de desarrollar IC post-infarto. Muy probablemente la base fisiopatológica radique ser el nexo de unión entre la hiperglucemia mantenida y el remodelado ventricular. Futuras investigaciones deberían confirmar nuestros hallazgos así como dilucidar las implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas implícitas.

4.2.3. IMPLICACIONES DEL EJE AGE-RAGE EN LA DISFUNCIÓN VASCULAR.

Sobre el papel de los productos de glicación avanzada en la disfunción vascular, se muestra el resumen de un trabajo realizado por nuestro grupo de investigación en células endoteliales en cultivo. Este trabajo fue objeto de la tesis del Dr. Bruno Rodiño Janeiro³⁵⁴. En él se demuestra como la albúmina glicada puede generar disfunción endotelial mediante la producción del factor nuclear NF-KB y la alteración de la producción del óxido nítrico (ver anexo 1). Así mismo se prueba como los AGE son capaces de inducir la formación de radicales libres de oxígeno.

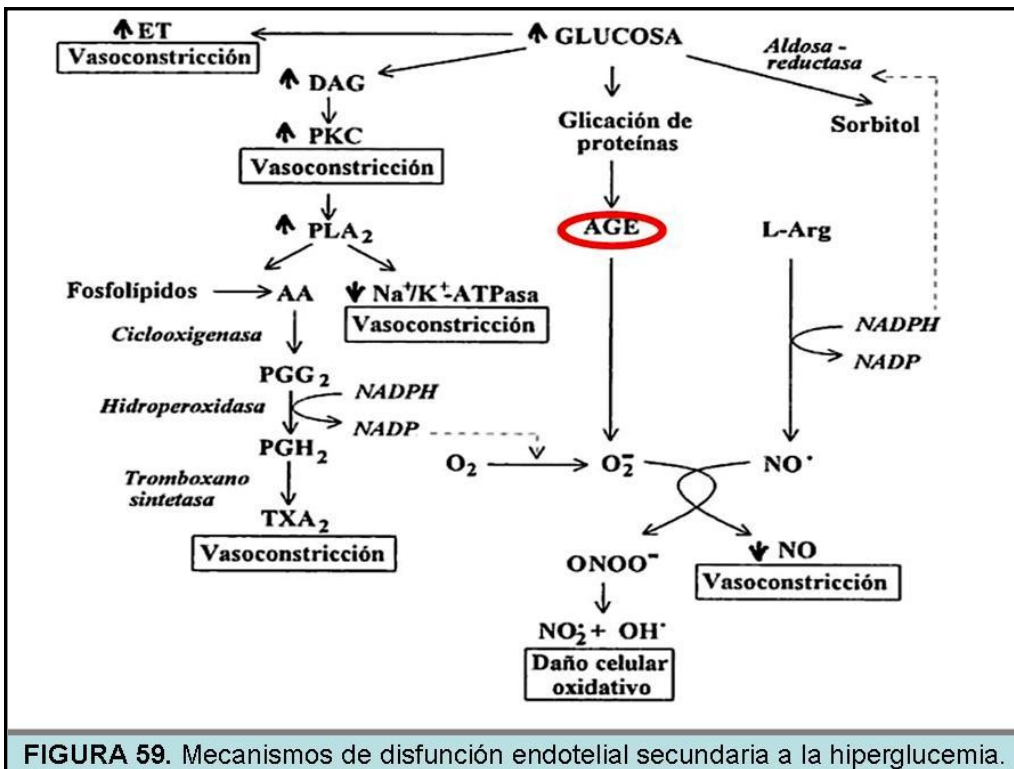


FIGURA 59. Mecanismos de disfunción endotelial secundaria a la hiperglucemia.

Glycated human serum albumin induces NF- κ B activation and endothelial nitric oxide synthase uncoupling in human endothelial cells

gHSA-induced ROS production mechanisms

Bruno Kostka Rodiño Janeiro¹

Sergio Raposeiras Roubín²

González-Peteiro M³,

Ucieda-Somoza R³

Ezequiel Álvarez Castro²

José Ramón González-Juanatey^{1,2}

1. Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela. España.

2. Servicio de Cardiología y Unidad Coronaria del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. España.

3. Unidad de Medicina Materno-Fetal, Servicio de Obstetricia, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

En revisión

Abstract

Background: Diabetes vascular complications could be mediated by non-enzymatic glycation of proteins, but the mechanisms are far from being clear. Our objective was to identify the regulation pathways implicated in the glycated human serum albumin (gHSA)-enhanced ROS production in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC).

Methods: The implication in the gHSA-enhanced extracellular reactive oxygen species (ROS) production of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) and activator protein-1 (AP-1), and of two phosphorylation cascades mediated by phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 (MEK 1/2) were analyzed. Genetic expression levels were measured by RT-qPCR and extracellular ROS production by the cytochrome c reduction method.

Results: NF- κ B activation by gHSA was observed and NF- κ B inhibition reversed the gHSA enhanced NOX4 expression and tended to decrease gHSA-induced ROS production. The inhibition of AP-1 with SP600125 induced a rise of NOX4 and P22PHOX subunits expression and a down-regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). However, SP600125 enhanced ROS production in the presence of human serum albumin, but not with gHSA. gHSA also produced eNOS uncoupling, which could explain these results. The phosphorylation pathways mediated by PI3K or MEK 1/2 did not seem to be involved in gHSA-induced ROS production.

Conclusions: All together suggests that gHSA-enhanced ROS production in HUVEC was the result of: 1) up-regulation of NOX4 NADPH oxidase subunit by NF- κ B activation and 2) eNOS uncoupling. Our results also showed that AP-1 activity is an important factor for the expression of NADPH oxidase and eNOS in HUVEC.

DISCUSIÓN GENERAL

5.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Esta investigación viene a realzar las implicaciones fisiopatológicas de la glicación avanzada en la IC. A través del registro principal de nuestra investigación (RAICCRO) y de otros estudios adyacentes (de índole básica y clínica), ponemos de manifiesto la relevancia a nivel clínico y pronóstico de los AGE y de su receptor soluble en el contexto de la IC.

Los principales hallazgos de nuestra investigación se pueden puntualizar de la siguiente forma:

Resultados principales derivados del registro RAICCRO:

- **Los productos de glicación avanzada (AGE fluorescente) y su receptor soluble (sRAGE) se asocian de forma directa a un peor curso evolutivo en pacientes con IC crónica, sean o no diabéticos.** Aunque entre ambos parámetros existe una relación lineal directa, su significado pronóstico y fisiopatológico es diferente. Así, **el sRAGE presenta una mayor capacidad predictiva**, con valor pronóstico independiente de otros factores clásicamente asociados a eventos adversos en la IC, aspecto que no se mantiene con los AGE fluorescentes al realizar el ajuste correspondiente en el análisis multivariado.
- **El sRAGE se asocia con la etiología isquémica de la IC crónica**, aspecto de peor pronóstico en la IC, así como con la extensión de la enfermedad arterial coronaria, mientras que los AGE fluorescentes no mantiene dicha relación. Sin embargo, **los AGE fluorescentes sí son un excelente marcador de insuficiencia renal**, comorbilidad fuertemente asociada a un peor pronóstico en la IC. Así mismo **ambos parámetros se asocian con la presencia de fibrilación auricular**, la arritmia más frecuentemente asociada con la IC.

Resultados secundarios derivados de los registros RAICCRO, RASCA y de estudios básicos:

- **Los AGE fluorescentes son un factor predictor independiente del desarrollo de disfunción sistólica e IC tras un infarto agudo de miocardio.** Por su parte, sRAGE, aunque si predice el desarrollo de IC durante la fase intrahospitalaria, pierde dicha capacidad durante el seguimiento.
- **Los niveles del sRAGE tienden a aumentar a medida que empeora la función diastólica.** La media de AGE fluorescente también aumenta al avanzar la disfunción diastólica, pero en menor medida y sin significación estadística, aunque todo ello con la limitación de ser analizado en un grupo muy pequeño de pacientes.
- A su vez, **los AGE, concretamente la albúmina glicada, provocan una mayor producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno en células endoteliales** en cultivo, alterando la producción de óxido nítrico y conduciendo a su vez la disfunción vascular.

5.2. IMPLICACIONES CLÍNICAS DEL EJE AGE-RAGE EN LA IC

En este apartado se discute el valor pronóstico de los AGE y del sRAGE en la IC, contrastando nuestros hallazgos con los conocimientos previamente publicados, comentando su consistencia y coherencia.

5.2.1. VALOR PRONÓSTICO DE LOS AGE

A fecha de hoy, y en base a nuestro conocimiento, además de nuestro trabajo, solamente existen 2 estudios que analicen el valor pronóstico de los productos de glicación avanzada en la IC crónica en seres humanos.

Uno fue publicado por **Koyama y colaboradores**²⁴⁹ en 2007 en el Journal of Heart Failure, en el que analizaban el valor pronóstico de un AGE fluorescente, la pentosidina, medido mediante ELISA, en 141 pacientes que ingresaban por descompensación de su IC. Para ello fijaron como objetivo el combinado de muerte y reingreso por IC, con un total de 32 eventos (22,6%: 12 muertes y 20

rehospitalizaciones por IC) durante un seguimiento medio de 1,3 años. Encontraron que la pentosidina era un predictor independiente de un curso evolutivo desfavorable ($89,1 \pm 88,6$ ng/mL vs $35,5 \pm 25,7$ ng/mL comparando paciente con y sin eventos, $p < 0,001$), de tal forma que valores de pentosidina del cuarto cuartil multiplicaban por 4 el riesgo de presentar eventos en el seguimiento.

El otro fue publicado por **Hartog y colaboradores**²⁴⁸ también en 2007 en el *European Heart Journal*. En él se analiza el valor pronóstico de los AGE en la IC con función sistólica deprimida, concretamente dos AGE no fluorescentes [la carboximetil-lisina (CML) y la carboxietil-lisina (CEL)], medidos mediante espectrometría de masas, en una población de 102 pacientes con IC crónica estable. Durante un seguimiento de 1,7 años, con un total de 20 eventos (19,6%: 6 muertes, 13 reingresos por IC y 1 trasplante cardíaco), observaron que la CML se asociaba de forma independiente con un peor pronóstico durante el seguimiento, no así la CEL. Sin embargo, cuando los autores ajustaban sus resultados por función renal medida como tasa de filtrado glomerular estimada por MDRD-4, la CML perdía su valor predictivo.

Nosotros encontramos en 106 pacientes con un seguimiento de 1.3 años y con un total de 29 eventos (27,4%: 11 muertes y 18 reingresos por IC) que los AGE fluorescentes se asociaba con un peor curso evolutivo en el análisis univariado ($80,6 \pm 26,2$ AU vs $62,3 \pm 19,0$ AU en pacientes con y sin eventos, respectivamente, $p < 0,001$. HR para el cuarto cuartil: 3,72 [1,74-7,73], $p < 0,001$). Sin embargo, al ajustar por el *Seattle Heart Failure Score* (SHFS), por la presencia o no de insuficiencia renal (tasa de filtrado glomerular según MDRD-4 < 60 ml/min/1,73 m²), por el NT-proBNP y por sRAGE, los AGE fluorescentes perdían su valor predictivo.

Aunque los dos estudios previos y el nuestro son comparables, existen algunas peculiaridades que merecen la pena comentar. Primeramente el tipo de AGE medido. Hartog y colaboradores midieron la CML y la CEL, 2 tipos de AGE no fluorescentes, mientras que Koyama y colaboradores midieron la pentosidina, 1 tipo peculiar de AGE con una fluorescencia diferente a la del resto de los AGE fluorescentes, y nosotros medimos los AGE fluorescentes. En cuanto a la población de estudio, nosotros analizamos pacientes con IC crónica estable,

similar a Hartog y colaboradores, pero diferente a Koyama y colaboradores (incluye únicamente a pacientes ingresados). Esto explica que el porcentaje de clase III-IV en nuestro estudio sea bajo (22,2%), considerablemente inferior al de los estudios de los grupos de Koyama (57,0%) y de Hartog (39,2%). Así mismo, la edad media de nuestros pacientes ($69,7 \pm 11,7$ años) es sensiblemente superior a la del estudio de Koyama y colaboradores ($66,0 \pm 13,0$ años) y notablemente superior a la del estudio de Hartog y colaboradores ($58,0 \pm 12,0$ años). En cuanto al porcentaje de sexo femenino (32,7%), fue similar al de la población del grupo de Koyama (37,5%) pero superior a la del grupo de Hartog (23,0%). Por su parte nuestro porcentaje de DM (35,8%) fue considerablemente superior al de los otros 2 trabajos (25,0% en el de Koyama y colaboradores y solamente 9,0% en el de Hartog y colaboradores). En cuanto a la distribución de pacientes según la fracción de eyección (FEVI), nosotros englobamos a 61,9% pacientes con función sistólica deprimida (considerando $FEVI \leq 45\%$), similar al equipo de Koyama (56,7% considerando función sistólica deprimida $FEVI \leq 50\%$) pero inferior al porcentaje del grupo de Hartog (cuya totalidad de pacientes tenían $FEVI \leq 45\%$). Esto también condicionaba que el porcentaje de etiología isquémica de nuestro estudio (32,0%) fuese similar al obtenido por Koyama y colaboradores (27,0%) pero inferior al de Hartog y colaboradores (47,0%). Así mismo en nuestra población de estudio encontramos también más eventos (27,4%) que en la de los grupos de Koyama (22,6%) y de Hartog (19,6%), probablemente condicionado por una mayor edad y un mayor porcentaje de DM en nuestra muestra.

Cuando se analizó de forma univariada el valor pronóstico de los AGE en la IC se objetivó que eran un predictor pronóstico en los 3 estudios. Sin embargo, al realizar el análisis multivariado, y una vez que se ajustaba por función renal, solo resultó como predictor independiente de eventos adversos la pentosidina (un tipo específico de AGE fluorescente). La CEL y la CML (2 AGEs no fluorescentes) y los AGE fluorescentes totales perdieron la significación estadística al ajustar por variables confusoras que incluyesen la función renal. Lógicamente hay que interpretar estos resultados en el contexto en el que se analizaron, ya que la pentosidina se midió en pacientes inestables (durante el ingreso hospitalario) y la CML, la CEL y los AGE fluorescentes totales se midieron en pacientes estables

(consulta externa). Así mismo resaltamos que, en nuestro análisis multivariado, los resultados se ajustaron, además de por el NT-proBNP y por la tasa de función renal, por el sRAGE (variable asociada directamente con AGE y con valor pronóstico independiente) y por el SHFS (un score de riesgo que incluye, entre sus variables, aspectos clínicos como la edad, el sexo, la clase NYHA, la fracción de eyección o la etiología isquémica, aspectos terapéuticos de tratamiento médico y dispositivos, y aspectos analíticos, como la hemoglobina y parámetros bioquímicos tales como el colesterol total y el ácido úrico). El ajustar por una escala de riesgo validada para la predicción de muerte al año de seguimiento también supone una mayor exigencia metodológica que en parte podría justificar la ausencia de significación estadística de los AGE fluorescentes en nuestro estudio frente a la pentosidina en el de Koyama y colaboradores.

Los AGEs se asocian a peor curso evolutivo en pacientes con IC. Sin embargo, al ajustar por variables confusoras como la función renal, solamente la pentosidina medida en pacientes inestables fue un predictor independiente de eventos adversos. En pacientes con IC crónica estable, ningún AGE ha demostrado ser predictor independiente de mal pronóstico en términos de muerte o reingreso por IC.

Tanto en el estudio del grupo de Koyama²⁴⁹ como en el del grupo de Hartog²⁴⁸, los AGEs medidos (pentosidina, CML y CEL) se relacionaron con la clase funcional NYHA, de tal forma que a mayor concentración sérica peor clase funcional. Sin embargo, en nuestro estudio nosotros no encontramos significación estadística en dicha relación ($p=0,170$). Entre las posibles explicaciones que atribuimos a dicha discordancia se encuentran el bajo número de pacientes con clase funcional > II (24 en clase III y ningún paciente en clase IV) y la medición de AGE fluorescente (no mide específicamente un tipo de AGE, sino que engloba a un conjunto de AGEs con un determinado espectro de fluorescencia, que no incluye la pentosidina ni los AGE no fluorescentes). Así mismo en los tres estudios se objetivó una correlación positiva entre los niveles de AGE (ya sea pentosidina, CML o AGE fluorescente) y los niveles de NT-proBNP, biomarcador ampliamente contrastado con el pronóstico de la IC.

Cabe destacar también que Koyama y colaboradores en su trabajo compararon los niveles de pentosidina en su muestra de pacientes con IC con un grupo control formado por 18 individuos sanos, siendo la concentración media de pentosidina mayor en pacientes con IC ($47,7 \pm 52,5$ ng/mL vs $33,3 \pm 13,2$ ng/mL), aunque sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas, probablemente debido al bajo número de pacientes en el grupo control.

5.2.2. VALOR PRONÓSTICO DEL sRAGE

En relación con el valor pronóstico del receptor soluble de AGE en la IC, solamente existe un estudio publicado al respecto, además del nuestro, que demuestra su capacidad predictiva independiente.

En 2008, **Koyama y colaboradores**¹⁷⁵ ampliaron los resultados de su estudio anterior, plasmando en una nueva publicación en el Journal of Heart Failure en la cual analizaban el valor predictivo pronóstico del sRAGE en la IC. Para ello incluyeron, además de los pacientes ingresados por empeoramiento de su IC, aquellos pacientes con IC que estando estables ingresaban para estudio etiológico de la misma o para estudios de investigación fisiopatológica o terapéutica. Así pues, al estudio de Koyama y colaboradores previamente descrito para analizar las implicaciones pronósticas de los AGE en la IC, se le añadieron 19 pacientes más (n=160) y se amplió la mediana de seguimiento a 2,4 años, observando una tasa de eventos del 30,0% (11 muertes y 37 reingresos por IC). Las características basales eran muy parecidas a las descritas previamente (edad $69,0 \pm 12,0$ años, 40,6% sexo femenino, 24,0% de DM, 26,0% etiología isquémica, 40,0% clase funcional III-IV). Los niveles del sRAGE fueron mayores en aquellos pacientes con eventos adversos durante el seguimiento (1622,0 [818,0-2463,0] pg/mL vs 937,0 [647,0-1353,0] pg/mL, $p=0,001$), igual que los niveles de pentosidina ($41,4$ [24,9-72,9] ng/mL vs $30,2$ [24,9-72,9] ng/mL, $p=0,010$), siendo ambos parámetros predictores independientes de mal pronóstico durante el seguimiento (HR 1,90 para sRAGE [IC 95% 1,16-3,09, $p=0,010$] y 1.59 para pentosidina [IC 95% 1,11-2,29, $p=0,012$]).

En nuestro trabajo (con 102 pacientes y 29 eventos durante el seguimiento) se observó una mayor concentración plasmática del sRAGE en aquellos pacientes que posteriormente tuvieron eventos ($1844,1 \pm 1058,4$ pg/mL vs $997,4 \pm 766,2$ pg/mL), con una hazard ratio (HR) para el combinado de muerte y reingreso por IC durante el seguimiento de 6,30 (IC 95% 2,99-13,2; $p < 0,001$). Al ajustar por el score de riesgo de *Seattle* (SHFS), por la función renal, por los AGE fluorescentes y por el NT-proBNP observamos que el sRAGE permanecía como predictor independiente de eventos adversos, con una HR de 1,067 (IC 95% 1,008-1,026; $p < 0,001$). Y si estos resultados se focalizaban únicamente en un *end-point* duro como la mortalidad durante el seguimiento, se observó que el sRAGE también era un predictor de muerte independiente del score de Seattle, de la función renal, del NT-proBNP y de los AGE, con un aumento del riesgo de muerte del 26,2% por cada aumento de 100 pg/mL en los niveles del sRAGE.

El sRAGE es un excelente marcador pronóstico en la IC crónica, relacionándose con la clase funcional de los pacientes y prediciendo de forma independiente la mortalidad durante el seguimiento a medio plazo (1-2 años)

Las dos principales diferencias entre el estudio de Koyama y colaboradores y el nuestro radican en el tipo de pacientes y en el *end-point*. Nosotros analizamos pacientes estables con IC crónica (procedentes de la consulta de cardiología) mientras que Koyama y colaboradores analizaron en su gran mayoría pacientes inestables que ingresan por reagudización de su IC, con lo cual la medida del sRAGE se realiza en dos contextos diferentes y no superponibles. Por otro lado, el punto fuerte de nuestro trabajo es que además de analizar el combinado de eventos (muerte y reingreso por IC) también analizamos un *end-point* duro como es el de la mortalidad durante el seguimiento, demostrando el gran valor predictivo del sRAGE con independencia de otras variables contrastadas como el *Seattle Heart Failure Score* o el NT-proBNP.

Koyama y colaboradores¹⁷⁵ en su estudio describieron el punto de corte para el sRAGE de 1220 pg/mL como el que presentaba una mejor relación sensibilidad/1-

especificidad, siendo los valores de sensibilidad del 60% y de especificidad del 69%. En nuestro estudio hemos construido las curvas ROC del sRAGE para la predicción no solo del combinado de muerte y reingreso por IC sino también para la mortalidad sola, con un área bajo la curva de 0,724 y 0,705, respectivamente. En base a ellas, el punto de corte más apropiado fue de 1183,0 pg/mL, con una sensibilidad de 72,7% y 72,4% y una especificidad de 70,5% y 80,5% para mortalidad y para el conjunto de eventos cardíacos, respectivamente.

El otro punto a destacar tanto del trabajo de Koyama y colaboradores como del nuestro, es que los niveles del sRAGE se correlacionan con la clase funcional de los pacientes. En nuestro trabajo, los pacientes con valores del sRAGE por encima de la mediana estaban en clase funcional III-IV de la NYHA hasta en un 32,7%, frente a un 12,0% de los que presentaban valores por debajo de la mediana ($p=0,013$). Además también fue un hallazgo consistente en ambos estudios que los niveles del sRAGE y del NT-proBNP presentaron una correlación directa positiva.

5.2.3. GLICACIÓN AVANZADA Y DIABETES MELLITUS

En diversos estudios se ha demostrado que la concentración sérica y los niveles tisulares de los AGEs se encontraban incrementados en los pacientes diabéticos¹⁷⁸⁻¹⁸¹ -como es lógico-, al estar sometidos a un estado de hiperglicemia mantenido superior al de los pacientes no diabéticos. Han y colaboradores recientemente

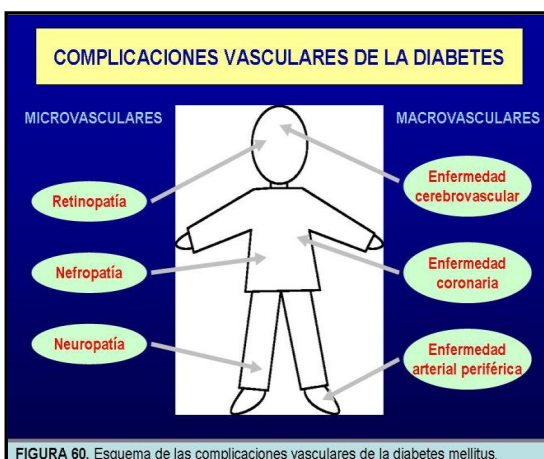


FIGURA 60. Esquema de las complicaciones vasculares de la diabetes mellitus.

demonstraron que la hidroimidazolona derivada del metilglioxal (MG-H: *Methylglyoxal-derived hydroimidazolone*), que es uno de los AGEs más abundantes *in vivo*, mostraba mayor concentración sérica en pacientes jóvenes

con diabetes mellitus tipo 1, aún en ausencia de complicaciones micro y macrovasculares³⁵⁵. Y previamente se había comprobado lo mismo en pacientes con diabetes tipo 2³⁵⁶. De ahí que muchos de los esfuerzos investigadores en este campo se centraron en conocer las implicaciones de los AGEs en las complicaciones de la diabetes.

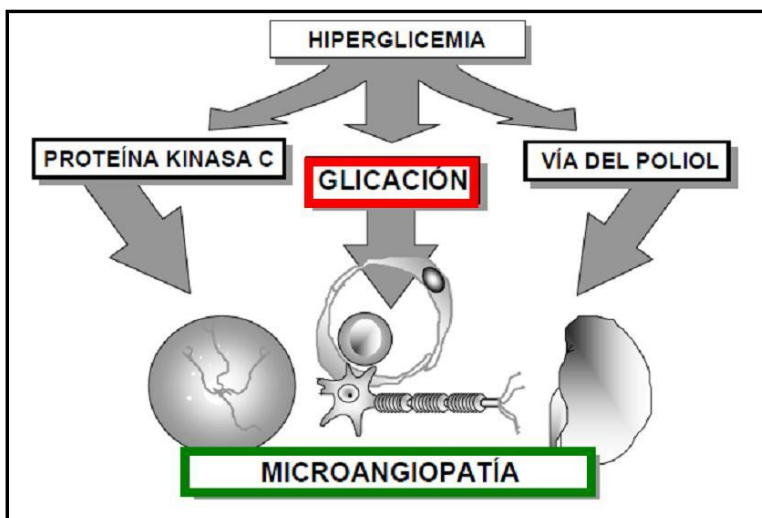


FIGURA 61. Glicación y microangiopatía.

· Tres vías principales implicadas en la enfermedad microvascular diabética inducidas por la hiperglicemia.

Modificado de Gugliucci A.: Glicación de proteínas: rol protagónico de la hiperglicemia en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. Rev Med Uruguay 2000; 16: 58-75.

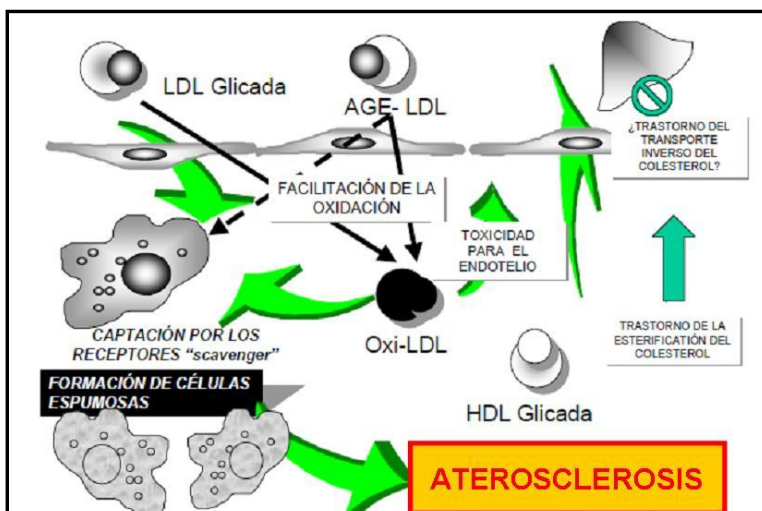


FIGURA 62. Glicación y macroangiopatía.

· Representación esquemática de las vías principales por las cuales la glicación de lipoproteínas puede acelerar la aterosclerosis.

Modificado de Gugliucci A.: Glicación de proteínas: rol protagónico de la hiperglicemia en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. Rev Med Uruguay 2000; 16: 58-75.

Ya sea por la acción directa de los propios AGE, al acumularse en las paredes de los vasos sanguíneos (desde los capilares y arteriolas a las grandes arterias), como de forma indirecta, mediada por su receptor RAGE, **los AGE se han involucrado en todo el continuo de complicaciones vasculares de la diabetes**, ya sea por alteración de la microvasculatura (afectando a la vasos retinianos, al glomérulo renal o a los nervios periféricos) o de los grandes vasos (como consecuencia de la aterogénesis acelerada)^{85,91,181}.

Los AGEs se encuentran elevados en el plasma de pacientes con diabetes mellitus, aún en ausencia de complicaciones vasculares. Sin embargo, en pacientes con IC, no existen diferencias en la concentración sérica de AGE entre pacientes diabéticos y no diabéticos.

En pacientes con IC, en donde de por sí los niveles de AGE ya tienden a estar aumentados (secundario a la situación de estrés oxidativo que conlleva dicha patología)⁹⁵, ninguno de los estudios publicados mostró diferencias en los niveles de AGE entre pacientes diabéticos y no diabéticos^{248,249}. En el estudio de Koyama y colaboradores²⁴⁹, la media de pentosidina fue de $51,2 \pm 59,2$ ng/mL en pacientes diabéticos vs $36,4 \pm 29,3$ ng/mL en pacientes no diabéticos ($p=0,537$). En el trabajo de Hartog y colaboradores²⁴⁸ no se analizó las diferencias entre pacientes diabéticos y no diabéticos al haber solamente 9 pacientes con diabetes. En nuestro estudio la media de AGE fluorescente en pacientes diabéticos fue de $71,8 \pm 22,1$ AU frente a $64,8 \pm 22,6$ AU en no diabéticos, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas ($p=0,128$).

En cuanto a los niveles del sRAGE y su relación con la diabetes mellitus nos encontramos lo siguiente. En pacientes diabéticos los niveles totales de sRAGE son menores a los encontrados en pacientes no diabéticos, a pesar de que los niveles de AGE son mayores. Así cabe destacar, entre otros estudios, el del grupo de Basta, en donde se mostró una correlación inversa entre los niveles del sRAGE y de la hemoglobina glicada³⁵⁷.

El sRAGE se encuentra disminuído en el plasma de pacientes con diabetes sin complicaciones vasculares, a expensas de los bajos niveles del esRAGE. En pacientes con IC, el sRAGE se encuentra aumentado, básicamente a expensas del cRAGE, sin observarse diferencias entre diabéticos y no diabéticos.

El conjunto del sRAGE, tal y como se comentó en la introducción, está formado básicamente por 2 subtipos¹⁶³: el esRAGE, que es la forma secretada por las células¹⁶⁴, y el cRAGE, que es la forma resultado del *cleavage* celular producido por las metaloproteasas¹⁶⁵. En pacientes diabéticos sin complicaciones vasculares se vió que el sRAGE global se encontraba disminuído en relación a pacientes no diabéticos, y lo hacía a expensas de esRAGE³⁵⁵. Tales hallazgos conducen a plantear la **hipótesis de que esRAGE es un mecanismo de defensa celular frente al aumento de los AGE que se producen en el organismo**. Así, se cree que los pacientes diabéticos tienen alterada su producción, lo que les hace ser más susceptibles a la acción de los AGE.

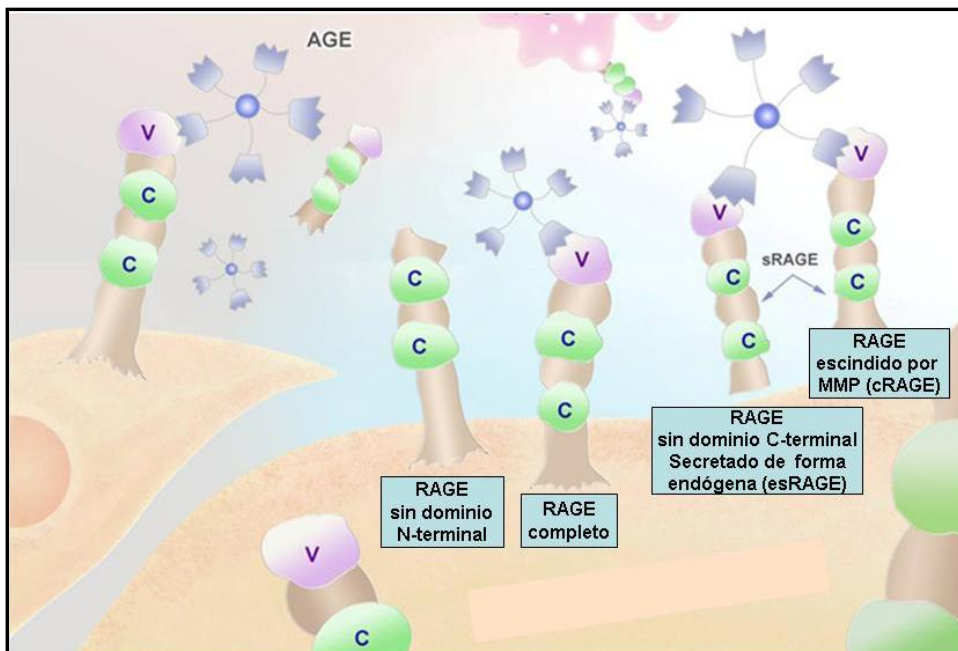
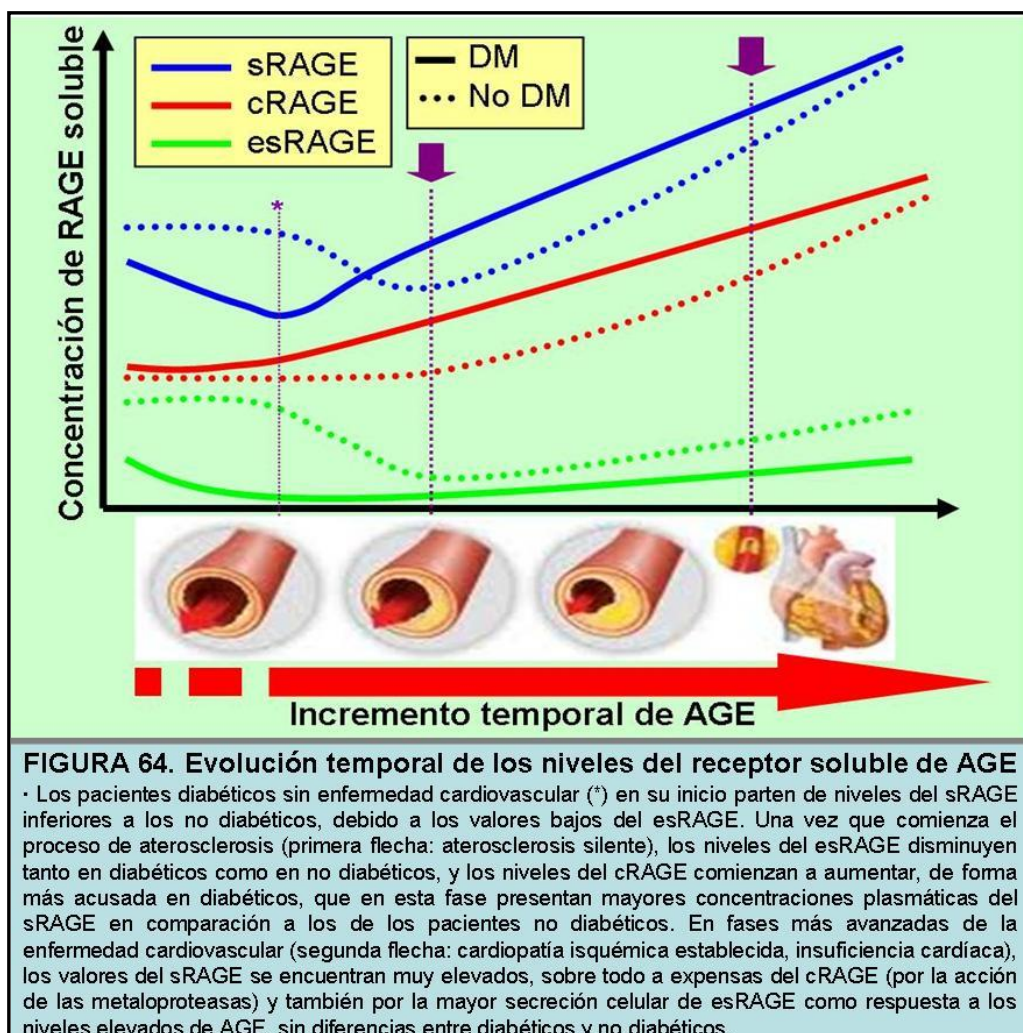


FIGURA 63. Diversas formas del receptor de AGE (RAGE).

Modificado de Park S et al.: RAGE and cardiovascular disease. Rev Med Uruguay 2000; 16: 58-75. Frontiers in Bioscience 2011; 16: 486-97.

A medida que van surgiendo las complicaciones micro y macrovasculares de la diabetes, los niveles de AGE se van incrementando³⁵⁸⁻³⁶⁰ y también los niveles del sRAGE^{254,361,362}. En este caso lo hacen a expensas fundamentalmente del cRAGE^{279,363,364}. Esto traduce un mayor remodelado celular secundario a una hiperactividad de las metaloproteasas en estados de alto estrés oxidativo, donde así mismo hay mayor expresión del RAGE celular que se ve sometido a un mayor proceso de cribaje¹⁶⁵. Este aumento del sRAGE también se va a producir aunque en menor medida en pacientes no diabéticos que se vean sometidos a una situación similar de alto nivel oxidativo³⁶⁵. La diferencia será que en los pacientes no diabéticos, frente a esos estados de alto concentración de productos de glicación avanzada, las células responden con un mayor producción del esRAGE^{366,367}, para tratar de contrastar los efectos de los AGE (recordemos lo



dicho en la introducción, que el esRAGE actúa como un *decoy* para los AGE), por lo que los niveles del esRAGE se encuentran aumentados en comparación con los pacientes diabéticos, que tienen alterado este mecanismo de defensa²⁷⁹. Así mismo el cRAGE también aumenta, pero en menor medida que en pacientes diabéticos. Esto se debe a que el esRAGE contrastará, en parte, la acción de los AGE, lo que supone una menor expresión del RAGE celular y un menor cribaje del mismo, conllevando una menor producción del cRAGE en comparación con la que se produce en el paciente diabético²⁷⁹.

Katakami y colaboradores midió en una misma cohorte de pacientes con aterosclerosis carotídea los niveles del sRAGE de forma global y en sus dos subtipos: el esRAGE y el cRAGE, analizando de manera independiente si eran o no diabéticos²⁷⁹. Para ello analizó el sRAGE y el esRAGE mediante ELISA y la diferencia entre ambos se lo atribuyó al cRAGE. Así, encontraron que los niveles totales del sRAGE no eran diferentes entre los grupos de diabéticos y no diabéticos (1505 ± 599 pg/mL vs 1314 ± 474 pg/mL, $p > 0,05$), sin embargo los niveles del esRAGE eran menores en los pacientes diabéticos (282 ± 139 pg/mL vs 446 ± 112 pg/mL; $p < 0,001$) en contraste con lo que sucedía con los niveles de cRAGE que eran mayores en diabéticos (1222 ± 525 pg/mL vs 868 ± 436 pg/mL; $p = 0,003$). En estos pacientes encontraron además una correlación inversa entre el esRAGE y la hemoglobina glicada, como era de esperar, pero no en relación con el cRAGE y el sRAGE total (a diferencia del grupo de Basta³⁵⁷, en este estudio se incluyeron pacientes con enfermedad aterosclerótica en donde los niveles del cRAGE ya comienzan a aumentar, alterando la relación del sRAGE con la hemoglobina glicada vista en el estudio previo).

¿Qué ocurre con los niveles del sRAGE en la insuficiencia cardíaca en diabéticos y no diabéticos? Sería de esperar que los niveles de cRAGE estuviesen aumentados (en mayor medida en pacientes diabéticos) y que los niveles de esRAGE estuviesen disminuidos en diabéticos y en su rango normal o ligeramente aumentados en pacientes no diabéticos. Teniendo en cuenta que cRAGE supone el 75% del total de sRAGE, sería de suponer que sRAGE se encontrase aumentado en la IC, tanto en pacientes diabéticos como en no diabéticos. Recientemente fue publicado un trabajo por Wang y colaboradores³⁶³

en el que se confirmaba dicha hipótesis, tanto en pacientes diabéticos como en no diabéticos con IC crónica. Se vió que los niveles del sRAGE se encontraban aumentados en pacientes con IC frente a un grupo control sin IC, y lo estaban a costa del cRAGE, con niveles del esRAGE disminuídos. Además se objetivó una correlación entre el cRAGE y el NTproBNP así como con la clase funcional NYHA. Este es el único estudio que testa esta hipótesis, que en gran medida permite entender la controversia generada acerca de las implicaciones clínicas (terapéuticas y pronósticas) que podría tener el sRAGE en sus diferentes isoformas.

En pacientes con IC, AGE y sRAGE se correlacionan entre si de forma débil. Sin embargo, ninguno de los dos se asoció de forma significativa con los niveles de hemoglobina glicada.

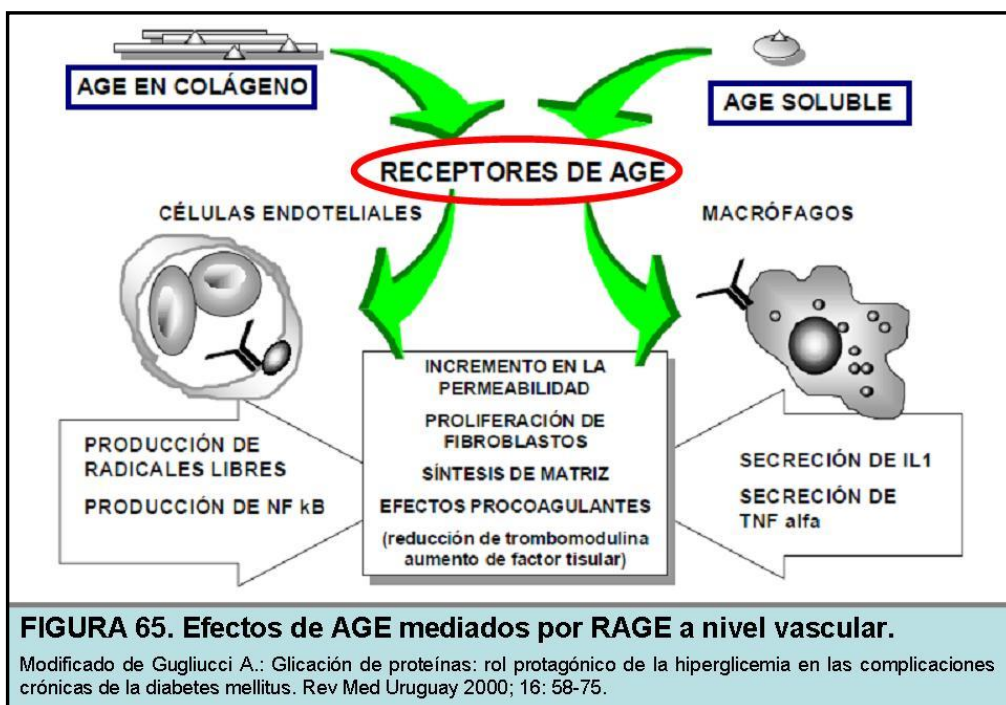
En nuestros pacientes se observó una débil correlación positiva entre los AGE y el sRAGE. Esto concuerda con los resultados del grupo de Koyama, que también encontró una correlación entre los AGE y el sRAGE en pacientes con IC. Ambos parámetros se correlacionaron también de forma directa con la fructosamina, un producto de Amadori, pero no con la hemoglobina glicada, lo que concuerda con el estudio de Katakami, en donde la hemoglobina glicada únicamente se asociaba al esRAGE, no al cRAGE ni al sRAGE²⁷⁹.

5.2.4. EJE AGE-RAGE Y ETIOLOGÍA ISQUÉMICA

Existe una gran evidencia que demuestra la implicación del eje AGE-RAGE en la enfermedad arterial coronaria, ya sea por la disfunción endotelial como por la aterosclerosis acelerada.

Se ha demostrado que la interacción de los AGEs con su receptor celular RAGE en monocitos y células endoteliales produce el desarrollo de un ambiente proinflamatorio en el que la migración/activación de monocitos, la

hiperpermeabilidad endotelial y la expresión aumentada de moléculas de adhesión y factores de crecimiento tisulares en células endoteliales produce la generación de un ambiente que conduce al desarrollo de lesiones vasculares¹⁵⁶⁻¹⁶⁰. En relación con la mayor frecuencia de aterogénesis en el diabético, se ha comprobado que las lipoproteínas modificadas por glicación son captadas por el receptor *scavenger* de los macrófagos, transformándose éstos en células espumosas, lo que sería el punto de partida de la placa ateromatosa¹⁹⁵⁻²⁰¹. Así mismo, la activación final de NFkB resulta en un aumento de la expresión de proteínas procoagulantes, como la trombomodulina y el factor tisular, y moléculas de adhesión (como la VCAM-1), que también se involucran en la progresión de la



enfermedad coronaria¹⁹²⁻¹⁹⁴.

Se ha demostrado también que la porción extracelular de RAGE (sRAGE), compuesta por un dominio de inmunoglobulina de tipo "V" seguido por dos dominios de tipo "C" interfiere con la capacidad de los AGEs para unirse y activar el RAGE celular¹⁶². *In vivo*, la administración del sRAGE bloquea la hiperpermeabilidad endotelial en ratas diabéticas¹⁶⁹. En base a ello se desarrolló un modelo de aterosclerosis acelerada en ratas diabéticas y se usó para ensayar

la hipótesis de que la administración crónica del sRAGE impide el desarrollo de aterosclerosis acelerada¹⁷⁰. Estos estudios demostraron que la inyección intraperitoneal diaria del sRAGE previene el desarrollo acelerado de aterosclerosis en ratones deficientes en apolipoproteína E a los que se había hecho diabéticos con estreptozotocina¹⁷¹. Paralelo a ello, se vió que el bloqueo del RAGE disminuía significativamente la expresión vascular de moléculas de adhesión, sustancias protrombóticas -como el factor tisular- y disminuía la actividad de las metaloproteinasas, previniendo la disfunción cardíaca en ratones diabéticos²⁹¹. Además, los niveles vasculares de las MAP kinasas (como la p38) y de NFkB se encontraban disminuídos en ratones diabéticos tratados con el sRAGE^{368,369}. Pero importantes estudios posteriores también demostraron que estos hallazgos no se limitaban al estado diabético. La administración del sRAGE en ratones euglucémicos carentes de apolipoproteína E con aterosclerosis establecida suprimía la progresión de ésta³⁷⁰. Así mismo, se vió que disminuía la expansión neointimal, junto con la proliferación de las células musculares lisas adyacentes³⁷¹. En humanos, Cipollone y colaboradores mostraron una expresión aumentada del RAGE a nivel de las placas ateroscleróticas tanto de pacientes diabéticos como no diabéticos, acompañándose de un aumento de la expresión de metaloproteinasas²⁸².

En nuestro trabajo demostramos que el sRAGE, pero no los AGE fluorescentes, se correlaciona con la etiología isquémica de la IC así como con su severidad. En los estudios de los grupos de Koyama²⁴⁹ (pentosidina) y de Hartog²⁴⁸ (CML y CEL) ninguno de los AGEs medidos se asoció con la etiología isquémica, al igual que sucedía en nuestro estudio con los AGE fluorescentes. Probablemente la explicación se deba a que el grupo con el que se comparan los pacientes con cardiopatía isquémica es una cohorte de pacientes con IC de causa no isquémica, que de por sí ya presenta niveles incrementados de los AGE, como se ha visto. En cuanto al sRAGE, el otro estudio realizado en pacientes con IC, que es el de Koyama y colaboradores, no encontró asociación entre sus niveles y la enfermedad coronaria, en el total de 160 pacientes con 26% catalogados de origen isquémico⁷⁵. Una de las posibles diferencias de la no concordancia entre dicho estudio y el nuestro es que los pacientes del estudio de Koyama y colaboradores estaban en su mayoría en una situación clínica inestable en el

momento de la extacción de la muestra sanguínea donde se midió el sRAGE, ya que procedían de una muestra de pacientes ingresados para estabilización de su IC en prácticamente el 90% de los casos. Frente a esto, nuestros pacientes derivan de la consulta externa de IC, estando clínicamente estables en el momento de la extracción de la muestra. Así, si Koyama y colaboradores referían hasta un 40% de los pacientes en clase III-IV de la NYHA, nosotros apenas contábamos con algo más del 20% de pacientes en clase III y ninguno en clase IV. Teniendo en cuenta que el sRAGE varía de forma dinámica en relación con el grado de estrés oxidativo al que se vea sometido el organismo, no es difícil de entender que si existen diferencias marcadas en la situación funcional basal de los pacientes también las habrá en sus niveles de sRAGE, lo que puede condicionar los análisis comparativos realizados, como es el caso.

Al revisar minuciosamente la bibliografía en busca de aclarar las implicaciones del sRAGE en la enfermedad arterial coronaria, hemos encontrado resultados diversos que a simple vista podrían resultar contradictorios. Falcone y colaboradores, en 2005, habían probado que en pacientes no diabéticos con coronariopatía estable los niveles del sRAGE se encontraban disminuídos en comparación con individuos sanos, concluyendo que dicha molécula podría jugar un papel protector en la aterosclerosis²⁸³. Dos años más tarde, Nakamura y colaboradores encontraban lo contrario en pacientes diabéticos, concluyendo que el sRAGE era un marcador de la progresión de la aterosclerosis²⁸⁹. ¿Cómo se explican resultados tan opuestos? Puede que la respuesta se encuentre en el tipo del sRAGE medido. En ambos trabajos se midió el sRAGE de forma global, sin distinguir los diferentes tipos, concretamente las dos formas: el esRAGE (secretado por las células con fines protectores frente a la acción de los AGE) y el cRAGE (resultado del cribaje celular del receptor transmembrana que se produce en estados de alto estrés oxidativo).

En una persona no diabética, los niveles del sRAGE dependen en 3/4 partes del cRAGE y el resto del esRAGE²⁷⁹. Con la edad y con el estrés oxidativo, el organismo va disminuyendo su capacidad de producir el esRAGE, lo que lo hace más vulnerable a la acción de los AGE, como demostraron Peng y colaboradores³⁷². Al disminuir el esRAGE lógicamente disminuye el sRAGE (de

hecho son varios los estudios que muestran una correlación positiva directa entre ambas formas)^{168,373}. Ello explicaría los resultados de Falcone y colaboradores, en donde pacientes no diabéticos con aterosclerosis coronaria estable presentaron niveles más bajos del sRAGE (la justificación estaría en la caída de los niveles del esRAGE). Y la concentración plasmática total del sRAGE va disminuyendo hasta que se produce un evento cardiovascular²⁸³. En ese momento de inestabilidad hemodinámica, se produce un gran estrés oxidativo que secundariamente se traduce en un aumento de la actividad de las metaloproteinasas con mayor remodelado celular y mayor producción del cRAGE¹⁶⁵. Además en ese momento las células del organismo también son capaces de responder a ese estímulo incrementando la producción del esRAGE^{366,367}. Por lo que, tras el evento cardiovascular, los niveles séricos del sRAGE total se encuentran elevados (ver figura 64).

En pacientes diabéticos existe un pequeño matiz. Y es que la producción del esRAGE se ve comprometida desde la fase inicial³⁷⁴. Esto hace a los pacientes más vulnerables a la acción de los AGE, produciéndose una aterosclerosis acelerada, que condiciona un aumento progresivo de los niveles del sRAGE (secundario al cRAGE, como consecuencia del estrés oxidativo y de la activación crónica de marcadores de inflamación) tras una pequeña caída de los mismos (debido al descenso inicial del esRAGE)^{372,375-377}. Ello concuerda con los resultados de Lu y colaboradores, que demostraron que en pacientes diabéticos altos niveles de albúmina glicada y bajos niveles del esRAGE se asociaban con la presencia de enfermedad coronaria²⁸⁶. Tras iniciarse el proceso de aterosclerosis, los niveles de sRAGE aumentan progresivamente, como en los no diabéticos, y también aumentarían levemente los niveles del esRAGE, en respuesta al gran estrés oxidativo y a las altas concentraciones de AGE, aunque sin alcanzar los niveles basales. De ahí que en el estudio de Nakamura y colaboradores, en pacientes diabéticos, hubiese una asociación directa entre el sRAGE y la enfermedad arterial coronaria (se justificaría fundamentalmente por la elevación mantenida del cRAGE, con independencia de los niveles del esRAGE)²⁸⁹. Recientemente también se publicó un subanálisis del estudio CARDS (*Collaborative Atorastatin Diabetes Study*) en donde se midió el sRAGE en 718 pacientes diabéticos de más de 5 años de evolución, seguidos durante una

mediana de 3.9 años, observándose que era un predictor de eventos coronarios, asociándose de forma significativa con la enfermedad arterial coronaria³⁷⁸.

Si nos referimos a estados más precoces de la aterosclerosis, los resultados también pueden ser ligeramente diferentes, pues en esta fase en pacientes no diabéticos el esRAGE puede ser prácticamente normal mientras que en pacientes diabéticos se encontrará claramente disminuído. Esta disminución del esRAGE hace que en pacientes diabéticos en fases tempranas de la enfermedad aterosclerótica los niveles del sRAGE total se puedan encontrar más bajos. Tal hallazgo fue demostrado por Katakami y colaboradores, valorando la enfermedad carotídea estimada mediante grosor de la íntima-media carotídea en pacientes diabéticos asintomáticos²⁷⁹. Así, estos investigadores encontraron una asociación entre bajas concentraciones séricas del sRAGE total y del esRAGE y mayor progresión de la enfermedad aterosclerótica carotídea, coherente con los resultados de otras investigaciones²⁷⁹. A nivel coronario, Lindsey y colaboradores en 2009 correlacionaron el sRAGE con la calcificación coronaria en 2751 pacientes diabéticos y no diabéticos estables hemodinámicamente, mostrando una asociación inversa entre el sRAGE y el grado de calcio en las arterias coronarias, probablemente traduciendo una menor concentración sérica del esRAGE²⁸⁴.

En nuestro estudio se midieron los AGE fluorescentes y el sRAGE un grupo de pacientes especiales, como son los pacientes con IC, sometidos a un gran estrés oxidativo. En estos pacientes los niveles de los AGE se encuentran elevados, y sería lógico esperar que los niveles del sRAGE también se encontrasen elevados en base a la forma truncada del cRAGE, secundaria al proceso de remodelado cardíaco. Nosotros no encontramos asociación entre los AGE fluorescentes y la etiología isquémica, probablemente porque los niveles elevados de los AGE en la IC contrarrestan dicha asociación. Por otro lado, sí encontramos relación con sRAGE total. Probablemente esto traduce que los pacientes con IC de etiología isquémica estén sometidos a un proceso de remodelado estructural más marcado, con mayor expresión de citocinas y marcadores inflamatorios, que secundariamente conduzcan a un mayor cribaje celular del receptor transmembrana del RAGE con el subsiguiente aumento del sRAGE.

Dado que la cardiopatía isquémica supone un peor pronóstico en el contexto de la IC, conviene reflexionar sobre este resultado para entender las implicaciones clínicas del eje AGE-RAGE en la IC. Así, tal y como lo vemos, este hallazgo viene a poner de relieve un mecanismo hasta ahora desconocido que justificaría la asociación del sRAGE con peor pronóstico en los pacientes con IC crónica.

5.2.5. EJE AGE-RAGE Y FIBRILACIÓN AURICULAR

La fibrilación auricular es una arritmia que se asocia a la IC empeorando francamente su pronóstico. La asociación del eje AGE-RAGE con la fibrilación auricular podría explicar el peor curso evolutivo de los pacientes con IC y niveles plasmáticos elevados de AGE y sRAGE.

Existe una evidencia creciente de que la fibrilación auricular (FA) forma parte de un espectro de síndromes metabólicos²⁹⁷. En el *Framingham Heart Study*, la diabetes mellitus (DM) y la hipertensión arterial resultaron factores de riesgo para la predicción de FA tras ajustar por la edad y otras variables confusoras²²³. Otros estudios epidemiológicos tanto de la década de los 90 como de la primera década del siglo XXI consideraron a la DM como un fuerte factor predictor del desarrollo de FA y flutter auricular, con una odds ratio que variaba entre 1,4 y 2,2^{298,299}. Sin embargo la relación fisiopatológica entre ambas patologías no está clara.

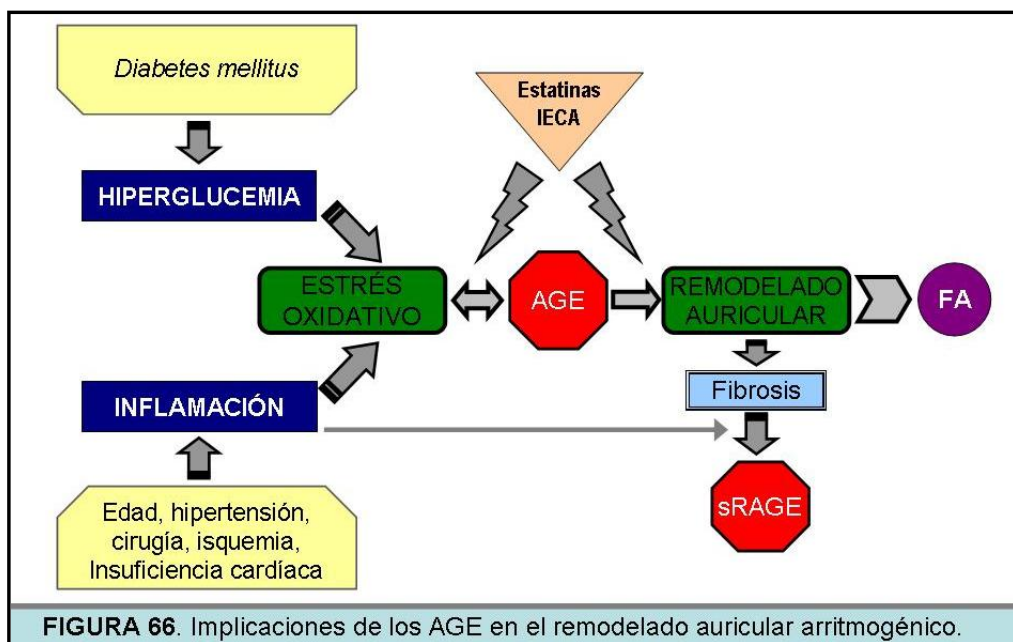
En 2008, un grupo de investigadores del Instituto Cardiovascular de Tokio, demostró que en ratones diabéticos la activación del eje AGE-RAGE inducía un remodelado estructural a nivel auricular mediado por la sobreexpresión del factor de crecimiento del tejido conectivo (CTFG: connective tissue growth factor)³⁰³. Además la administración de un inhibidor de la formación de AGE, el OPB-9195, reducía de manera significativa la fibrosis atrial como consecuencia de la reducción de la expresión del CTFG. Este remodelado auricular mediado por el eje AGE-RAGE podría ser una explicación de la asociación entre DM y FA.

En nuestro estudio, con 97 pacientes (tras exclusión de 8 pacientes portadores de marcapasos) de los cuales 38 se encontraban en FA (39,2%) encontramos que los niveles plasmáticos de AGE fluorescente y de sRAGE eran mayores en los pacientes con FA. Ambos se asociaron con la dilatación auricular; sin embargo, en el análisis multivariado, tras ajustar por edad, diabetes mellitus, hipertensión arterial, insuficiencia renal crónica, fracción de eyección, dilatación auricular y tratamiento con IECA/ARA-II y estatinas, los AGE fluorescentes y el sRAGE persistieron como marcadores independientes de FA en pacientes con IC.

En nuestro estudio no encontramos diferencias entre el porcentaje de FA en diabéticos (34,2%) vs no diabéticos (40,7%) [$p=0,522$]. De todas formas conviene señalar que se trataba de pacientes con IC, patología que se asocia también a la FA, con una coexistencia de ambas hasta en 1/3 de los pacientes con IC y un claro empeoramiento del pronóstico de dicho síndrome. Además solamente había 38 pacientes diabéticos de los cuales 13 desarrollaron FA. Y se trataba de pacientes con un control metabólico muy bueno (66,0% con cifras de hemoglobina glicada $< 7\%$). Así si nos centramos en pacientes con mal control glucémico, considerando como tal hemoglobina glicada $\geq 7,5\%$, hasta un 69,2% de los pacientes se encontraban en FA, frente a un 16,0% de los que tenían valores de hemoglobina glicada $< 7,5\%$ ($p=0,005$).

Analizando de forma independiente en diabéticos frente a no diabéticos la asociación del eje AGE-RAGE con la FA, encontramos que los AGE fluorescentes se asocian con la FA fundamentalmente a expensas del grupo de pacientes no diabéticos, en donde las diferencias son más marcadas, sin alcanzar significación estadística en el grupo de no diabéticos. La explicación que le atribuimos a tal resultado es que en pacientes no diabéticos la elevación de los AGE traduce directamente un alto estrés oxidativo, mientras que en pacientes diabéticos se entremete la hiperglucemia mantenida. En cuanto al sRAGE, las diferencias en su concentración plasmática en cuanto al ritmo mantuvieron su significación estadística tanto en diabéticos como en no diabéticos, traduciendo un remodelado atrial.

Así hemos propuesto la hipótesis del eje AGE-RAGE como vínculo de unión entre la inflamación y la hiperglucemia mantenida con la patogénesis de la FA^{295,296}. Ambas situaciones conducen a un estado de alto estrés oxidativo, con la subsiguiente formación de grupos carbonilo reactivos y los AGE^{90,91}. Los AGE alteran las propiedades estructurales y funcionales de la matriz extracelular por su unión directa a éstas²²⁷⁻²²⁹. Además la unión de AGE con su receptor RAGE pone en marcha una cascada de citocinas y factores de crecimiento que confluyen en la fibrosis atrial, fomentando la situación de inflamación crónica y estrés oxidativo y retroalimentando la formación de los AGE¹³²⁻¹³⁶. En este contexto de remodelado estructural, la actividad de las metaloproteasas aumenta los niveles del sRAGE por cribado celular (cRAGE). Esto explicaría la asociación del sRAGE y los AGE con la dilatación auricular (remodelado auricular estructural) y con la fibrilación auricular (remodelado auricular arritmogénico).



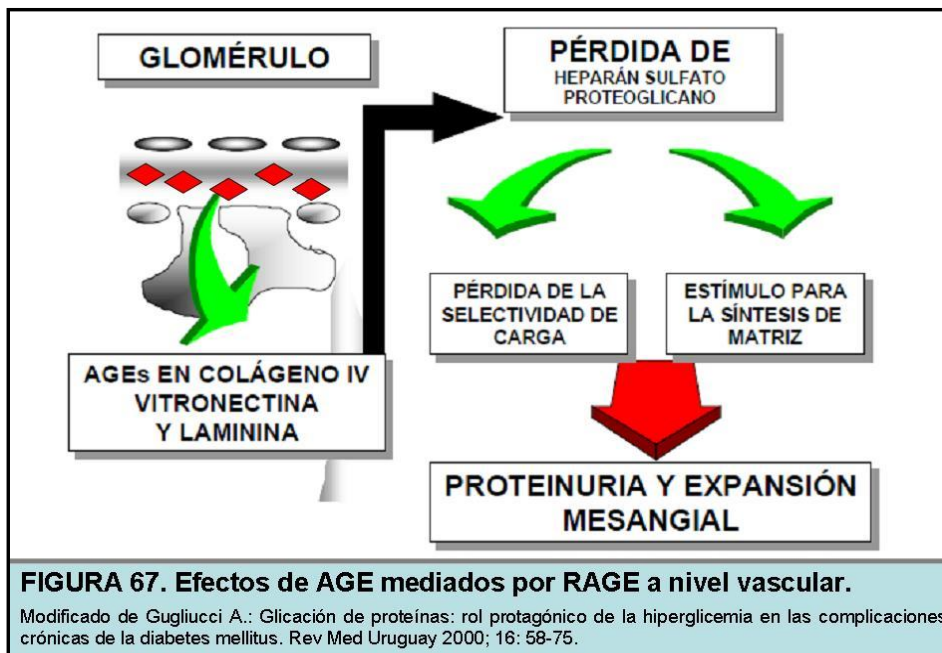
En la actualidad hay una gran evidencia de la presencia de altos niveles de AGE en pacientes con estados inflamatorios crónicos. Una de las posibles explicaciones podría ser la activación del eje AGE-RAGE. Además, diversos estudios han avalado el papel protector de los IECA/ARA-II³⁷⁹ así como de las estatinas³⁸⁰ para la prevención de la FA. Ambos tipos de fármacos se ha visto que

reducen los niveles plasmáticos de AGE, y por tanto la actividad del eje AGE-RAGE, mecanismo que en parte ayudaría a entender los efectos antiarritmogénicos de dichos fármacos en la FA^{329, 381-383}.

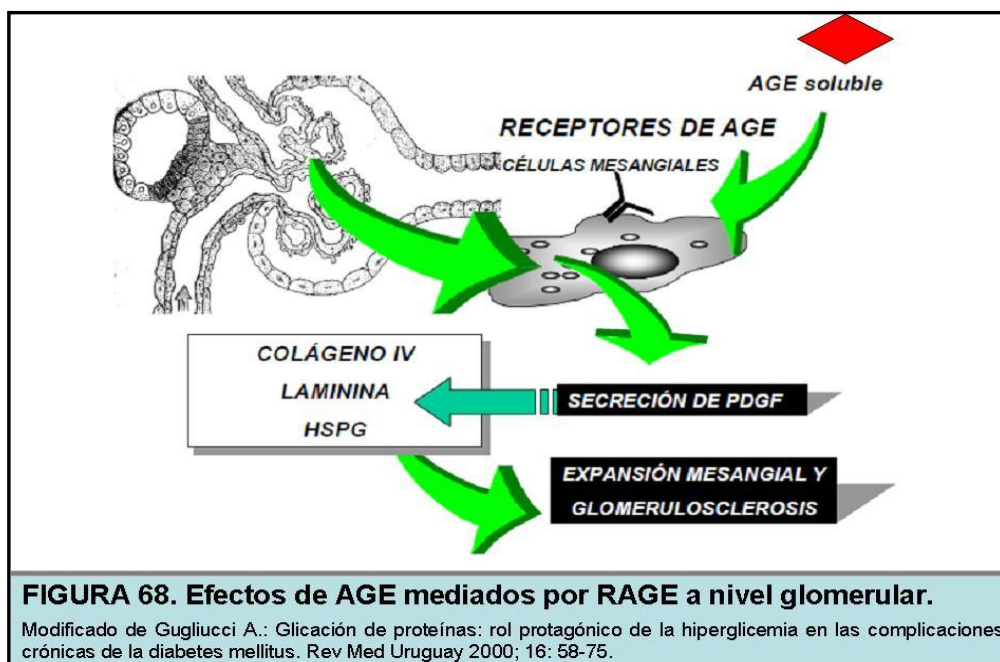
5.2.6. EJE AGE-RAGE E INSUFICIENCIA RENAL

Los AGE son moléculas potencialmente lesivas para el riñón, fundamentalmente a través de los procesos de aterosclerosis y glomerulosclerosis. A su vez, la insuficiencia renal es una causa de elevación de los niveles plasmáticos de AGE.

Ya sea mediante la alteración directa de la estructura y función proteica a nivel del mesangio glomerular, como a través de la activación de su receptor celular y todas las cascadas moleculares posteriores que conducen a la producción de radicales libres de oxígeno, los AGE pueden inducir alteración de la función renal³⁸⁴. De hecho, la aminoguanidina, un inhibidor de la formación de glicación proteica, reduce la acumulación de dichas proteínas en el riñón y retarda el desarrollo de albuminuria y proliferación mesangial^{316, 383}.



La unión de AGE en la laminina (una proteína estructural dominante de la matriz extracelular), causa también trastornos en el autoensamblaje de la membrana basal glomerular (MBG)³⁸⁴. Esto, a su vez, compromete la integración en esta superestructura de los otros componentes principales del andamiaje molecular que la componen, a saber, el colágeno tipo IV y los proteoglicanos tales como el heparán sulfato^{385,386}. Es importante destacar aquí que el heparán sulfato proteoglicano (HSPG) es precisamente la molécula clave que proporciona la carga negativa de la MBG³⁸⁷; su pérdida es, por sí misma, el factor dominante que facilita el filtrado de las proteínas del plasma y la proteinuria resultante³⁸⁸. En pocas palabras, la modificación por AGEs de las proteínas de la membrana basal glomerular podría explicar la disminución observada de HSPG en los glomérulos del diabético, que no sólo resulta en proteinuria, sino que se ha mostrado que estimula la superproducción compensatoria de otros componentes de la matriz en la pared del vaso. Esto proporciona un elegante sustento molecular a la patogenia de la clásica nefropatía diabética de Kimmelstiel-Wilson³⁸⁹.



Los RAGE también se han descrito en las células mesangiales glomerulares³⁹⁰. Al ser activados, estos receptores estimulan la secreción del factor de crecimiento plaquetario que seguidamente media la producción de colágeno tipo IV, laminina y

HSPG³⁹¹. Es de destacar que en experimentación animal la administración crónica de AGEs a ratas sanas y euglicémicas conduce a la glomerulosclerosis focal, a la expansión mesangial y a la proteinuria, en una palabra reproduce la neuropatía diabética pero en normoglicemia³⁹². La existencia de polimorfismos en los genes que codifican los receptores de AGEs o los mecanismos de transducción de estas señales, o ambos, podría explicar las conocidas variaciones individuales en la incidencia de complicaciones en individuos con niveles de glicemia comparables³⁹³.

A su vez, el *turnover in vivo* de los AGE depende de la depuración renal. De ahí que sean numerosos los estudios que muestren un acúmulo de AGE en pacientes con insuficiencia renal, sean o no diabéticos^{97,316}. En base a los datos disponibles, se admite actualmente que los macrófagos tisulares, gracias a su sistema receptor de AGE, representan su principal mecanismo de degradación, liberando pequeños péptidos-AGE solubles asociados a la proteólisis de los componentes de la matriz extracelular³⁹⁴. Su concentración depende de la tasa de los AGE en el tejido concernido y de la actividad de los sistemas depuradores dependientes e independientes de los receptores³⁹⁵. Estos productos de degradación de los AGE son liberados en la circulación para ser depurados por el riñón, estando la tasa de los péptidos AGE en correlación con el nivel de la función renal³⁹⁶.

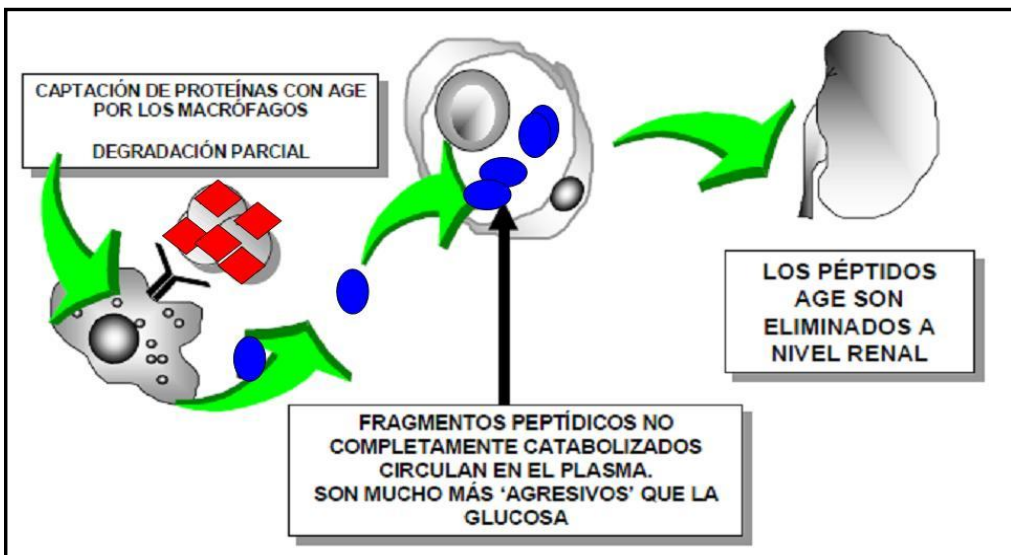


FIGURA 69. Metabolismo y degradación de los AGE.

Modificado de Gugliucci A.: Glicación de proteínas: rol protagónico de la hiperglicemia en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. Rev Med Uruguay 2000; 16: 58-75.

A los AGE fluorescente se les puede considerar como un biomarcador de utilidad en la estratificación del riesgo en la IC crónica, permitiéndonos identificar en dicha población a pacientes con insuficiencia renal manifiesta o enfermedad renal oculta, en los cuales habría que insistir en el óptimo control de riesgo cardiovascular.

En nuestro trabajo se analizó la capacidad de los AGE fluorescentes circulantes en el plasma como marcadores de disfunción renal en pacientes con IC, con independencia de si su concentración plasmática es causa o consecuencia de la insuficiencia renal. Se observó que los AGE fluorescentes se correlacionaba de forma directa con la creatinina ($r=0,685$, $p<0,001$) y de forma inversa con la tasa de filtrado glomerular estimada mediante MDRD-4 ($r=-0,720$, $p<0,001$), siendo el área bajo la curva para la detección de disfunción renal (filtrado glomerular < 60 ml/min/1,73 m²) de 0.846 (IC 95%: 0,761-0,932), con una sensibilidad y especificidad del 82,1% y 82,7% para el punto de corte de 67 AU obtenido mediante las curvas ROC. En el análisis multivariado, los AGE fluorescentes mantuvieron su poder discriminativo para el diagnóstico de insuficiencia renal en pacientes con IC, tras ajustar por edad, sexo, diabetes, hipertensión, fracción de eyección y niveles de hemoglobina. Además se vió que para la detección de enfermedad renal oculta los AGE fluorescentes también presentaban una óptima capacidad diagnóstica, siendo superiores a otro marcador tal como la cistatina C.

5.3. GLICACIÓN AVANZADA Y DISFUNCIÓN MIOCÁRDICA

Los AGE, ya sea mediante unión proteica directa, como mediante interacción con el RAGE, conducen a la disfunción miocárdica, generando tanto disfunción diastólica como sistólica.

En nuestro trabajo solamente se valoró la función diastólica en 52 pacientes, encontrándose una tendencia creciente en los niveles de los AGE y del sRAGE a medida que se progresaba en el grado de disfunción diastólica, aunque solamente era estadísticamente significativas las diferencias halladas para el sRAGE. Dado

que este no era el objetivo principal del proyecto, no se realizó un análisis detallado de esa relación (fallo diastólico y eje AGE-RAGE) ni se comparó con un grupo control sin disfunción diastólica. De ahí que los resultados deban interpretarse con cautela.

En relación con la disfunción sistólica no se encontraron diferencias significativas en cuanto a los AGE fluorescentes, pero si en cuanto al sRAGE (mayor en los pacientes con FEVI $\leq 45\%$). Esto concuerda con los resultados del estudio de Koyama y colaboradores, en donde tampoco se asoció la pentosidina con la FEVI. Quizá la explicación radique en que, el grupo de pacientes en donde se trata de asociar la disfunción sistólica con la concentración sérica de los AGE, presenta en su totalidad disfunción diastólica, con niveles de los AGE basalmente alterados, lo que condiciona las diferencias encontradas.

En este proyecto de tesis se presentaron también los resultados de un trabajo en el que se asociaron los AGE fluorescentes con el desarrollo de IC post-infarto. Hemos visto que altos niveles de AGE (por encima de la mediana) multiplicaban por 5 el riesgo de desarrollar IC durante el seguimiento, independientemente de la edad del paciente, de la presencia de DM así como de los niveles de otros parámetros glucémicos, de la gravedad del infarto (en términos de disfunción ventricular y pico de troponina I) y de otros biomarcadores como el NT-proBNP. La explicación radica en el proceso de remodelado miocárdico. En base a los hallazgos experimentales, resulta bastante consistente hipotetizar que en el miocardio post-infartado el proceso de remodelación va a ver acelerado por el eje AGE-RAGE, generando un círculo de retroalimentación que autopotenciaría sus efectos nocivos. De hecho, varios estudios relacionan el eje renina-angiotensina-aldosterona, un sistema de gran relevancia en el remodelado ventricular y cuyas implicaciones fisiopatológicas han sido ampliamente demostradas, con el eje AGE-RAGE. Así se sabe que los inhibidores de la enzima convertidor de angiotensina (IECA) y los antagonistas del receptor de angiotensina II (ARA-II) reducen los niveles de AGE plasmáticos. En contrapartida, también se ha demostrado que los AGE promueven la formación de angiotensina II. Todo ello realza el papel que pueden jugar los AGE en la génesis de IC post-infarto, siendo piezas clave del remodelado ventricular. Sin embargo, en base a nuestro

conocimiento y hasta la fecha, ningún trabajo –con la excepción del nuestro– había determinado si los niveles de AGE se relacionaban o no con el desarrollo de IC post-infarto.

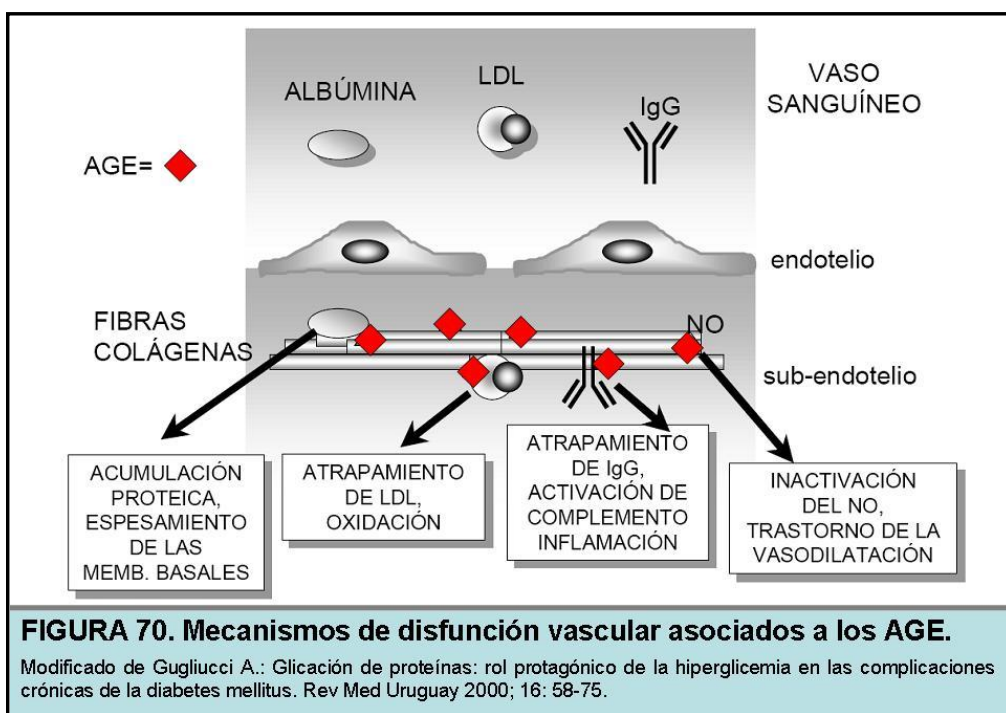
5.5. GLICACIÓN AVANZADA Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

La AGE contribuyen a la disfunción endotelial directamente, mediante la modificación permanente de las proteínas de la matriz extracelular, e indirectamente, mediante la señalización intracelular desencadenada a través de los RAGE.

La presencia de AGEs modifica las características funcionales de diversas moléculas clave de la matriz extracelular. El colágeno fue la primera de dichas proteínas en las que se demostró la existencia de enlaces intermoleculares covalentes producidos por los AGEs, con una tendencia a la reticulación de las fibras en forma anárquica, todo lo cual redundaba en una fibrosis patológica cuya principal consecuencia es la reducción de la distensibilidad^{184,185}. Así, en ratas diabéticas, por ejemplo, se ha demostrado que los AGEs provocan la disminución de la elasticidad en arterias y arteriolas²⁰².

Mediante la unión a su receptor, los AGE llevan a cabo una serie de acciones con repercusión vascular de forma indirecta. Así, estimulan la producción por los macrófagos de la interleuquina-1, del factor de crecimiento I, del factor de necrosis tumoral alfa y del factor estimulante de colonias de granulocitos¹³²⁻¹³⁶. Dicha estimulación alcanza los niveles que se ha demostrado aumentan la síntesis glomerular del colágeno tipo IV y la proliferación de macrófagos y células de músculo liso arterial³⁹⁵⁻³⁹⁷. Así mismo se ha probado también que los AGE median la transducción de señales a través de la generación de radicales libres del oxígeno (ROS)⁸⁸. Estos radicales luego activan el factor de transcripción NF- κ B, siendo éste un gran coordinador multifacético de numerosos procesos patológicos¹³⁷⁻¹⁴³. Uno de ellos, la disminución rápida de la actividad de la trombomodulina impide la activación de la vía de la proteína C (un agente anticoagulante capital)¹⁹²⁻¹⁹⁴. El otro cambio pro-coagulante inducido por la

activación de RAGE es un aumento en la actividad del factor tisular (vía extrínseca), que activa los factores de la coagulación IX y X y la agregación directa del factor VIIa³⁹⁸. En conjunto, estas alteraciones en la función de la célula endotelial, provocadas por los AGEs, favorecerían la formación de trombos en los sitios de acumulación extracelular de dichos AGEs.

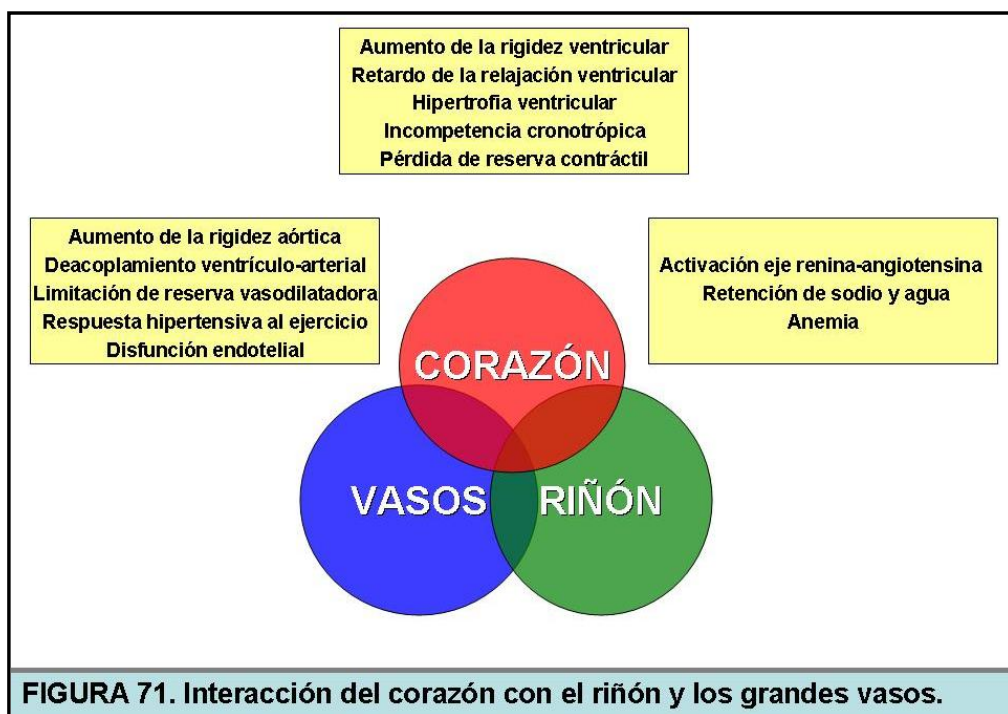


Hogan y colaboradores (1992) describieron que los AGE son capaces de reaccionar con el NO producido por las células endoteliales por lo que los efectos antiproliferativos que tiene el NO sobre las células musculares lisas y sobre las células mesangiales del riñón se ven afectados así como el proceso de relajación vascular³⁹⁹. En el 2003, Xu y colaboradores estudiaron los efectos de los AGE, tanto *in vivo* como *in vitro*, en conejo. Sus resultados demuestran que los AGE (albúmina glicada producida en el laboratorio) disminuyen la producción de NO en las células endoteliales aisladas de arterias femorales⁴⁰⁰. Así mismo, trabajando con anillos aórticos aislados incubados con AGEs, la respuesta a acetilcolina estuvo disminuída en un 50% comparada con los controles y con los anillos tratados con la proteína sin modificar, la cual no tuvo efecto sobre la relajación vascular⁴⁰¹.

También fue demostrado, en un estudio experimental en ratas, que la aminoguanidina, un inhibidor de la formación de productos avanzados de la glicación, restaura parcialmente la relajación dependiente de endotelio *in vivo*⁴⁰² y reduce la albuminuria asociada a hipertensión³⁸³, retardando el desarrollo de la nefropatía diabética.

En nuestro estudio probamos como la albúmina glicada puede generar disfunción endotelial mediante la génesis de radicales libres de oxígeno, la activación del factor nuclear NF-KB y la alteración de la producción del óxido nítrico, todo ello sobre células endoteliales en cultivo.

Todo ello refuerza, aún más si cabe, el papel fisiopatológico de los productos de glicación avanzada en la patología vascular, y entrecruza las implicaciones de dichas moléculas en los procesos patológicos de los grandes y pequeños vasos, así como de órganos tales como el corazón y el riñón.



LIMITACIONES

A pesar del impacto y entusiasmo que pueden generar nuestros resultados, somos conscientes de las limitaciones que tiene nuestro estudio y que se deben de tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados. Principalmente se debe considerar que nuestra población de estudio, que incluía a todos los pacientes que de forma consecutiva fueron valorados por primera vez en la consulta de insuficiencia cardíaca tras un ingreso previo por descompensación de su fallo cardíaco. Dicha población fue sometida a unos criterios de inclusión/exclusión muy estrictos, para eliminar posibles interacciones entre el eje AGE-RAGE y otras variables confusoras (procesos inflamatorios y tumorales, insuficiencia renal, arteriopatía periférica,...). Esto supuso una reducción importante del tamaño muestral (n=108 pacientes), condicionando la potencia estadística de los análisis realizados.

En la investigación no se analizaron de forma global parámetros ecocardiográficos relativos al remodelado ventricular que podrían ser de interés (medidas de volúmenes telesistólico/telediastólico), ni tampoco se valoró de forma sistemática la función diastólica.

Por otro lado en nuestro trabajo los AGE se midieron de forma global (espectrometría de fluorescencia), sin especificar el tipo de AGE analizado (pentosidina, carboximetil-lisina...), lo mismo que el sRAGE (ELISA), sin distinguir entre el esRAGE y el cRAGE. Así mismo tampoco se midieron parámetros analíticos indicadores del grado de estrés oxidativo, lo que permitiría valorar su asociación con los niveles de AGE y sRAGE.

A pesar de todas estas limitaciones, consideramos que este trabajo mantiene las implicaciones fisiopatológicas y clínicas expuestas, siendo de una gran perspectiva de futuro en cuanto a próximas investigaciones en el tema.

CONCLUSIONES

Los productos de glicación avanzada (AGE) son moléculas implicadas en el desarrollo y la evolución de la insuficiencia cardíaca (IC), con implicaciones pronósticas en los pacientes con dicha patología, al igual que su receptor soluble (indicador del daño tisular producido por la glicación).

- Altas concentraciones de AGE predicen el desarrollo de IC post-infarto agudo de miocardio.
- Los AGE son capaces de generar disfunción endotelial mediante la alteración de la producción de óxido nítrico y la génesis de radicales libres.
- En pacientes con IC, los niveles de AGE fluorescente son un marcador de disfunción renal.
- La glicación avanzada está implicada en el remodelado estructural de la aurícula izquierda, correlacionándose positivamente con sus dimensiones y relacionándose con su capacidad arritmogénica (fibrilación auricular).
- El receptor soluble sRAGE, además de asociarse con la fibrilación auricular y la insuficiencia renal, se relaciona con la etiología isquémica de la IC así como con su severidad.
- Tanto los AGE como sRAGE se asocian a un peor curso evolutivo en los pacientes con IC estable.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 2007 Sep;93(9):1137-46. Review
2. Otero-Raviña F, Grigorian-Shamagian L, Fransi-Galiana L, Názara-Otero C, Fernández-Villaverde JM, del Alamo-Alonso A, Nieto-Pol E, de Santiago-Boullón M, López-Rodríguez I, Cardona-Vidal JM, Varela-Román A, González-Juanatey JR; GALICAP study investigators. Galician study of heart failure in primary care (GALICAP Study). *Rev Esp Cardiol*. 2007 Apr;60(4):373-83.
3. Cheng S, Vasan RS. Advances in the epidemiology of heart failure and left ventricular remodeling. *Circulation*. 2011 Nov 15;124(20):e516-9.
4. Shah AM, Mann DL. In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science. *Lancet*. 2011 Aug 20;378(9792):704-12. Review.
5. Poole-Wilson PA. History, Definition and Classification of Heart Failure. *Heart Failure 1* New York: Churchill Livingstone; 1997. p269–277.
6. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Strömberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J*. 2008 Oct;29(19):2388-442.
7. McDonagh TA, Morrison CE, Lawrence A, Ford I, Tunstall-Pedoe H, McMurray JJ, Dargie HJ. Symptomatic and asymptomatic left-ventricular systolic dysfunction in an urban population. *Lancet*. 1997 Sep 20;350(9081):829-33.
8. Wang TJ, Evans JC, Benjamin EJ, Levy D, LeRoy EC, Vasan RS. Natural history of asymptomatic left ventricular systolic dysfunction in the community. *Circulation*. 2003 Aug 26;108(8):977-82.
9. Pazos-López P, Peteiro-Vázquez J, Carcía-Campos A, García-Bueno L, de Torres JP, Castro-Beiras A. The causes, consequences, and treatment of left or right heart failure. Relationship between left and right ventricular ejection fractions in chronic advanced systolic heart failure: insights from the BEST trial. *Vasc Health Risk Manag*. 2011;7:237-54.
10. Desai RV, Meyer P, Ahmed MI, Mujib M, Adamopoulos C, White M, Aban IB, Iskandrian AE, Ahmed A. Assessment of right and left heart interactions: application of the resistance ratio in chronic congestive heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2011 Apr;13(4):392-7.
11. Aurigemma GP, Gaasch WH. Clinical practice. Diastolic heart failure. *N Engl J Med*. 2004 Sep 9;351(11):1097-105.
12. Brutsaert DL, De Keulenaer GW. Diastolic heart failure: a myth. *Curr Opin Cardiol*. 2006 May;21(3):240-8.
13. De Keulenaer GW, Brutsaert DL. Diastolic heart failure: a separate disease or selection bias? *Prog Cardiovasc Dis*. 2007 Jan-Feb;49(4):275-83.
14. How to diagnose diastolic heart failure. European Study Group on Diastolic Heart Failure. *Eur Heart J*. 1998 Jul;19(7):990-1003.
15. Cowie MR, Mosterd A, Wood DA, Deckers JW, Poole-Wilson PA, Sutton GC, Grobbee DE. The epidemiology of heart failure. *Eur Heart J*. 1997 Feb;18(2):208-25.
16. Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK, Murabito JM, Vasan RS. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med*. 2002 Oct 31;347(18):1397-402.
17. Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Thompson SG, Poole-Wilson PA, Suresh V, Sutton GC. Incidence and aetiology of heart failure; a population-based study. *Eur Heart J*. 1999 Mar;20(6):421-8.

18. Murdoch DR, Love MP, Robb SD, McDonagh TA, Davie AP, Ford I, Capewell S, Morrison CE, McMurray JJ. Importance of heart failure as a cause of death. Changing contribution to overall mortality and coronary heart disease mortality in Scotland 1979–1992. *Eur Heart J*. 1998 Dec;19(12):1829-35.
19. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 2006 Jul 20;355(3):251-9.
20. Aronow WS. Epidemiology, pathophysiology, prognosis, and treatment of systolic and diastolic heart failure. *Cardiol Rev*. 2006 May-Jun;14(3):108-24.
21. Lee DS, Gona P, Vasan RS, Larson MG, Benjamin EJ, Wang TJ, Tu JV, Levy D. Relation of disease pathogenesis and risk factors to heart failure with preserved or reduced ejection fraction: insights from the framingham heart study of the national heart, lung, and blood institute. *Circulation*. 2009 Jun 23;119(24):3070-7.
22. Fox KF, Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Gibbs JS, Underwood SR. Coronary artery disease as the cause of incident heart failure in the population. *Eur Heart J*. 2001 Feb;22(3):228-36.
23. Stewart S, Jenkins A, Buchan S, McGuire A, Capewell S, McMurray JJ. The current cost of heart failure to the National Health Service in the UK. *Eur J Heart Fail*. 2002 Jun;4(3):361-71.
24. Senni M, Tribouillois CM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ, Evans JM, Bailey KR, Redfield MM. Congestive heart failure in the community: trends in incidence and survival in a 10-year period. *Arch Intern Med*. 1999 Jan 11;159(1):29-34.
25. Blackledge HM, Tomlinson J, Squire IB. Prognosis for patients newly admitted to hospital with heart failure: survival trends in 12 220 index admissions in Leicestershire 1993–2001. *Heart*. 2003 Jun;89(6):615-20.
26. MacIntyre K, Capewell S, Stewart S, Chalmers JW, Boyd J, Finlayson A, Redpath A, Pell JP, McMurray JJ. Evidence of improving prognosis in heart failure: trends in case fatality in 66 547 patients hospitalized between 1986 and 1995. *Circulation*. 2000 Sep 5;102(10):1126-31.
27. Schaefelberger M, Swedberg K, Koster M, Rosen M, Rosengren A. Decreasing one-year mortality and hospitalization rates for heart failure in Sweden; data from the Swedish Hospital Discharge Registry 1988 to 2000. *Eur Heart J*. 2004 Feb;25(4):300-7.
28. Bhatia RS, Tu JV, Lee DS, Austin PC, Fang J, Haouzi A, Gong Y, Liu PP. Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study. *N Engl J Med*. 2006 Jul 20;355(3):260-9.
29. Mann DL. Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach. *Circulation*. 1999 Aug 31;100(9):999-1008.
30. Hasking GJ, Esler MD, Jennings GL, Burton D, Korner PI. Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation*. 1986;73:615– 621.
31. Mann DL. Basic mechanisms of disease progression in the failing heart: the role of excessive adrenergic drive. *Prog Cardiovasc Dis*. 1998 Jul-Aug;41(1 Suppl 1):1-8.
32. Mann DL, Bristow MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation*. 2005 May 31;111(21):2837-49.
33. Cerqueira-Gomes M. Pathogenesis of heart failure--2000. *Rev Port Cardiol*. 2000 May;19(5):523-9.
34. Kane GC, Karon BL, Mahoney DW, Redfield MM, Roger VL, Burnett JC Jr, Jacobsen SJ, Rodeheffer RJ. Progression of left ventricular diastolic dysfunction and risk of heart failure. *JAMA*. 2011 Aug 24;306(8):856-63.
35. Dhalla NS, Saini-Chohan HK, Rodriguez-Leyva D, Elimban V, Dent MR, Tappia PS. Subcellular remodelling may induce cardiac dysfunction in congestive heart failure. *Cardiovasc Res*. 2009 Feb 15;81(3):429-38. Epub 2008 Oct 13.

36. Reinhardt D, Sigusch HH, Hensse J, Tyagi SC, Körfer R, Figulla HR. Cardiac remodelling in end stage heart failure: upregulation of matrix metalloproteinase (MMP) irrespective of the underlying disease, and evidence for a direct inhibitory effect of ACE inhibitors on MMP. *Heart*. 2002 Nov;88(5):525-30.
37. Mann DL, Bogaev R, Buckberg GD. Cardiac remodelling and myocardial recovery: lost in translation? *Eur J Heart Fail*. 2010 Aug;12(8):789-96.
38. Mann DL. Fisiopatología de la insuficiencia cardíaca. En Braunwald E. *Tratado de Cardiología*. Elsevier; 2009. p541–560.
39. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW. 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation*. 2009 Apr 14;119(14):e391-479.
40. Packer M. The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1992;20:248–254
41. Schrier RW, Abraham WT. Hormones and hemodynamics in heart failure. *N Engl J Med*. 1999 Aug 19;341(8):577-85.
42. Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Nov 3;54(19):1747-62.
43. Francis GS. The relationship of the sympathetic nervous system and the renin-angiotensin system in congestive heart failure. *Am Heart J*. 1989 Sep;118(3):642-8.
44. Cadnapaphornchai MA, Gurevich AK, Weinberger HD, Schrier RW. Pathophysiology of sodium and water retention in heart failure. *Cardiology*. 2001;96(3-4):122-31.
45. Dube P, Weber KT. Congestive heart failure: pathophysiologic consequences of neurohormonal activation and the potential for recovery: part I. *Am J Med Sci*. 2011 Nov;342(5):348-51.
46. Dube P, Weber KT. Congestive Heart Failure: Pathophysiologic Consequences of Neurohormonal Activation and the Potential for Recovery: Part II. *Am J Med Sci*. 2011 Dec;342(6):503-6.
47. Wollert KC, Drexler H. The renin-angiotensin system and experimental heart failure. *Cardiovasc Res*. 1999 Sep;43(4):838-49.
48. Lijnen P, Petrov V. Renin-angiotensin system, hypertrophy and gene expression in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1999 May;31(5):949-70.
49. Margulies K, House SR. Myocyte abnormalities in human heart failure. In Mann DL (ed): *Heart Failure: A Companion to Braunwald's Heart Disease*. Philadelphia, Saunders, 2003, pp 41-56
50. Mann DL. Basic mechanisms of left ventricular remodeling: the contribution of wall stress. *J Card Fail*. 2004 Dec;10(6 Suppl):S202-6.
51. Mann DL. Left ventricular size and shape: determinants of mechanical signal transduction pathways. *Heart Fail Rev*. 2005 Jun;10(2):95-100.
52. Singh VP, Le B, Khode R, Baker KM, Kumar R. Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis. *Diabetes*. 2008 Dec;57(12):3297-306.
53. Houser SR, Margulies KB: Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure? *Circ Res*. 2003 Mar 7;92(4):350-8.
54. Deschamps AM, Spinale FG. Matrix modulation and heart failure: new concepts question old beliefs. *Curr Opin Cardiol*. 2005 May;20(3):211-6.

55. Pelouch V, Dixon IM, Sethi R, Dhalla NS. Alteration of collagenous protein profile in congestive heart failure secondary to myocardial infarction. *Mol Cell Biochem.* 1993 Dec 22;129(2):121-31.
56. Weber KT, Brilla CG, Janicki JS. Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res.* 1993 Mar;27(3):341-8.
57. Janicki JS, Brower GL, Henegar JR, Wang L. Ventricular remodeling in heart failure: the role of myocardial collagen. *Adv Exp Med Biol.* 1995;382:239-45. Review.
58. Janicki JS, Brower GL. The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. *J Card Fail.* 2002 Dec;8(6 Suppl):S319-25.
59. Catena C, Colussi G, Marzano L, Sechi LA. Aldosterone and the Heart: From Basic Research to Clinical Evidence. *Horm Metab Res.* 2011 Nov 17.
60. Kapur NK. Transforming growth factor- β : governing the transition from inflammation to fibrosis in heart failure with preserved left ventricular function. *Circ Heart Fail.* 2011 Jan;4(1):5-7.
61. Spinale FG, Coker ML, Heung LJ, Bond BR, Gunasinghe HR, Etoh T, Goldberg AT, Zellner JL, Crumbley AJ. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation.* 2000 Oct 17;102(16):1944-9.
62. Deschamps AM, Spinale FG. Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc Res.* 2006 Feb 15;69(3):666-76.
63. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res.* 2002 Mar 22;90(5):520-30.
64. Sun M, Chen M, Dawood F, Zurawska U, Li JY, Parker T, Kassiri Z, Kirshenbaum LA, Arnold M, Khokha R, Liu PP. Tumor necrosis factor- α mediates cardiac remodeling and ventricular dysfunction after pressure overload state. *Circulation.* 2007 Mar 20;115(11):1398-407.
65. Kannel WB. Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart Fail Rev.* 2000 Jun;5(2):167-73.
66. Nieminen MS, Brutsaert D, Dickstein K, Drexler H, Follath F, Harjola VP, Hochadel M, Komajda M, Lassus J, Lopez-Sendon JL, Ponikowski P, Tavazzi L; EuroHeart Survey Investigators; Heart Failure Association, European Society of Cardiology. EuroHeart Failure Survey II (EHFS II): a survey on hospitalized acute heart failure patients: description of population. *Eur Heart J.* 2006 Nov;27(22):2725-36. Epub 2006 Sep 25.
67. Maillard LC. Action des acides amines sur les sucres: formation des malanodines par voie methodique. *C R Acad Sci* 1912; 154: 66-8.
68. Tessier FJ. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathol Biol (Paris).* 2010 Jun;58(3):214-9.
69. Horvat S, Jakas A. Peptide and amino acid glycation: new insights into the Maillard reaction. *J Pept Sci.* 2004 Mar;10(3):119-37.
70. Valencia JV, Weldon SC, Quinn D, Kiers GH, DeGroot J, TeKoppele JM, Hughes TE. Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics. *Anal Biochem.* 2004 Jan 1;324(1):68-78.
71. Baynes JW, Thorpe SR, Murtiashaw MH. Nonenzymatic glucosylation of lysine residues in albumin. *Methods Enzymol.* 1984;106:88-98.
72. Brownlee M. Negative consequences of glycation. *Metabolism.* 2000 Feb;49(2 Suppl 1):9-13.
73. Grandhee SK, Monnier VM. Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine. Glucose, fructose, and ascorbate as pentosidine precursors. *J Biol Chem.* 1991 Jun 25;266(18):11649-53.

74. Cohen MP. Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin. *Arch Biochem Biophys*. 2003 Nov 1;419(1):25-30..
75. Smith PR, Thornalley PJ. Mechanism of the degradation of nonenzymatically glycated proteins under physiological conditions. Studies with the model fructosamine, N epsilon-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)hippuryl-lysine. *Eur J Biochem*. 1992 Dec 15;210(3):729-39.
76. Schalkwijk CG, Miyata T. Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics. *Amino Acids*. 2010 Oct 20.
77. Koga M, Kasayama S. Clinical impact of glycated albumin as another glycemic control marker. *Endocr J*. 2010;57(9):751-62..
78. Shaklai N, Garlick RL, Bunn HF. Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *J Biol Chem*. 1984 Mar 25;259(6):3812-7.
79. Chen S, Cohen MP, Ziyadeh FN. Amadori-glycated albumin in diabetic nephropathy: pathophysiologic connections. *Kidney Int Suppl*. 2000 Sep;77:S40-4.
80. Cohen MP, Chen S, Ziyadeh FN, Shea E, Hud EA, Lautenslager GT, Shearman CW. Evidence linking glycated albumin to altered glomerular nephrin and VEGF expression, proteinuria, and diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2005 Oct;68(4):1554-61.
81. Furusyo N, Koga T, Ai M, Otokozawa S, Kohzuma T, Ikezaki H, Schaefer EJ, Hayashi J. Utility of glycated albumin for the diagnosis of diabetes mellitus in a Japanese population study: results from the Kyushu and Okinawa Population Study (KOPS). *Diabetologia*. 2011 Dec;54(12):3028-36.
82. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2010 Jan;33 Suppl 1:S62-9.
83. Zhang Q, Ames JM, Smith RD, Baynes JW, Metz TO. A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. *J Proteome Res*. 2009 Feb;8(2):754-69.
84. Moriyama T, Kemi M, Okumura C, Yoshihara K, Horie T. Involvement of advanced glycation end-products, pentosidine and N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine, in doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Toxicology*. 2010 Jan 31;268(1-2):89-97.
85. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med*. 1988 May 19;318(20):1315-21.
86. Miyata T, Wada Y, Cai Z, Iida Y, Horie K, Yasuda Y, Maeda K, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C. Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure. *Kidney Int*. 1997 Apr;51(4):1170-81.
87. Bansal S, Siddarth M, Chawla D, Banerjee BD, Madhu SV, Tripathi AK. Advanced glycation end products enhance reactive oxygen and nitrogen species generation in neutrophils in vitro. *Mol Cell Biochem*. 2011 Nov 3.
88. Li Y, Wang S. Glycated albumin activates NADPH oxidase in rat mesangial cells through up-regulation of p47phox. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jun 18;397(1):5-11.
89. Su J, Lucchesi PA, Gonzalez-Villalobos RA, Palen DI, Rezk BM, Suzuki Y, Boulares HA, Matrougui K. Role of advanced glycation end products with oxidative stress in resistance artery dysfunction in type 2 diabetic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Aug;28(8):1432-8.
90. Cárdenas-León M, Díaz-Díaz E, Argüelles-Medina R, Sánchez-Canales P, Díaz-Sánchez V, Larrea F. Glycation and protein crosslinking in the diabetes and ageing pathogenesis. *Rev Invest Clin*. 2009 Nov-Dec;61(6):505-20.
91. Brownlee M. The pathological implications of protein glycation. *Clin Invest Med*. 1995 Aug;18(4):275-81.
92. Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res*. 2001;56:1-21.

93. Nicholl ID, Bucala R. Advanced glycation endproducts and cigarette smoking. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1998 Nov;44(7):1025-33.
94. Semba RD, Ang A, Talegawkar S, Crasto C, Dalal M, Jardack P, Traber MG, Ferrucci L, Arab L. Dietary intake associated with serum versus urinary carboxymethyl-lysine, a major advanced glycation end product, in adults: the Energetics Study. *Eur J Clin Nutr*. 2011 Jul 27.
95. Hartog JW, Voors AA, Bakker SJ, Smit AJ, van Veldhuisen DJ. Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications. *Eur J Heart Fail*. 2007 Dec;9(12):1146-55.
96. Willemssen S, Hartog JW, Heiner-Fokkema MR, van Veldhuisen DJ, Voors AA. Advanced glycation end-products, a pathophysiological pathway in the cardiorenal syndrome. *Heart Fail Rev*. 2011 Jan 23.
97. Noordzij MJ, Lefrandt JD, Smit AJ. Advanced glycation end products in renal failure: an overview. *J Ren Care*. 2008 Dec;34(4):207-12.
98. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010 Oct 29;107(9):1058-70.
99. Hamada Y, Araki N, Koh N, Nakamura J, Horiuchi S, Hotta N. Rapid formation of advanced glycation end products by intermediate metabolites of glycolytic pathway and polyol pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Nov 12;228(2):539-43.
100. Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J*. 1999 Nov 15;344:109-16.
101. Desai KM, Chang T, Wang H, Banigesh A, Dhar A, Liu J, Untereiner A, Wu L. Oxidative stress and aging: is methylglyoxal the hidden enemy? *Can J Physiol Pharmacol*. 2010 Mar;88(3):273-84. Review.
102. Desai K, Wu L. Methylglyoxal and advanced glycation endproducts: new therapeutic horizons? *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*. 2007 Jun;2(2):89-99. Review.
103. Brouwers O, Niessen PM, Haenen G, Miyata T, Brownlee M, Stehouwer CD, De Mey JG, Schalkwijk CG. Hyperglycaemia-induced impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in rat mesenteric arteries is mediated by intracellular methylglyoxal levels in a pathway dependent on oxidative stress. *Diabetologia*. 2010 May;53(5):989-1000.
104. Ahmed N, Battah S, Karachalias N, Babaei-Jadidi R, Horányi M, Baróti K, Hollan S, Thornalley PJ. Increased formation of methylglyoxal and protein glycation, oxidation and nitrosation in triosephosphate isomerase deficiency. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Oct 15;1639(2):121-32.
105. Kitahara Y, Takeuchi M, Miura K, Mine T, Matsui T, Yamagishi S. Glyceraldehyde-derived advanced glycation end products (AGEs). A novel biomarker of postprandial hyperglycaemia in diabetic rats. *Clin Exp Med*. 2008 Sep;8(3):175-7.
106. Hayase F, Usui T, Nishiyama K, Sasaki S, Shirahashi Y, Tsuchiya N, Numata N, Watanabe H. Chemistry and biological effects of melanoidins and glyceraldehyde-derived pyridinium as advanced glycation end products. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Jun;1043:104-10.
107. Traverso N, Menini S, Maineri EP, Patriarca S, Odetti P, Cottalasso D, Marinari UM, Pronzato MA. Malondialdehyde, a lipoperoxidation-derived aldehyde, can bring about secondary oxidative damage to proteins. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2004 Sep;59(9):B890-5.
108. Kang Z, Li H, Li G, Yin D. Reaction of pyridoxamine with malondialdehyde: mechanism of inhibition of formation of advanced lipoxidation end-products. *Amino Acids*. 2006 Feb;30(1):55-61. Epub 2005 Jul 5.
109. Münch G, Keis R, Wessels A, Riederer P, Bahner U, Heidland A, Niwa T, Lemke HD, Schinzel R. Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1997 Sep;35(9):669-77.

110. Beisswenger PJ, Howell S, Mackenzie T, Corstjens H, Muizzuddin N, Matsui MS. Two Fluorescent Wavelengths, 440(ex)/520(em) nm and 370(ex)/440(em) nm, Reflect Advanced Glycation and Oxidation End Products in Human Skin Without Diabetes. *Diabetes Technol Ther*. 2011 Oct 24.
111. Lapolla A, Basso E, Traldi P. Mass spectrometry of advanced glycation end products. *Adv Clin Chem*. 2005;40:165-217.
112. Ames JM. Mass spectrometry to detect the site specificity of advanced glycation/lipoxidation end-product formation on protein: some challenges and solutions. *Biochem Soc Trans*. 2008 Oct;36(Pt 5):1051-4.
113. Mittelmaier S, Pischetsrieder M. Multistep Ultrahigh Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Analysis for Untargeted Quantification of Glycating Activity and Identification of Most Relevant Glycation Products. *Anal Chem*. 2011 Nov 29.
114. Taneda S, Monnier VM. ELISA of pentosidine, an advanced glycation end product, in biological specimens. *Clin Chem*. 1994 Sep;40(9):1766-73.
115. Zilin S, Naifeng L, Bicheng L, Jiping W. The determination of AGE-peptides by flow injection assay, a practical marker of diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta*. 2001 Nov;313(1-2):69-75.
116. Farmer DG, Kennedy S. RAGE, vascular tone and vascular disease. *Pharmacol Ther*. 2009 Nov;124(2):185-94.
117. Cohen MP, Ziyadeh FN. Amadori glucose adducts modulate mesangial cell growth and collagen gene expression. *Kidney Int*. 1994 Feb;45(2):475-84.
118. Curtiss LK, Witztum JL. A novel method for generating region-specific monoclonal antibodies to modified proteins. Application to the identification of human glucosylated low density lipoproteins. *J Clin Invest*. 1983 Oct;72(4):1427-38.
119. Coussons PJ, Jacoby J, McKay A, Kelly SM, Price NC, Hunt JV. Glucose modification of human serum albumin: a structural study. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(7):1217-27.
120. Wu VY, Shearman CW, Cohen MP. Identification of calnexin as a binding protein for Amadori-modified glycated albumin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jun 15;284(3):602-6.
121. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res*. 1999 Mar 19;84(5):489-97.
122. Hattori Y, Suzuki M, Hattori S, Kasai K. Vascular smooth muscle cell activation by glycated albumin (Amadori adducts). *Hypertension*. 2002 Jan;39(1):22-8.
123. Zhang M, Kho AL, Anilkumar N, Chibber R, Pagano PJ, Shah AM, Cave AC. Glycated proteins stimulate reactive oxygen species production in cardiac myocytes: involvement of Nox2 (gp91phox)-containing NADPH oxidase. *Circulation*. 2006 Mar 7;113(9):1235-43. Epub 2006 Feb 27.
124. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem*. 1992 Jul 25;267(21):14998-5004.
125. Matsumoto S, Yoshida T, Murata H, Harada S, Fujita N, Nakamura S, Yamamoto Y, Watanabe T, Yonekura H, Yamamoto H, Ohkubo T, Kobayashi Y. Solution structure of the variable-type domain of the receptor for advanced glycation end products: new insight into AGE-RAGE interaction. *Biochemistry*. 2008 Nov 25;47(47):12299-311.
126. Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, Noda Y, Imaizumi T. Receptor for advanced glycation end products (RAGE): a novel therapeutic target for diabetic vascular complication. *Curr Pharm Des*. 2008;14(5):487-95.
127. Dattilo BM, Fritz G, Leclerc E, Kooi CW, Heizmann CW, Chazin WJ. The extracellular region of the receptor for advanced glycation end products is composed of two independent structural units. *Biochemistry*. 2007 Jun 12;46(23):6957-70. Epub 2007 May 18.

128. Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto K, Mita K, Takahashi E, Ando A, Inoko H, Ikemura T. Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. *Genomics*. 1994 Sep 15;23(2):408-19.
129. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2002 Feb;14(1):123-8.
130. Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. Novel macrophage receptor for glucose-modified proteins is distinct from previously described scavenger receptors. *J Exp Med*. 1986 Oct 1;164(4):1301-9.
131. Herold K, Moser B, Chen Y, Zeng S, Yan SF, Ramasamy R, Emond J, Clynes R, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) in a dash to the rescue: inflammatory signals gone awry in the primal response to stress. *J Leukoc Biol*. 2007 Aug;82(2):204-12.
132. Lin L. RAGE on the Toll Road? *Cell Mol Immunol*. 2006 Oct;3(5):351-8. Review.
133. Sousa MM, Yan SD, Stern D, Saraiva MJ. Interaction of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) with transthyretin triggers nuclear transcription factor κ B (NF- κ B) activation. *Lab Invest*. 2000 Jul;80(7):1101-10.
134. Dukic-Stefanovic S, Gasic-Milenkovic J, Deuther-Conrad W, Münch G. Signal transduction pathways in mouse microglia N-11 cells activated by advanced glycation endproducts (AGEs). *J Neurochem*. 2003 Oct;87(1):44-55.
135. Liu Y, Liang C, Liu X, Liao B, Pan X, Ren Y, Fan M, Li M, He Z, Wu J, Wu Z. AGEs increased migration and inflammatory responses of adventitial fibroblasts via RAGE, MAPK and NF- κ B pathways. *Atherosclerosis*. 2010 Jan;208(1):34-42.
136. Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood SJ, Björck RJ, Juhasz O, Crow MT, Tilton RG, Denner L. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor- κ B transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes*. 2001 Jun;50(6):1495-504.
137. Gao ZQ, Yang C, Wang YY, Wang P, Chen HL, Zhang XD, Liu R, Li WL, Qin XJ, Liang X, Hai CX. RAGE upregulation and nuclear factor- κ B activation associated with ageing rat cardiomyocyte dysfunction. *Gen Physiol Biophys*. 2008 Sep;27(3):152-8.
138. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem*. 1994 Apr 1;269(13):9889-97.
139. Li Q, Verma IM. NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002 Oct;2(10):725-34.
140. Yamamoto Y, Gaynor RB. I κ B kinases: key regulators of the NF- κ B pathway. *Trends Biochem Sci*. 2004 Feb;29(2):72-9.
141. Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, Krönke M, Ben-Neriah Y, Baeuerle PA. Rapid proteolysis of I κ B- α is necessary for activation of transcription factor NF- κ B. *Nature*. 1993 Sep 9;365(6442):182-5.
142. Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Klötting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt AM, Stern DM, Häring HU, Schleicher E, Nawroth PP. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor- κ B. *Diabetes*. 2001 Dec;50(12):2792-808.
143. Häcker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE*. 2006 Oct 17 (357):13.
144. Rauvala H, Rouhiainen A. RAGE as a receptor of HMGB1 (Amphoterin): roles in health and disease. *Curr Mol Med*. 2007 Dec;7(8):725-34. Review.
145. Donato R. RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins. *Curr Mol Med*. 2007 Dec;7(8):711-24. Review.

146. Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, Tang D, Amin N, Im J, Rutledge R, Lin B, Amoscato AA, Zeh HJ, Lotze MT. RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *J Transl Med*. 2009 Mar 17;7:17. Review.
147. Leclerc E, Fritz G, Weibel M, Heizmann CW, Galichet A. S100B and S100A6 differentially modulate cell survival by interacting with distinct RAGE (receptor for advanced glycation end products) immunoglobulin domains. *J Biol Chem*. 2007 Oct 26;282(43):31317-31.
148. Nogueira-Machado JA, Volpe CM, Veloso CA, Chaves MM. HMGB1, TLR and RAGE: a functional tripod that leads to diabetic inflammation. *Expert Opin Ther Targets*. 2011 Aug;15(8):1023-35. Review.
149. Mosquera JA. Role of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in inflammation. *Invest Clin*. 2010 Jun;51(2):257-68.
150. Alexiou P, Chatzopoulou M, Pegklidou K, Demopoulos VJ. RAGE: a multi-ligand receptor unveiling novel insights in health and disease. *Curr Med Chem*. 2010;17(21):2232-52. Review.
151. Ostendorp T, Leclerc E, Galichet A, Koch M, Demling N, Weigle B, Heizmann CW, Kroneck PM, Fritz G. Structural and functional insights into RAGE activation by multimeric S100B. *EMBO J*. 2007 Aug 22;26(16):3868-78.
152. Xie J, Burz DS, He W, Bronstein IB, Lednev I, Shekhtman A. Hexameric calgranulin C (S100A12) binds to the receptor for advanced glycation end products (RAGE) using symmetric hydrophobic target-binding patches. *J Biol Chem*. 2007 Feb 9;282(6):4218-31.
153. Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Nawroth P, Marshak-Rothstein A, Crow MK, Fitzgerald KA, Latz E, Kiener PA, Coyle AJ. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol*. 2007 May;8(5):487-96.
154. Chavakis T, Bierhaus A, Nawroth PP. RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. *Microbes Infect*. 2004 Nov;6(13):1219-25.
155. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest*. 2001 Oct;108(7):949-55.
156. Frommhold D, Kamphues A, Hepper I, Pruenster M, Lukic IK, Socher I, Zablotskaya V, Buschmann K, Lange-Sperandio B, Schymeinsky J, Ryschich E, Poeschl J, Kupatt C, Nawroth PP, Moser M, Walzog B, Bierhaus A, Sperandio M. RAGE and ICAM-1 cooperate in mediating leukocyte recruitment during acute inflammation in vivo. *Blood*. 2010 Aug 5;116(5):841-9.
157. Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, Nagashima M, Morser J, Arnold B, Preissner KT, Nawroth PP. The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med*. 2003 Nov 17;198(10):1507-15.
158. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jul;6(7):508-19.
159. Orlova VV, Choi EY, Xie C, Chavakis E, Bierhaus A, Ihanus E, Ballantyne CM, Gahmberg CG, Bianchi ME, Nawroth PP, Chavakis T. A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin. *EMBO J*. 2007 Feb 21;26(4):1129-39.
160. Frommhold D, Kamphues A, Dannenberg S, Buschmann K, Zablotskaya V, Tschada R, Lange-Sperandio B, Nawroth PP, Poeschl J, Bierhaus A, Sperandio M. RAGE and ICAM-1 differentially control leukocyte recruitment during acute inflammation in a stimulus-dependent manner. *BMC Immunol*. 2011 Oct 4;12:56.
161. Kalea AZ, Schmidt AM, Hudson BI. RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. *Clin Sci (Lond)*. 2009 Apr;116(8):621-37.

162. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, Yasui K, Takeuchi M, Makita Z, Takasawa S, Okamoto H, Watanabe T, Yamamoto H. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J.* 2003 Mar 15;370(Pt 3):1097-109.
163. Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J.* 2008 May;22(5):1572-80.
164. Santilli F, Vazzana N, Bucciarelli LG, Davì G. Soluble forms of RAGE in human diseases: clinical and therapeutical implications. *Curr Med Chem.* 2009;16(8):940-52.
165. Hudson BI, Carter AM, Harja E, Kalea AZ, Arriero M, Yang H, Grant PJ, Schmidt AM, Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, Reiss K, Saftig P, Bianchi ME. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J.* 2008 Oct;22(10):3716-27.
166. Sárkány Z, Ikonen TP, Ferreira-da-Silva F, Saraiva MJ, Svergun D, Damas AM. Solution structure of the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE). *J Biol Chem.* 2011 Oct 28;286(43):37525-34. Epub 2011 Aug 23.
167. Kalea AZ, Schmidt AM, Hudson BI. Alternative splicing of RAGE: roles in biology and disease. *Front Biosci.* 2011 Jun 1;17:2756-70.
168. Yang SJ, Kim S, Hwang SY, Kim TN, Choi HY, Yoo HJ, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Baik SH, Choi DS, Choi KM. Association between sRAGE, esRAGE levels and vascular inflammation: Analysis with (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Atherosclerosis.* 2011 Nov 16.
169. Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ Jr, Chow WS, Stern D, Schmidt AM. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med.* 1998 Sep;4(9):1025-31.
170. Wendt T, Harja E, Bucciarelli L, Qu W, Lu Y, Rong LL, Jenkins DG, Stein G, Schmidt AM, Yan SF. RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes. *Atherosclerosis.* 2006 Mar;185(1):70-7.
171. Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong LL, Goova MT, Moser B, Kislinger T, Lee DC, Kashyap Y, Stern DM, Schmidt AM. RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation.* 2002 Nov 26;106(22):2827-35.
172. Maillard-Lefebvre H, Boulanger E, Daroux M, Gaxatte C, Hudson BI, Lambert M. Soluble receptor for advanced glycation end products: a new biomarker in diagnosis and prognosis of chronic inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford).* 2009 Oct;48(10):1190-6. Review.
173. Kim JK, Park S, Lee MJ, Song YR, Han SH, Kim SG, Kang SW, Choi KH, Kim HJ, Yoo TH. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and proinflammatory ligand for RAGE (EN-RAGE) are associated with carotid atherosclerosis in patients with peritoneal dialysis. *Atherosclerosis.* 2011 Aug 5.
174. Kalousová M, Hodková M, Kazderová M, Fialová J, Tesar V, Dusilová-Sulková S, Zima T. Soluble receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function. *Am J Kidney Dis.* 2006 Mar;47(3):406-11.
175. Koyama Y, Takeishi Y, Niizeki T, Suzuki S, Kitahara T, Sasaki T, Kubota I. Soluble Receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a prognostic factor for heart failure. *J Card Fail.* 2008 Mar;14(2):133-9.
176. Yamagishi S, Matsui T, Nakamura K. Kinetics, role and therapeutic implications of endogenous soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in diabetes. *Curr Drug Targets.* 2007 Oct;8(10):1138-43.
177. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008 May;4(5):285-93. Review.

178. Ahmed N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005 Jan;67(1):3-21.
179. Cárdenas-León M, Díaz-Díaz E, Argüelles-Medina R, Sánchez-Canales P, Díaz-Sánchez V, Larrea F. Glycation and protein crosslinking in the diabetes and ageing pathogenesis. *Rev Invest Clin.* 2009 Nov-Dec;61(6):505-20.
180. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest.* 1997 Feb 1;99(3):457-68.
181. Ono Y, Aoki S, Ohnishi K, Yasuda T, Kawano K, Tsukada Y. Increased serum levels of advanced glycation end-products and diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 1998 Aug;41(2):131-7.
182. Daroux M, Prévost G, Maillard-Lefebvre H, Gaxatte C, D'Agati VD, Schmidt AM, Boulanger E. Advanced glycation end-products: implications for diabetic and non-diabetic nephropathies. *Diabetes Metab.* 2010 Feb;36(1):1-10. Review.
183. Gul A, Rahman MA, Salim A, Simjee SU. Advanced glycation end-products in senile diabetic and non-diabetic patients with cardiovascular complications. *Age (Dordr).* 2008 Dec;30(4):303-9.
184. Fu MX, Wells-Knecht KJ, Blackledge JA, Lyons TJ, Thorpe SR, Baynes JW. Glycation, glycoxidation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. *Diabetes.* 1994 May;43(5):676-83.
185. Monnier VM, Glomb M, Elgawish A, Sell DR. The mechanism of collagen cross-linking in diabetes: a puzzle nearing resolution. *Diabetes.* 1996 Jul;45 Suppl 3:S67-72.
186. Reddy GK. Cross-linking in collagen by nonenzymatic glycation increases the matrix stiffness in rabbit achilles tendon. *Exp Diabetes Res.* 2004 Apr-Jun;5(2):143-53.
187. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest.* 1997 Feb 1;99(3):457-68.
188. Bras ID, Colitz CM, Kusewitt DF, Chandler H, Lu P, Gemensky-Metzler AJ, Wilkie DA. Evaluation of advanced glycation end-products in diabetic and inherited canine cataracts. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007 Feb;245(2):249-57.
189. Milne R, Brownstein S. Advanced glycation end products and diabetic retinopathy. *Amino Acids.* 2011 Sep 11
190. Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K, Cerami A. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 May 24;91(11):4766-70.
191. Cartledge JJ, Eardley I, Morrison JF. Advanced glycation end-products are responsible for the impairment of corpus cavernosal smooth muscle relaxation seen in diabetes. *BJU Int.* 2001 Mar;87(4):402-7.
192. Sakurai T, Boissel JP, Bunn HF. Non-enzymatic glycation of antithrombin III in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1988 Mar 17;964(3):340-7.
193. Hall PK, Roberts RC. Phosphate promotes glycation of antithrombin III which interferes with heparin binding. *Biochim Biophys Acta.* 1989 Dec 8;993(2-3):217-23.
194. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Inhibition of heparin-catalyzed human antithrombin III activity by nonenzymatic glycosylation. Possible role in fibrin deposition in diabetes. *Diabetes.* 1984 Jun;33(6):532-5.
195. Ferretti G, Rabini RA, Bacchetti T, Vignini A, Salvolini E, Ravaglia F, Curatola G, Mazzanti L. Glycated low density lipoproteins modify platelet properties: a compositional and functional study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 May;87(5):2180-4.
196. Sima AV, Botez GM, Stancu CS, Manea A, Raicu M, Simionescu M. Effect of irreversibly glycated LDL in human vascular smooth muscle cells: lipid loading, oxidative and inflammatory stress. *J Cell Mol Med.* 2010 Dec;14(12):2790-802.

197. Nivoit P, Wiernsperger N, Moulin P, Lagarde M, Renaudin C. Effect of glycated LDL on microvascular tone in mice: a comparative study with LDL modified in vitro or isolated from diabetic patients. *Diabetologia*. 2003 Nov;46(11):1550-8.
198. Younis N, Sharma R, Soran H, Charlton-Menys V, Elseweidy M, Durrington PN. Glycation as an atherogenic modification of LDL. *Curr Opin Lipidol*. 2008 Aug;19(4):378-84.
199. Yegin A, Ozben T, Yegin H. Glycation of lipoproteins and accelerated atherosclerosis in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Int J Clin Lab Res*. 1995;25(3):157-61.
200. Lyons TJ. Glycation and oxidation: a role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 1993 Feb 25;71(6):26B-31B.
201. Knott HM, Brown BE, Davies MJ, Dean RT. Glycation and glycooxidation of low-density lipoproteins by glucose and low-molecular mass aldehydes. Formation of modified and oxidized particles. *Eur J Biochem*. 2003 Sep;270(17):3572-82.
202. Reddy GK. AGE-related cross-linking of collagen is associated with aortic wall matrix stiffness in the pathogenesis of drug-induced diabetes in rats. *Microvasc Res*. 2004 Sep;68(2):132-42.
203. Reiser KM. Nonenzymatic glycation of collagen in aging and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1991 Jan;196(1):17-29.
204. Li Y, Qi Y, Kim MS, Xu KZ, Huang TH, Rong X, Murray M, Yamahara J. Increased renal collagen cross-linking and lipid accumulation in nephropathy of Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008 Sep;24(6):498-506.
205. Hector EE, Robins SP, Mercer DK, Brittenden J, Wainwright CL. Quantitative measurement of mature collagen cross-links in human carotid artery plaques. *Atherosclerosis*. 2010 Aug;211(2):471-4.
206. Sugimoto K, Yasujima M, Yagihashi S. Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Curr Pharm Des*. 2008;14(10):953-61. Review.
207. Thornalley PJ. Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options. *Int Rev Neurobiol*. 2002;50:37-57.
208. Dickinson PJ, Carrington AL, Frost GS, Boulton AJ. Neurovascular disease, antioxidants and glycation in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2002 Jul-Aug;18(4):260-72.
209. Li YM, Dickson DW. Enhanced binding of advanced glycation endproducts (AGE) by the ApoE4 isoform links the mechanism of plaque deposition in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1997 May 2;226(3):155-8.
210. Tabaton M, Perry G, Smith M, Vitek M, Angelini G, Dapino D, Garibaldi S, Zaccheo D, Odetti P. Is amyloid beta-protein glycated in Alzheimer's disease? *Neuroreport*. 1997 Mar 3;8(4):907-9.
211. Kumar PA, Kumar MS, Reddy GB. Effect of glycation on alpha-crystallin structure and chaperone-like function. *Biochem J*. 2007 Dec 1;408(2):251-8.
212. Hashim Z, Zarina S. Advanced glycation end products in diabetic and non-diabetic human subjects suffering from cataract. *Age (Dordr)*. 2011 Sep;33(3):377-84.
213. Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Zadrozny M, Kasznicki J, Zurawska M, Drzewoski J. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutat Res*. 2004 Oct 4;554(1-2):297-304.
214. Cervantes-Laurean D, Jacobson EL, Jacobson MK. Glycation and glycooxidation of histones by ADP-ribose. *J Biol Chem*. 1996 May 3;271(18):10461-9.
215. Tamae D, Lim P, Wuenschell GE, Termini J. Mutagenesis and repair induced by the DNA advanced glycation end product N2-1-(carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine in human cells. *Biochemistry*. 2011 Mar 29;50(12):2321-9. Epub 2011 Feb 28.
216. Baliga V, Sapsford R. Review article: Diabetes mellitus and heart failure--an overview of epidemiology and management. *Diab Vasc Dis Res*. 2009 Jul;6(3):164-71. Review.

217. Matsushita K, Blecker S, Pazin-Filho A, Bertoni A, Chang PP, Coresh J, Selvin E. The association of hemoglobin a1c with incident heart failure among people without diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes*. 2010 Aug;59(8):2020-6.
218. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ*. 2000 Aug 12;321(7258):405-12.
219. Erdmann E, Lechat P, Verkenne P, Wiemann H. Results from posthoc analyses of the CIBIS II trial: effect of bisoprolol in high-risk patient groups with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2001 Aug;3(4):469-79.
220. Bristow MR, Gilbert EM, Abraham WT, Adams KF, Fowler MB, Hershberger RE, Kubo SH, Narahara KA, Ingersoll H, Krueger S, Young S, Shusterman N. Carvedilol produces dose-related improvements in left ventricular function and survival in subjects with chronic heart failure. MOCHA Investigators. *Circulation*. 1996 Dec 1;94(11):2807-16.
221. Kamalesh M, Nair G. Disproportionate increase in prevalence of diabetes among patients with congestive heart failure due to systolic dysfunction. *Int J Cardiol*. 2005 Mar 10;99(1):125-7.
222. Nichols GA, Hillier TA, Erbey JR, Brown JB. Congestive heart failure in type 2 diabetes: prevalence, incidence, and risk factors. *Diabetes Care*. 2001 Sep;24(9):1614-9.
223. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: the Framingham study. *Diabetes Care*. 1979 Mar-Apr;2(2):120-6.
224. Mosterd A, Cost B, Hoes AW, de Bruijne MC, Deckers JW, Hofman A, Grobbee DE. The prognosis of heart failure in the general population: The Rotterdam Study. *Eur Heart J*. 2001 Aug;22(15):1318-27.
225. MacDonald MR, Petrie MC, Hawkins NM, Petrie JR, Fisher M, McKelvie R, Aguilar D, Krum H, McMurray JJ. Diabetes, left ventricular systolic dysfunction, and chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2008 May;29(10):1224-40.
226. Kamalesh M. Diabetes and prognosis: are systolic and diastolic heart failure different? *Heart*. 2009 Mar;95(3):178-9.
227. Smit AJ, Lutgers HL. The clinical relevance of advanced glycation endproducts (AGE) and recent developments in pharmaceuticals to reduce AGE accumulation. *Curr Med Chem*. 2004 Oct;11(20):2767-84.
228. Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, Nowygrod R, Neeper M, Przysiecki C, Shaw A.. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol*. 1993 Dec;143(6):1699-712.
229. Striker LJ, Striker GE. Administration of AGEs in vivo induces extracellularmatrix gene expression. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11 Suppl 5:62-5.
230. Petrova R, Yamamoto Y, Muraki K, Yonekura H, Sakurai S, Watanabe T, Li H, Takeuchi M, Makita Z, Kato I, Takasawa S, Okamoto H, Imaizumi Y, Yamamoto H.. Advanced glycation endproduct-induced calcium handling impairment in mouse cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2002 Oct;34(10):1425-31..
231. Norton GR, Candy G, Woodiwiss AJ. Aminoguanidine prevents the decreased myocardial compliance produced by streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Circulation*. 1996 May 15;93(10):1905-12.
232. Schäfer S, Huber J, Wihler C, Rütten H, Busch AE, Linz W.. Impaired left ventricular relaxation in type 2 diabetic rats is related to myocardial accumulation of N(epsilon)- (carboxymethyl) lysine. *Eur J Heart Fail*. 2006 Jan;8(1):2-6.
233. Berg TJ, Snorgaard O, Faber J, Torjesen PA, Hildebrandt P, Mehlsen J, Hanssen KF. Serum levels of advanced glycation end products are associated with left ventricular diastolic function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 1999 Jul;22(7):1186-90.

234. Avendano GF, Agarwal RK, Bashey RI, Lyons MM, Soni BJ, Jyothirmayi GN, Regan TJ. Effects of glucose intolerance on myocardial function and collagen-linked glycation. *Diabetes*. 1999 Jul;48(7):1443-7.
235. Thornalley PJ. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys*. 2003 Nov 1;419(1):31-40.
236. Asif M, Egan J, Vasani S, Jyothirmayi GN, Masurekar MR, Lopez S, Williams C, Torres RL, Wagle D, Ulrich P, Cerami A, Brines M, Regan TJ. An advanced glycation endproduct cross-link breaker can reverse age-related increases in myocardial stiffness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 14;97(6):2809-13.
237. Vaitkevicius PV, Lane M, Spurgeon H, Ingram DK, Roth GS, Egan JJ, Vasani S, Wagle DR, Ulrich P, Brines M, Wuerth JP, Cerami A, Lakatta EG. A cross-link breaker has sustained effects on arterial and ventricular properties in older rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 30;98(3):1171-5.
238. Little WC, Zile MR, Kitzman DW, Hundley WG, O'Brien TX, Degroff RC. The effect of alagebrium chloride (ALT-711), a novel glucose cross-link breaker, in the treatment of elderly patients with diastolic heart failure. *J Card Fail*. 2005 Apr;11(3):191-5.
239. Thohan V, Koerner MM, Pratt CM, Torre GA. Improvements in diastolic function among patients with advanced systolic heart failure utilizing alagebrium (an oral advanced glycation end-product crosslink breaker). *Circulation* 2005;112:U620 2647 Suppl 2.
240. Ohgami N, Nagai R, Miyazaki A, Ikemoto M, Arai H, Horiuchi S, Nakayama H. Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J Biol Chem*. 2001 Apr 20;276(16):13348-55.
241. Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Sep 27;91(20):9441-5.
242. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*. 1991 Dec;88(6):1785-92. Review.
243. Forbes JM, Yee LT, Thallas V, Lassila M, Candido R, Jandeleit-Dahm KA, Thomas MC, Burns WC, Deemer EK, Thorpe SR, Cooper ME, Allen TJ. Advanced glycation end product interventions reduce diabetes-accelerated atherosclerosis. *Diabetes*. 2004 Jul;53(7):1813-23.
244. Chang KC, Hsu KL, Chou TF, Lo HM, Tseng YZ. Aminoguanidine prevents age-related deterioration in left ventricular-arterial coupling in Fisher 344 rats. *Br J Pharmacol*. 2004 Aug;142(7):1099-104.
245. Liu J, Masurekar MR, Vatner DE, Jyothirmayi GN, Regan TJ, Vatner SF, Meggs LG, Malhotra A. Glycation end-product crosslink breaker reduces collagen and improves cardiac function in aging diabetic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Dec;285(6):H2587-91.
246. Cheng G, Wang LL, Qu WS, Long L, Cui H, Liu HY, Cao YL, Li S. C16, a novel advanced glycation endproduct breaker, restores cardiovascular dysfunction in experimental diabetic rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2005 Dec;26(12):1460-6.
247. Heidland A, Sebeková K, Frangiosa A, De Santo LS, Cirillo M, Rossi F, Cotrufo M, Perna A, Klassen A, Schinzel R, De Santo NG. Paradox of circulating advanced glycation end product concentrations in patients with congestive heart failure and after heart transplantation. *Heart*. 2004 Nov;90(11):1269-74.
248. Hartog JW, Voors AA, Schalkwijk CG, Scheijen J, Smilde TD, Damman K, Bakker SJ, Smit AJ, van Veldhuisen DJ. Clinical and prognostic value of advanced glycation end-products in chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2007 Dec;28(23):2879-85.
249. Koyama Y, Takeishi Y, Arimoto T, Niizeki T, Shishido T, Takahashi H, Nozaki N, Hirono O, Tsunoda Y, Nitobe J, Watanabe T, Kubota I. High serum level of pentosidine, an advanced glycation end product (AGE), is a risk factor of patients with heart failure. *J Card Fail*. 2007 Apr;13(3):199-206.

250. Sanders DB, Kelley T, Larson D. The role of nitric oxide synthase/nitric oxide in vascular smooth muscle control. *Perfusion*. 2000 Mar;15(2):97-104.
251. Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, Stier G, Sattler M, Schleicher E, Speiser W, Nawroth PP. Endothelin 1transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes*. 2000 Sep;49(9):1561-70.
252. Yoshida N, Okumura K, Aso Y. High serum pentosidine concentrations are associated with increased arterial stiffness and thickness in patients with type 2 diabetes. *Metabolism*. 2005 Mar;54(3):345-50.
253. Hoogeveen RC, Morrison A, Boerwinkle E, Miles JS, Rhodes CE, Sharrett AR, Ballantyne CM. Plasma MCP-1 level and risk for peripheral arterial disease and incident coronary heart disease: Atherosclerosis Risk in Communities study. *Atherosclerosis*. 2005 Dec;183(2):301-7.
254. Nakamura K, Yamagishi S, Adachi H, Matsui T, Kurita-Nakamura Y, Takeuchi M, Inoue H, Imaizumi T. Circulating advanced glycation end products (AGEs) and soluble form of receptor for AGEs (sRAGE) are independent determinants of serum monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) levels in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008 Feb;24(2):109-14.
255. Kim DC, Lee W, Bae JS. Vascular anti-inflammatory effects of curcumin on HMGB1-mediated responses in vitro. *Inflamm Res*. 2011 Dec;60(12):1161-8.
256. Barlovic DP, Soro-Paavonen A, Jandeleit-Dahm KA. RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 2011 Jul;121(2):43-55. Review.
257. Hayakawa E, Yoshimoto T, Sekizawa N, Sugiyama T, Hirata Y. Overexpression of Receptor for Advanced Glycation End Products Induces Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression in Rat Vascular Smooth Muscle Cell Line. *J Atheroscler Thromb*. 2011 Nov 12.
258. Csiszar A, Ungvari Z. Endothelial dysfunction and vascular inflammation in type 2 diabetes: interaction of AGE/RAGE and TNF-alpha signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Aug;295(2):H475-6.
259. Boulanger E, Grossin N, Wautier MP, Taamma R, Wautier JL. Mesothelial RAGE activation by AGEs enhances VEGF release and potentiates capillary tube formation. *Kidney Int*. 2007 Jan;71(2):126-33.
260. Kass DA, Shapiro EP, Kawaguchi M, Capriotti AR, Scuteri A, deGroot RC, Lakatta EG. Improved arterial compliance by a novel advanced glycation end-product crosslink breaker. *Circulation*. 2001 Sep 25;104(13):1464-70.
261. Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksen S, Kusek JW, Van Lente F. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2006 Aug 15;145(4):247-54.
262. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972 Jun;18(6):499-502.
263. Raposeiras-Roubín S, Rodiño-Janeiro BK, Grigorian-Shamagian L, Moure-González M, Seoane-Blanco A, Varela-Román A, Almenar-Bonet L, Alvarez E, González-Juanatey JR. Relation of soluble receptor for advanced glycation end products to predict mortality in patients with chronic heart failure independently of Seattle Heart Failure Score. *Am J Cardiol*. 2011 Mar 15;107(6):938-44.
264. Raposeiras-Roubín S, Rodiño-Janeiro BK, Grigorian-Shamagian L, Moure-González M, Seoane-Blanco A, Varela-Román A, Alvarez E, González-Juanatey JR Soluble receptor of advanced glycation end products levels are related to ischaemic aetiology and extent of coronary disease in chronic heart failure patients, independent of advanced glycation end products levels: New Roles for Soluble RAGE. *Eur J Heart Fail*. 2010 Oct;12(10):1092-100.

265. Raposeiras-Roubín S, Rodiño-Janeiro BK, Grigorian-Shamagian L, Seoane-Blanco A, Moure-González M, Varela-Román A, Alvarez E, González-Juanatey JR. Evidence for a role of advanced glycation end products in atrial fibrillation. *Int J Cardiol*. 2011 Jun 6.
266. Raposeiras-Roubín S, Rodiño-Janeiro BK, Grigorian-Shamagian L, Moure-González M, Seoane-Blanco A, Varela-Román A, Alvarez E, González-Juanatey JR. Advanced glycation end-products: new markers of renal dysfunction in patients with chronic heart failure. *Med Clin (Barc)*. 2011 Apr 30;136(12):513-21..
267. Levy WC, Mozaffarian D, Linker DT, Sutradhar SC, Anker SD, Cropp AB, Anand I, Maggioni A, Burton P, Sullivan MD, Pitt B, Poole-Wilson PA, Mann DL, Packer M. The Seattle Heart Failure Model: prediction of survival in heart failure. *Circulation*. 2006 Mar 21;113(11):1424-33.
268. Mak S, Newton GE. The oxidative stress hypothesis of congestive heart failure: radical thoughts. *Chest*. 2001 Dec;120(6):2035-46. Review.
269. Basta G, Lazzerini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C, Kislinger T, Stern DM, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation and products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation*. 2002 Feb 19;105(7):816-22.
270. Zimmet JM, Hare JM. Nitroso-redox interactions in the cardiovascular system. *Circulation*. 2006 Oct 3;114(14):1531-44.
271. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. The RAGE axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature. *Circ Res*. 2010 Mar 19;106(5):842-53.
272. Yamagishi S, Adachi H, Nakamura K, Matsui T, Jinnouchi Y, Takenaka K, Takeuchi M, Enomoto M, Furuki K, Hino A, Shigeto Y, Imaizumi T. Positive association between serum levels of advanced glycation end products and the soluble form of receptor for advanced glycation end products in nondiabetic subjects. *Metabolism*. 2006 Sep;55(9):1227-31.
273. Giamouzis G, Kalogeropoulos AP, Georgiopoulos VV, Agha SA, Rashad MA, Laskar SR, Smith AL, Butler J. Incremental value of renal function in risk prediction with the Seattle Heart Failure Model. *Am Heart J*. 2009 Feb;157(2):299-305.
274. May HT, Horne BD, Levy WC, Kfoury AG, Rasmussen KD, Linker DT, Mozaffarian D, Anderson JL, Renlund DG. Validation of the Seattle Heart Failure Model in a community-based heart failure population and enhancement by adding B-type natriuretic peptide. *Am J Cardiol*. 2007 Aug 15;100(4):697-700.
275. Lindsey JB, Cipollone F, Abdullah SM, McGuire DK. Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): cardiovascular implications. *Diab Vasc Dis Res*. 2009 Jan;6(1):7-14.
276. Lapolla A, Reitano R, Seraglia R, Sartore G, Ragazzi E, Traldi P. Evaluation of advanced glycation end products and carbonyl compounds in patients with different conditions of oxidative stress. *Mol Nutr Food Res*. 2005 Jul;49(7):685-90.
277. Pfister R, Diedrichs H, Schiedermaier A, Rosenkranz S, Hellmich M, Erdmann E, Schneider CA. Prognostic impact of NT-proBNP and renal function in comparison to contemporary multi-marker risk scores in heart failure patients. *Eur J Heart Fail*. 2008 Mar;10(3):315-20.
278. Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb*. 1994 Oct;14(10):1521-8.
279. Katakami N, Matsuhisa M, Kaneto H, Matsuoka TA, Sakamoto K, Yasuda T, Yamasaki Y. Endogenous secretory RAGE but not soluble RAGE is associated with carotid atherosclerosis in type 1 diabetes patients. *Diab Vasc Dis Res*. 2008 Sep;5(3):190-7.
280. Van Heerebeek L, Paulus WJ. The dialogue between diabetes and diastole. *Eur J Heart Fail*. 2009 Jan;11(1):3-5.

281. Bucciarelli LG, Kaneko M, Ananthakrishnan R, Harja E, Lee LK, Hwang YC, Lerner S, Bakr S, Li Q, Lu Y, Song F, Qu W, Gomez T, Zou YS, Yan SF, Schmidt AM, Ramasamy R. Receptor for advanced-glycation end products: key modulator of myocardial ischemic injury. *Circulation*. 2006 Mar 7;113(9):1226-34.
282. Cipollone F, Iezzi A, Fazia M, Zucchelli M, Pini B, Cuccurullo C, De Cesare D, De Blasis G, Muraro R, Bei R, Chiarelli F, Schmidt AM, Cuccurullo F, Mezzetti A. The receptor RAGE as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: role of glycemic control. *Circulation*. 2003 Sep 2;108(9):1070-7.
283. Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, Buzzi MP, Belvito C, Cuccia M, Geroldi D. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 May;25(5):1032-7.
284. Lindsey JB, de Lemos JA, Cipollone F, Ayers CR, Rohatgi A, Morrow DA, Khera A, McGuire DK. Association between circulating soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and atherosclerosis: observations from the Dallas Heart Study. *Diabetes Care*. 2009 Jul;32(7):1218-20.
285. Geroldi D, Falcone C, Emanuele E. Soluble receptor for advanced glycation end products: from disease marker to potential therapeutic target. *Curr Med Chem*. 2006;13(17):1971-8.
286. Lu L, Pu LJ, Zhang Q, Wang LJ, Kang S, Zhang RY, Chen QJ, Wang JG, De Caterina R, Shen WF. Increased glycated albumin and decreased sRAGE levels are related to angiographic severity and extent of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2009 Oct;206(2):540-5.
287. Smit AJ, Hartog JW, Voors AA, van Veldhuisen DJ. Advanced glycation endproducts in chronic heart failure. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Apr;1126:225-30.
288. Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G; National Kidney Foundation. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med*. 2003 Jul 15;139(2):137-47.
289. Nakamura K, Yamagishi S, Adachi H, Kurita-Nakamura Y, Matsui T, Yoshida T, Sato A, Imaizumi T. Elevation of soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in diabetic subjects with coronary artery diseases. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007 Jul;23(5):368-71.
290. Yan XX, Lu L, Peng WH, Wang LJ, Zhang Q, Zhang RY, Chen QJ, Shen WF. Increased serum HMGB1 level is associated with coronary artery disease in nondiabetic and type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis*. 2009 Aug;205(2):544-8.
291. Nielsen JM, Kristiansen SB, Nørregaard R, Andersen CL, Denner L, Nielsen TT, Flyvbjerg A, Bøtker HE. Blockage of receptor for advanced glycation end products prevents development of cardiac dysfunction in db/db type 2 diabetic mice. *Eur J Heart Fail*. 2009 Jul;11(7):638-47.
292. Li J, Solus J, Chen Q, Rho YH, Milne G, Stein CM, Darbar D. Role of inflammation and oxidative stress in atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2010 Apr;7(4):438-44.
293. Ramasamy R, Fang Yan S, Schmidt AM. RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response-the evidence mounts. *J Leukoc Biol*. 2009 Sep;86(3):505-12.
294. Falk RH. Atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2001 Apr 5;344(14):1067-78.
295. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature*. 2002 Jan 10;415(6868):219-26.
296. Schmidt M, Marschang H, Clifford S, Harald R, Guido R, Oliver T, Johannes B, Daccarett M. Trends in inflammatory biomarkers during atrial fibrillation ablation across different catheter ablation strategies. *Int J Cardiol*. 2011 Jan 26.
297. Burstein B, Nattel S. Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Feb 26;51(8):802-9.

298. Movahed MR, Hashemzadeh M, Jamal MM. Diabetes mellitus is a strong, independent risk for atrial fibrillation and flutter in addition to other cardiovascular disease. *Int J Cardiol.* 2005 Dec 7;105(3):315-8.
299. Selvin E, Steffes MW, Zhu H, Matsushita K, Wagenknecht L, Pankow J, Coresh J, Brancati FL. Glycated hemoglobin, diabetes, and cardiovascular risk in nondiabetic adults. *N Engl J Med.* 2010 Mar 4;362(9):800-11.
300. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000 Apr 13;404(6779):787-90.
301. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001 Dec 13;414(6865):813-20.
302. Fiordaliso F, Cuccovillo I, Bianchi R, Bai A, Doni M, Salio M, De Angelis N, Ghezzi P, Latini R, Masson S. Cardiovascular oxidative stress is reduced by an ACE inhibitor in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Life Sci.* 2006 Jun 6;79(2):121-9.
303. Kato T, Yamashita T, Sekiguchi A, Tsuneda T, Sagara K, Takamura M, Kaneko S, Aizawa T, Fu LT. AGEs-RAGE system mediates atrial structural remodeling in the diabetic rat. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2008 Apr;19(4):415-20.
304. Van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko ML, Falcao-Pires I, Musters RJ, Kupreishvili K, Ijsselmuiden AJ, Schalkwijk CG, Bronzwaer JG, Diamant M, Borbély A, van der Velden J, Stienen GJ, Laarman GJ, Niessen HW, Paulus WJ. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation.* 2008 Jan 1;117(1):43-51.
305. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattey T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell.* 1999 Jun 25;97(7):889-901.
306. Boos CJ, Lip GY. Inflammation and atrial fibrillation: cause or effect? *Heart.* 2008 Feb;94(2):133-4.
307. Wong RK, Pettit AI, Quinn PA, Jennings SC, Davies JE, Ng LL. Advanced glycation end products stimulate an enhanced neutrophil respiratory burst mediated through the activation of cytosolic phospholipase A2 and generation of arachidonic acid. *Circulation.* 2003 Oct 14;108(15):1858-64.
308. Mukherjee R, Herron AR, Lowry AS, Stroud RE, Stroud MR, Wharton JM, Ikonomidis JS, Crumbley AJ 3rd, Spinale FG, Gold MR. Selective induction of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in atrial and ventricular myocardium in patients with atrial fibrillation. *Am J Cardiol.* 2006 Feb 15;97(4):532-7.
309. Nakano Y, Niida S, Dote K, Takenaka S, Hirao H, Miura F, Ishida M, Shingu T, Sueda T, Yoshizumi M, Chayama K. Matrix metalloproteinase-9 contributes to human atrial remodeling during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Mar 3;43(5):818-25.
310. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart.* 2007 Sep;93(9):1137-46.
311. Ronco C, Haapio M, House AA, Anavekar N, Bellomo R. Cardiorenal syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Nov 4;52(19):1527-39.
312. Shishehbor MH, Oliveira LP, Lauer MS, Sprecher DL, Wolski K, Cho L, Hoogwerf BJ, Hazen SL. Emerging cardiovascular risk factors that account for a significant portion of attributable mortality risk in chronic kidney disease. *Am J Cardiol.* 2008 Jun 15;101(12):1741-6.
313. Grigorian Shamagian L, Varela Román A, Pedreira Pérez M, Gómez Otero I, Virgós Lamela A, González-Juanatey JR. Renal failure is an independent predictor of mortality in hospitalized heart failure patients and is associated with a worse cardiovascular risk profile. *Rev Esp Cardiol.* 2006 Feb;59(2):99-108.

314. Hillege H, Van Gilst W, de Zeeuw D, Van Veldhuisen DJ. Renal function as a predictor of prognosis in chronic heart failure. *Heart Fail Monit.* 2002;2(3):78-84.
315. Yao D, Brownlee M. Hyperglycemia-Induced Reactive Oxygen Species Increase Expression of RAGE and RAGE Ligands. *Diabetes.* 2010 Jan;59(1):249-55.
316. Rabbani N, Sebekova K, Sebekova Jr K, Heidland A, Thornalley PJ. Accumulation of free adduct glycation, oxidation, and nitration products follows acute loss of renal function. *Kidney Int.* 2007 Nov;72(9):1113-21.
317. Jandeleit-Dahm K, Cooper ME. The role of AGEs in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des.* 2008;14(10):979-86.
318. Meerwaldt R, Links T, Zeebregts C, Tio R, Hillebrands JL, Smit A. The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2008 Oct 7;7:29.
319. Coughlan MT, Mibus AL, Forbes JM. Oxidative stress and advanced glycation in diabetic nephropathy. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Apr;1126:190-3.
320. Linden E, Cai W, He JC, Xue C, Li Z, Winston J, Vlassara H, Uribarri J. Endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease results from advanced glycation end products (AGE)-mediated inhibition of endothelial nitric oxide synthase through RAGE activation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008 May;3(3):691-8.
321. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, De Zeeuw D, Hostetter TH, Lameire N, Eknoyan G. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2005 Jun;67(6):2089-100.
322. Bang H, Vupputuri S, Shoham DA, Klemmer PJ, Falk RJ, Mazumdar M, Gipson D, Colindres RE, Kshirsagar AV. Screening for Occult RENal Disease (SCORED): a simple prediction model for chronic kidney disease. *Arch Intern Med.* 2007 Feb 26;167(4):374-81.
323. Hartog JW, Hummel YM, Voors AA, Schalkwijk CG, Miyata T, Huisman RM, Smit AJ, Van Veldhuisen DJ. Skin autofluorescence, a measure of tissue advanced glycation end-products (AGEs), is related to diastolic function in dialysis patients. *J Card Fail.* 2008 Sep;14(7):596-602.
324. García Acuña JM, González-Babarro E, Grigorian Shamagian L, Peña-Gil C, Vidal Pérez R, López-Lago AM, Gutiérrez Feijóo M, González-Juanatey JR. Cystatin C provides more information than other renal function parameters for stratifying risk in patients with acute coronary syndrome. *Rev Esp Cardiol.* 2009 May;62(5):510-9.
325. Hartog JW, Willemsen S, Voors AA. What is the influence of renal function on the prognostic value of advanced glycation end-products and sRAGE in heart failure? *J Card Fail.* 2008;14:626.
326. Semba RD, Fink JC, Sun K, Windham BG, Ferrucci L. Serum carboxymethyllysine, a dominant advanced glycation end product, is associated with chronic kidney disease: the Baltimore longitudinal study of aging. *J Ren Nutr.* 2010 Mar;20(2):74-81.
327. Berrou J, Tostivint I, Verrecchia F, Berthier C, Boulanger E, Mauviel A, Marti HP, Wautier MP, Wautier JL, Rondeau E, Hertig A. Advanced glycation end products regulate extracellular matrix protein and protease expression by human glomerular mesangial cells. *Int J Mol Med.* 2009 Apr;23(4):513-20.
328. Saha SA, Lasalle BK, Clifton GD, Short RA, Tuttle KR. Modulation of advanced glycation end products by candesartan in patients with diabetic kidney disease: a dose-response relationship study. *Am J Ther.* 2010 Nov-Dec;17(6):553-8.
329. Coughlan MT, Thallas-Bonke V, Pete J, Long DM, Gasser A, Tong DC, Arnstein M, Thorpe SR, Cooper ME, Forbes JM. Combination therapy with the advanced glycation end product cross-link breaker, alagebrium, and angiotensin converting enzyme inhibitors in diabetes: synergy or redundancy? *Endocrinology.* 2007 Feb;148(2):886-95.
330. Macchia A, Levantesi G, Marfisi RM, Franzosi MG, Maggioni AP, Nicolosi GL, Schweiger C, Tavazzi L, Tognoni G, Valagussa F, Marchioli R; Investigadores del estudio Grupo

- Italiano para el Estudio de la Supervivencia en el Infarto de Miocardio Prevenzione. Determinants of late-onset heart failure in myocardial infarction survivors: GISSI Prevenzione trial results. *Rev Esp Cardiol*. 2005 Nov;58(11):1266-72.
331. Gajarsa JJ, Kloner RA. Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities. *Heart Fail Rev*. 2011 Jan;16(1):13-21.
332. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Mar 1;35(3):569-82.
333. Barrabés JA, Barba I. Medium-term changes in myocardial perfusion and ventricular remodeling following acute myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol*. 2007 May;60(5):468-70.
334. Roig Minguell E. Utilidad clínica de los marcadores neurohormonales en la insuficiencia cardíaca. *Rev Esp Cardiol*. 2004 Apr;57(4):347-56. Review.
335. Domínguez Rodríguez A, Abreu González P, García González MJ, Ferrer Hita J. Association between serum interleukin 10 level and development of heart failure in acute myocardial infarction patients treated by primary angioplasty. *Rev Esp Cardiol*. 2005 Jun;58(6):626-30.
336. Colucci WS. Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. *Am J Cardiol*. 1997 Dec 4;80(11A):15L-25L.
337. Iribarren C, Karter AJ, Go AS, Ferrara A, Liu JY, Sidney S, Selby JV. Glycemic control and heart failure among adult patients with diabetes. *Circulation*. 2001 Jun 5;103(22):2668-73.
338. Held C, Gerstein HC, Yusuf S, Zhao F, Hilbrich L, Anderson C, Sleight P, Teo K, ONTARGET/TRANSCEND Investigators: Glucose levels predict hospitalization for congestive heart failure in patients at high cardiovascular risk. *Circulation*. 2007 Mar 20;115(11):1371-5.
339. Pazin-Filho A, Kottgen A, Bertoni AG, Russell SD, Selvin E, Rosamond WD, Coresh J. HbA1c as a risk factor for heart failure in persons with diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Diabetologia*. 2008 Dec;51(12):2197-204.
340. Matsushita K, Blecker S, Pazin-Filho A, Bertoni A, Chang PP, Coresh J, Selvin E. The association of hemoglobin a1c with incident heart failure among people without diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes*. 2010 Aug;59(8):2020-6.
341. Wolffenbuttel BH, Giordano D, Founds HW, Bucala R. Long-term assessment of glucose control by haemoglobin-AGE measurement. *Lancet*. 1996 Feb 24;347(9000):513-5.
342. Yan SF, Ramasamy R, Naka Y, Schmidt AM. Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ Res*. 2003 Dec 12;93(12):1159-69.
343. Thygesen K, Alpert JS, White HD; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation*. 2007 Nov 27;116(22):2634-53.
344. Bassand JP, Hamm CW, Ardissino D, Boersma E, Budaj A, Fernández-Avilés F, Fox KA, Hasdai D, Ohman EM, Wallentin L, Wijns W. Task Force for Diagnosis and Treatment of Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes of European Society of Cardiology. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2007 Jul;28(13):1598-660.
345. Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V, Filippatos G, Fox K, Huber K, Kastrati A, Rosengren A, Steg PG, Tubaro M, Verheugt F, Weidinger F, Weis M; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2008 Dec;29(23):2909-45.

346. Lewis EF, Solomon SD, Jablonski KA, Rice MM, Clemenza F, Hsia J, Maggioni AP, Zabalgaitia M, Huynh T, Cuddy TE, Gersh BJ, Rouleau J, Braunwald E, Pfeffer MA; PEACE Investigators. Predictors of heart failure in patients with stable coronary artery disease: a PEACE study. *Circ Heart Fail*. 2009 May;2(3):209-16.
347. Aronson D. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. *J Hypertens*. 2003 Jan;21(1):3-12.
348. Sun L, Ishida T, Yasuda T, Kojima Y, Honjo T, Yamamoto Y, Yamamoto H, Ishibashi S, Hirata K, Hayashi Y. RAGE mediates oxidized LDL-induced pro-inflammatory effects and atherosclerosis in non-diabetic LDL receptor-deficient mice. *Cardiovasc Res*. 2009 May 1;82(2):371-81.
349. Soro-Paavonen A, Zhang WZ, Venardos K, Coughlan MT, Harris E, Tong DC, Brasacchio D, Paavonen K, Chin-Dusting J, Cooper ME, Kaye D, Thomas MC, Forbes JM. Advanced glycation end-products induce vascular dysfunction via resistance to nitric oxide and suppression of endothelial nitric oxide synthase. *J Hypertens*. 2010 Apr;28(4):780-8.
350. Kamioka M, Ishibashi T, Sugimoto K, Uekita H, Nagai R, Sakamoto N, et al. Blockade of renin-angiotensin system attenuates advanced glycation end products-mediated signaling pathways. *J Atheroscler Thromb*. 2010 Jun 30;17(6):590-600.
351. Kamioka M, Ishibashi T, Sugimoto K, Uekita H, Nagai R, Sakamoto N, Ando K, Ohkawara H, Teramoto T, Maruyama Y, Takeishi Y. Blockade of angiotensin II receptors reduces the expression of receptors for advanced glycation end products in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(10):e138-42.
352. Yamagishi S, Matsui T, Nakamura K, Inoue H, Takeuchi M, Ueda S, Fukami K, Okuda S, Imaizumi T. Olmesartan blocks advanced glycation end products (AGEs)-induced angiogenesis in vitro by suppressing receptor for AGEs (RAGE) expression. *Microvasc Res*. 2008 Jan;75(1):130-4.
353. Koka V, Wang W, Huang XR, Kim-Mitsuyama S, Truong LD, Lan HY. Advanced glycation end products activate a chymase-dependent angiotensin II-generating pathway in diabetic complications. *Circulation*. 2006 Mar 14;113(10):1353-60.
354. Rodiño Kostka, BK. Efectos moleculares de los productos finales de glicación avanzada en la célula endotelial humana (tesis doctoral). Directores: Ezequiel Álvarez Castro, José Ramón González Juanatey. Universidad de Santiago de Compostela, 2011.
355. Han Y, Randell E, Vasdev S, Gill V, Curran M, Newhook LA, Grant M, Hagerty D, Schneider C. Plasma advanced glycation endproduct, methylglyoxal-derived hydroimidazolone is elevated in young, complication-free patients with Type 1 diabetes. *Clin Biochem*. 2009 May;42(7-8):562-9.
356. Kilhovd BK, Giardino I, Torjesen PA, Birkeland KI, Berg TJ, Thornalley PJ, Brownlee M, Hanssen KF. Increased serum levels of the specific AGE-compound methylglyoxal-derived hydroimidazolone in patients with type 2 diabetes. *Metabolism*. 2003 Feb;52(2):163-7.
357. Basta G, Sironi AM, Lazzerini G, Del Turco S, Buzzigoli E, Casolaro A, Natali A, Ferrannini E, Gastaldelli A. Circulating soluble receptor for advanced glycation end products is inversely associated with glycemic control and S100A12 protein. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Nov;91(11):4628-34.
358. Yamagishi S, Nakamura K, Imaizumi T. Advanced glycation end products (AGEs) and diabetic vascular complications. *Curr Diabetes Rev*. 2005 Feb;1(1):93-106. Review.
359. Jakus V, Rietbrock N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res*. 2004;53(2):131-42. Review.
360. Nin JW, Ferreira I, Schalkwijk CG, Prins MH, Chaturvedi N, Fuller JH, Stehouwer CD; EURODIAB Prospective Complications Study Group. Levels of soluble receptor for AGE are cross-sectionally associated with cardiovascular disease in type 1 diabetes, and this association is partially mediated by endothelial and renal dysfunction and by low-grade inflammation: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia*. 2009 Apr;52(4):705-14.

361. Tan KC, Shiu SW, Chow WS, Leng L, Bucala R, Betteridge DJ. Association between serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and circulating advanced glycation end products in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2006 Nov;49(11):2756-62.
362. Nakamura K, Yamagishi S, Adachi H, Matsui T, Kurita-Nakamura Y, Takeuchi M, Inoue H, Imaizumi T. Serum levels of soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) are positively associated with circulating AGEs and soluble form of VCAM-1 in patients with type 2 diabetes. *Microvasc Res*. 2008 May;76(1):52-6.
363. Wang LJ, Lu L, Zhang FR, Chen QJ, De Caterina R, Shen WF. Increased serum high-mobility group box-1 and cleaved receptor for advanced glycation endproducts levels and decreased endogenous secretory receptor for advanced glycation endproducts levels in diabetic and non-diabetic patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2011 Apr;13(4):440-9.
364. Humpert PM, Djuric Z, Kopf S, Rudofsky G, Morcos M, Nawroth PP, Bierhaus A. Soluble RAGE but not endogenous secretory RAGE is associated with albuminuria in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2007 Mar 7;6:9.
365. Ebihara I, Nakamura T, Shimada N, Koide H. Increased plasma metalloproteinase-9 concentrations precede development of microalbuminuria in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis*. 1998 Oct;32(4):544-50.
366. Sakurai S, Yamamoto Y, Tamei H et al. Development of an ELISA for esRAGE and its application to type 1 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;73:158-65.
367. Koyama H, Shoji T, Yokoyama H et al. Plasma level of endogenous secretory RAGE is associated with components of the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25: 2587-93.
368. Rasheed Z, Akhtar N, Haqqi TM. Advanced glycation end products induce the expression of interleukin-6 and interleukin-8 by receptor for advanced glycation end product-mediated activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B in human osteoarthritis chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)*. 2011 May;50(5):838-51.
369. Origlia N, Arancio O, Domenici L, Yan SS. MAPK, beta-amyloid and synaptic dysfunction: the role of RAGE. *Expert Rev Neurother*. 2009 Nov;9(11):1635-45. Review.
370. Bro S, Flyvbjerg A, Binder CJ, Bang CA, Denner L, Olgaard K, Nielsen LB. A neutralizing antibody against receptor for advanced glycation end products (RAGE) reduces atherosclerosis in uremic mice. *Atherosclerosis*. 2008 Dec;201(2):274-80.
371. Zhou Z, Wang K, Penn MS, Marso SP, Lauer MA, Forudi F, Zhou X, Qu W, Lu Y, Stern DM, Schmidt AM, Lincoff AM, Topol EJ. Receptor for AGE (RAGE) mediates neointimal formation in response to arterial injury. *Circulation*. 2003 May 6;107(17):2238-43.
372. Peng WH, Lu L, Hu J, Yan XX, Zhang Q, Zhang RY, Chen QJ, Shen WF. Decreased serum esRAGE level is associated with angiographically determined coronary plaque progression in diabetic patients. *Clin Biochem*. 2009 Aug;42(12):1252-9.
373. Wautier JL, Grossin N. sRAGE and esRAGE. *Diabetes Metab*. 2008 Dec;34(6 Pt 1):631.
374. Tam XH, Shiu SW, Leng L, Bucala R, Betteridge DJ, Tan KC. Enhanced expression of receptor for advanced glycation end-products is associated with low circulating soluble isoforms of the receptor in Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 2011 Jan;120(2):81-9.
375. Giannini C, D'Adamo E, de Giorgis T, Chiavaroli V, Verrotti A, Chiarelli F, Mohn A. The possible role of esRAGE and sRAGE in the natural history of diabetic nephropathy in childhood. *Pediatr Nephrol*. 2011 Aug 26.
376. Thomas MC, Söderlund J, Lehto M, Mäkinen VP, Moran JL, Cooper ME, Forsblom C, Groop PH; FinnDiane Study Group. Soluble receptor for AGE (RAGE) is a novel independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2011 Oct;54(10):2669-77.
377. Marcovecchio ML, Giannini C, Dalton RN, Widmer B, Chiarelli F, Dunger DB. Reduced endogenous secretory receptor for advanced glycation end products (esRAGE) in young

- people with Type 1 diabetes developing microalbuminuria. *Diabet Med.* 2009 Aug;26(8):815-9.
378. Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington P, Hitman G, Neil A, Livingstone S, Charlton-Menys V, Bao W, Demicco DA, Preston GM, Deshmukh H, Tan K, Fuller JH. Total soluble and endogenous secretory receptor for advanced glycation end products as predictive biomarkers of coronary heart disease risk in patients with type 2 diabetes: an analysis from the CARDS trial. *Diabetes.* 2011 Sep;60(9):2379-85.
379. Zhang Y, Zhang P, Mu Y, Gao M, Wang JR, Wang Y, Su LQ, Hou YL. The role of renin-angiotensin system blockade therapy in the prevention of atrial fibrillation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Pharmacol Ther.* 2010 Oct;88(4):521-31.
380. Wang Z, Zhang Y, Gao M, Wang J, Wang Q, Wang X, Su L, Hou Y. Statin therapy for the prevention of atrial fibrillation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacotherapy.* 2011 Nov;31(11):1051-62.
381. Sebeková K, Gazdík K, Syrová D, Blazíček P, Schinzel R, Heidland A, Spustová V, Dzúrik R. Effects of ramipril in nondiabetic nephropathy: improved parameters of oxidative stress and potential modulation of advanced glycation end products. *J Hum Hypertens.* 2003 Apr;17(4):265-70.
382. Nakamura T, Sato E, Fujiwara N, Kawagoe Y, Takeuchi M, Maeda S, Yamagishi S. Atorvastatin reduces proteinuria in non-diabetic chronic kidney disease patients partly via lowering serum levels of advanced glycation end products (AGEs). *Oxid Med Cell Longev.* 2010 Sep-Oct;3(5):304-7.
383. Soulis-Liparota T, Cooper M, Papazoglou D, Clarke B, Jerums G. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat. *Diabetes.* 1991 Oct;40(10):1328-34.
384. Makino H, Shikata K, Hironaka K, Kushiro M, Yamasaki Y, Sugimoto H, Ota Z, Araki N, Horiuchi S. Ultrastructure of nonenzymatically glycosylated mesangial matrix in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 1995 Aug;48(2):517-26.
385. Haneda M, Kikkawa R, Horide N, Togawa M, Koya D, Kajiwara N, Ooshima A, Shigeta Y. Glucose enhanced type IV collagen production in cultured rat glomerular mesangial cells. *Diabetologia.* 1991 Mar;34(3):198-200.
386. Bailey A, Sims TJ, Avery NC, Miles CA. Chemistry of collagen cross-links: glucose-mediated covalent cross-linking of type-IV collagen in lens capsules. *Biochem J.* 1993 Dec 1;296 (Pt 2):489-96.
387. Striker LJ, Peten EP, Elliot SJ, Dio T, Striker GE. Mesangial cell turnover: effect of heparin and peptide growth factors. *Lab Invest.* 1991 Apr;64(4):446-56.
388. Haitoglou CS, Tsilibary EC, Brownlee M, Charonis AS. Altered cellular interactions between endothelial cells and non enzymatic glycosylated laminin/type IV collagen. *J Biol Chem.* 1992 Jun 25;267(18):12404-7.
389. Stout LC, Kumar S, Whorton EB. Focal mesangiolysis and the pathogenesis of the Kimmelstiel-Wilson nodule. *Hum Pathol.* 1993 Jan;24(1):77-89.
390. Doi T, Vlassara H, Kirstein M, Yamada Y, Striker GE, Striker LJ. Receptor specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycation end products is mediated via platelet derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Apr 1;89(7):2873-7.
391. Skolnik EY, Yang Z, Makita Z, Radoff S, Kirstein M, Vlassara H. Human and rat mesangial cell receptors for glucose-modified proteins: potential role in kidney tissue remodeling and diabetic nephropathy. *J Exp Med.* 1991 Oct 1;174(4):931-9.
392. Vlassara H, Fuh H, Makita Z, Krungkrai, Cerami A, Bucala R. Exogenous advanced glycosylation endproducts induce complex vascular dysfunction in normal animals: a model for diabetic and aging complications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Dec 15;89(24):12043-7.

- 393. Gaens KH, Ferreira I, van der Kallen CJ, van Greevenbroek MM, Blaak EE, Feskens EJ, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, 't Hart LM, de Groot PG, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. Association of polymorphism in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene with circulating RAGE levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Dec;94(12):5174-80.
- 394. Smedsrød B, Melkko J, Araki N, Sano H, Horiuchi S. Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells. *Biochem J.* 1997 Mar 1;322
- 395. Thornalley PJ. Advanced glycation end products in renal failure. *J Ren Nutr.* 2006 Jul;16(3):178-84. Review.
- 396. Gugliucci A. Glicación de proteínas: rol protagónico de la hiperglicemia en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Rev Med Uruguay.* 2000; 16: 58-75
- 397. Kislinger T, Tanji N, Wendt T, Qu W, Lu Y, Ferran LJ Jr, Taguchi A, Olson K, Bucciarelli L, Goova M, Hofmann MA, Cataldegirmen G, D'Agati V, Pischetsrieder M, Stern DM, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation end products mediates inflammation and enhanced expression of tissue factor in vasculature of diabetic apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Jun;21(6):905-10.
- 398. Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, Wahl P, Ziegler R, Müller M, Nawroth PP. Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation.* 1997 Oct 7;96(7):2262-71.
- 399. Hogan M, Cerami A, Bucala R. Advanced glycosylation endproducts block the antiproliferative effect of nitric oxide. Role in the vascular and renal complications of diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1992 Sep;90(3):1110-5.
- 400. Xu B, Chibber R, Ruggiero D, Kohner E, Ritter J, Ferro A. Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. *FASEB J.* 2003 Jul;17(10):1289-91.
- 401. Kamata K, Ozawa Y, Kobayashi T, Matsumoto T. Effect of N-epsilon-(carboxymethyl)lysine on coronary vasoconstriction in isolated perfused hearts from control and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Smooth Muscle Res.* 2009 Jun;45(2-3):125-37.
- 402. Ozyazgan S, Unlucerci Y, Bekpinar S, Akkan AG. Impaired relaxation in aorta from streptozotocin-diabetic rats: effect of aminoguanidine (AMNG) treatment. *Int J Exp Diabetes Res.* 2000;1(2):145-53.

ANEXOS

ANEXO 1

Universidad de Santiago de Compostela

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Medicina



Efectos moleculares de los productos finales de glicación avanzada en la célula endotelial humana

Memoria experimental que presenta para optar al grado de doctor en biología:

Bruno K. Rodiño Janeiro

Santiago de Compostela, 2011.

Glycated human serum albumin induces NF- κ B activation and endothelial nitric oxide synthase uncoupling in human endothelial cells

Short title: gHSA-induced ROS production mechanisms

Rodiño-Janeiro BK¹, Raposeiras-Roubín S¹, González-Peteiro M², Uceda-Somoza R², González-Juanatey JR¹, Álvarez E^{1, #}.

1. Departamento de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela; Servicio de Cardiología, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela and Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS). 15706 A Coruña, Spain.

2. Unidad de Medicina Materno-Fetal, Servicio de Obstetricia, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, 15706 A Coruña, Spain.

Address for correspondence

Ezequiel Álvarez

Laboratorio nº 6. Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS)
Edif. Consultas externas (planta -2).

Hospital Clínico Universitario de Santiago.

Travesía Choupana s/n. 15706. Santiago de Compostela. A Coruña. Spain

E-mail address: ezequiel.alvarez@usc.es

Tel: +34 981 955 074

Abstract

Background: Diabetes vascular complications could be mediated by non-enzymatic glycation of proteins, but the mechanisms are far from being clear. Our objective was to identify the regulation pathways implicated in the glycated human serum albumin (gHSA)-enhanced ROS production in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC).

Methods: The implication in the gHSA-enhanced extracellular reactive oxygen species (ROS) production of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) and activator protein-1 (AP-1), and of two phosphorylation cascades mediated by phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 (MEK 1/2) were analyzed. Genetic expression levels were measured by RT-qPCR and extracellular ROS production by the cytochrome c reduction method.

Results: NF- κ B activation by gHSA was observed and NF- κ B inhibition reversed the gHSA enhanced NOX4 expression and tended to decrease gHSA-induced ROS production. The inhibition of AP-1 with SP600125 induced a rise of NOX4 and P22PHOX subunits expression and a down-regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). However, SP600125 enhanced ROS production in the presence of human serum albumin, but not with gHSA. gHSA also produced eNOS uncoupling, which could explain these results. The phosphorylation pathways mediated by PI3K or MEK 1/2 did not seem to be involved in gHSA-induced ROS production.

Conclusions: All together suggests that gHSA-enhanced ROS production in HUVEC was the result of: 1) up-regulation of NOX4 NADPH oxidase subunit by NF- κ B activation and 2) eNOS uncoupling. Our results also showed that AP-1 activity is an important factor for the expression of NADPH oxidase and eNOS in HUVEC.

KEYWORDS: Amadori products; glycated human serum albumin; reactive oxygen species; endothelial dysfunction; NF- κ B.

List of abbreviations

ADMA: asymmetric dimethyl-L-arginine.
AGE: advanced glycation end-products.
AP-1: activator protein-1.
BH4: (6R-)5, 6, 7, 8, -tetrahydrobiopterin.
DDAH: dimethylarginine dimethylaminohydrolase.
DMSO: dimethyl sulfoxide.
DPI: diphenyleneiodonium.
DTT: dithiothreitol.
eNOS: endothelial nitric oxide synthase.
ERK 1/2: extracellular signalregulated kinase.
gHSA: glycated human serum albumin.
HBS: HEPES buffer solution.
HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid.
HSA: human serum albumin.
HUVEC: human umbilical vein endothelial cells.
L-NAME: N(w)-nitro-L arginine methylester.
MEK 1/2: mitogen-activated protein kinase kinase ½.
NADH: β-nicotinamide adenine dinucleotide reduced.
NF-κB: nuclear factor kappa-light-chainenhancer of activated B cells.
NO: nitric oxide; PCR: polymerase chain reactions.
PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase.
ROS: reactive oxygen species.
SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.
SOD: superoxide anion dismutase.

Introduction

Diabetes mellitus, which is one of the main causes of mortality and morbidity in occidental countries, is strongly linked to several cardiovascular complications¹. Under the condition of prolonged hyperglycemia as in diabetes advanced glycation end-products (AGE) are formed². Firstly, the basic aminoacids of proteins are modified by glucose to form Schiff bases. These bases evolve to Amadori products, which undergo additional chemical rearrangements to form irreversibly AGE³. Amadori products are found in 2-10 times higher concentration than AGE⁴. These intermediate glycated products, although less studied than AGE, have been related with oxidative stress and cardiovascular diseases⁵⁻⁶.

Oxidative stress happens when the reactive oxygen species (ROS) exceed the protective antioxidant systems and this stress is directly related with endothelial dysfunction⁷. NADPH oxidase is the most important source of ROS in the endothelium in case of hypertension, inflammation and ischemia-reperfusion injury⁸. NADPH oxidase is a multimeric enzyme firstly found in phagocytes, consisting on the membrane catalytic subunit gp91phox (NOX2) bound to P22PHOX and associated with several cytosolic regulatory subunits. There are numerous homologues of gp91phox named NOX1, NOX3, NOX4 and NOX5, where NOX4 is the most abundant isoform in the endothelium⁹.

Previous studies have shown increased ROS production induced by glycated Amadori-albumin and related with NADPH oxidase. Glycated bovine albumin increased superoxide anion production in quiescent human mesangial cells, and this increase was inhibited by diphenyleneiodonium (DPI), an inhibitor of NADPH oxidase¹⁰. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) treated with glycated albumin showed both E-selectin and ROS increased production depending on NADPH oxidase¹¹. In a previous study, we have reported a glycated human serum albumin (gHSA) induced superoxide anion production increment in HUVEC by an up-regulation enhancement of NOX4 and P22PHOX expression⁵.

It is still unclear the molecular signaling pathways activated by glycated albumin which lead to these effects, but some of them stand out. Mitogen-activated protein

kinase kinase 1/2 (MEK 1/2) showed to participate in the increased proliferation rate and in the up-regulated expression of MCP-1 and IL-8 induced by glycated albumin in vascular smooth muscle cells¹²⁻¹⁴. In HUVEC, glycated albumin induced E-selectin expression, partially depended on phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) and totally depended on I κ B kinase β ¹¹. It was also demonstrated an increased activity of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) depending on extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) in macrophage RAW cells treated with glycated albumin¹⁵. In fact, the activation of NF- κ B and activator protein-1 (AP-1) by glycated albumin have been described in different types of cells¹⁵⁻¹⁷.

Furthermore, the molecular mechanism of the NOX4 and P22PHOX upregulation induced by Amadori-glycated albumin are still undefined. In smooth muscle cells, Nox subunits activity and transcription seemed to be regulated by Akt, MEK 1/2, NF- κ B and AP-1¹⁸⁻²¹ whereas NF- κ B regulated several NADPH oxidase subunits expression in monocytic murine cells²².

To summarize, we have shown previously that gHSA up-regulates NOX4 and P22PHOX expression leading to an enhanced ROS production in human endothelial cells. Since increased ROS production contributes to endothelial dysfunction, knowing the molecular mechanisms of these effects would help to find new therapeutic solutions for some diabetic cardiovascular problems. Therefore, our objective was to identify the regulation pathways implicated in the gHSA-induced ROS production in human endothelial cells using pharmacological and molecular approaches.

Material and methods

a) Cell culture

HUVEC were isolated from freshly obtained human umbilical cords donated under informed consent of the mothers and following the method previously described [5] with some modifications. All the procedures were approved by the Ethics Committee for Clinical Research at Galicia (Spain), according with the World

Medical Association Declaration of Helsinki. Briefly, umbilical veins were digested with collagenase IA (22 U mL^{-1} , Gibco, Invitrogen) in a 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) buffer solution (HBS) of the following composition (in $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 110 NaCl , 5 KCl , $0.5 \text{ NaH}_2\text{PO}_4$, $0.5 \text{ KH}_2\text{PO}_4$, 0.16 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , 10 NaHCO_3 , 0.5 EDTA , 10 HEPES , 10 glucose ($\text{pH } 7.4$). After 6 min digestion at 37°C , endothelial cells were collected, washed and placed in a chemically defined endothelial cell medium (PAA, Pasching, Austria) supplemented with $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ of β -endothelial cell growth factor (Sigma-Aldrich), $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of heparin (Mayne Pharma, Spain) and with $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ penicillin (Laboratorios Normon, Madrid, Spain) and $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ streptomycin (Laboratorio Reig Jofré, Barcelona, Spain). Finally, HUVEC were cultured on 0.2% (w/v) gelatin (Sigma-Aldrich) pre-coated flasks or dishes (Falcon, BD Biosciences) and grown to confluence in a humidity saturated 5% CO_2 atmosphere at 37°C . Confluence cultures were detached with 0.25% (w/v) trypsin in $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ of EDTA in Hanks' balanced salt solution (Gibco) and cells for the experiments were used between fourth to tenth passage.

For the experiments, HUVEC were placed at a concentration of 10,000 cells or 300,000 per well in 96-wells or 6-wells microplates, respectively, with supplemented endothelial cell growth medium. 10,000 HUVEC per well (96 wells plate) were used for extracellular ROS measurement and 300,000 HUVEC per well (6 wells plate) were employed for RNA isolation and protein extraction. Previously to the experiments, we made a 12h serum and supplements starvation period. Then, quiescent HUVEC were treated with gHSA or human serum albumin (HSA) at $25 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for 4 hours. All incubations were carried out at 37°C in 5% humidified CO_2 environment. None of the treatments affected cellular viability of HUVEC, as determined by cell count, morphology and trypan blue exclusion.

b) RNA isolation and polymerase chain reactions (PCR)

After the treatments cell culture medium was aspirated and floating cells were removed. Total cellular RNA from HUVEC was isolated with NucleoSpin® (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol and quantified with a spectrophotometer (Nanodrop ND-1000, Thermo Fischer). One μg of the isolated total RNA was reverse transcribed in a total volume of $30 \text{ } \mu\text{L}$, using random

primers and MMLV reverse transcriptase (Thermo Fischer) incubated for 50 min at 37 °C and 15 min at 42°C followed by 5 min at 95°C to inactivate the transcriptase. The single stranded cDNA (1-2 µL) were amplified by quantitative PCR with a real-time detection thermal cycler (Chromo4 PTC-200, MJ Research Bio-Rad) in a reaction mixture (20 µL) containing 10 µL FastStart SYBR Green Master (Roche), and 100 nmol · L⁻¹ of each primer. SYBR Green I fluorescence was measured after each amplification cycle. Melting curves were made at the end of each PCR experiment from 70 to 95 °C with steps of 1 °C and 1 s. The mRNA levels for each gene were determined by quantitative real-time PCR performed in duplicate. The relative expression ratio was calculated by the comparative threshold method using β-actin as housekeeping gene from the following equation: $R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, where ΔC_t is the cycle threshold value. Gene database accession numbers, sequences for sense (S) and antisense (A) primers, PCR conditions, cycle counts, and amplification fragment lengths are indicated in Table 1.

Gene numbers	Sequences	PCR	Cycles	Products
<i>NOX4</i> (human):	S: 5'-ctccgttggttcagatt-3'	30s, 95°C	40	245 bp
NM_016931.2	A: 5'-tgggtccacaacagaaaaca-3'	30s, 60°C		
		30s, 72°C		
<i>P22PHOX</i> (human):	S: 5'-cgcttcacccagtggtactt-3'	30s, 95°C	40	200 bp
NM_000101.2	A: 5'-gagagcaggagatgcaggac-3'	30s, 62°C		
		30s, 72°C		
<i>ACTB</i> (human):	S: 5'-ttctgacctatgccaccat-3'	30s, 95°C	40	149 bp
NM_001101.2	A: 5'-atggatgatgatcgccgcgctc-3'	30s,		
		60/62°C		
		30s, 72°C		
<i>NOS3</i> (human)	S: 5'-accctcacgctacaacatc-3'	30s, 95°C	40	198 bp
NM_000603.4	A: 5'-gctcattctccagggtcttc-3'	30s, 58°C		
		30s, 72°C		

TABLE 1. Gene database accession numbers, sequences for sense (S) and antisense (A) primers, PCR conditions, cycle counts, and amplification fragment lengths for the gene expression studies.

c) Nucleus-cytoplasm protein extraction

After the treatments of 300,000 HUVEC per well (6 wells plate), cell culture medium was aspirated and cells washed with PBS. Cells were detached with a

buffer (Buffer A) composed by (in $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 10 HEPES, 1 EDTA, 1 EGTA, 10 KCl, 1 dithiothreitol (DTT) and antiproteases (Roche, Mannheim, Germany) at pH of 7.9. Cells suspension was then lysed by adding NP-40 0.5% (v/v) to the reaction and incubating during 10 min. Cell lysate obtained was vortexed during 15 seconds and centrifuged ($200 \times g$, 5 min, 4°C) to separate non-lysed cells. The supernatant was recovered to another tube and centrifuged ($1500 \times g$, 15 min, 4°C) to separate the cytoplasm proteins (in the supernatant) and the nucleus (in the pellet). Nucleus were then lysed by incubation in a solution of Buffer A supplemented with glycerol 20% (v/v) and KCl $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ during 30 minutes with periodical vortexing. Nuclear proteins were recovered from the supernatant after a final centrifugation ($13000 \times g$, 15 min, 4°C).

d) Western blot

Western blot analyses were performed on nucleus and cytoplasm proteins extracts. Proteins were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in 10% (w/v) polyacrylamide gels and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane over 45 min at 280 mA. The PVDF transferred membranes were blocked for 1 hour at room temperature with skimmed milk 5% (w/v) in Tris-buffered saline Tween-20 (TBST) solution containing $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7,6), $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, and 0.1% (v/v) Tween 20. Membranes were then incubated with rabbit antibodies for p65 subunit of NF- κB (1:500 dilution; SantaCruz Biotechnology, California, USA) overnight at 4°C . After washing with TBST, membranes were incubated with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2,000 dilution; 1h at room temperature; Fisher Scientific, Madrid, Spain). Immunoreactive proteins were visualized using an enhanced chemiluminescence detection system (Fisher Scientific, Madrid, Spain), and were quantified densitometrically using ImageJ (1.37v) software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Results were expressed as the nucleus/cytoplasm ratio of the optical densitometry for p65 subunit, with respect to HSA treatment. Possible contamination of nucleus extract with cytoplasm proteins was checked by incubation with anti-human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase antibody (GAPDH; 1:1,000 dilution; SantaCruz Biotechnology, California, USA).

e) Measurement of ROS in HUVEC

Extracellular superoxide anion formation was determined by the cytochrome c reduction method previously described³⁵⁷. After treatments, HUVEC were incubated in a HBS supplemented with 1.5 mmol · L⁻¹ CaCl₂ (calcium rich HBS) and containing cytochrome c (200 μmol · L⁻¹). Superoxide production was induced by adding β- nicotinamide adenine dinucleotide reduced (NADH, 100 μmol · L⁻¹). The specificity for superoxide anion measuring was confirmed by superoxide anion dismutase (SOD; 100 U · mL⁻¹) inhibition, an enzymatic scavenger of these anions. In a series of experiments cells were preincubated with the following enzyme inhibitors, BAY11- 7082 2 μmol · L⁻¹ (NF-kB), SP600125 20 μmol · L⁻¹ (AP-1), LY294002 1.5 μmol · L⁻¹ (PI3K), SL327 10 μmol · L⁻¹ (MEK 1/2) or the inhibitor of eNOS, N(w)-nitro-L-arginine methylester (L-NAME; 100 μmol · L⁻¹) during 30 min prior to the treatments with HAS or gHSA and maintained during the 4 hours of these treatments. Cytochrome c reduction was monitored reading the absorbance at 550 nm on a microplate reader (VersaMax, Molecular Devices) during 60 min at 37 °C to obtain the ΔAbs_{550nm}/min of each experiment. Amadori products can autooxidise and reduce the ferrocytochrome c²³, so we assured that gHSA was not present in the moment of cytochrome c reduction measurement.

f) Drugs and Materials

The following drugs were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain): HSA, gHSA (we confirmed that the gHSA was AGE-free measuring the fluorescence at 360/40 Ex - 460/40 Em¹⁷), BAY11-7082, cytochrome c, LY294002, NADH, L-NAME, SL327 and P600125. BAY 11-7082, SP600125, LY 294002 and SL 327 were dissolved in pure dimethyl sulfoxide (DMSO) as stock solutions and then daily diluted in calcium rich HBS for the experiments. All other reagents were dissolved directly in calcium rich HBS. Final concentration of DMSO never exceeded 0.01% (v/v) in the experiments and proper controls were always made to assess any effect of the vehicle. Collagenase IA was from Gibco (Invitrogen S.A., Barcelona, Spain). Equipments, mediums and specific reagents or antibodies employed in the different techniques are indicated in the corresponding sections. All other reagents used in the experiments and in the preparation of working solutions were of the best commercially available quality.

g) Data analysis

Data are expressed as mean $\pm$ s.e.m. The mRNA levels of NOX4, P22PHOX and NOS3 were expressed as the fold change of each treatment with respect to HAS treatment. The activation of NF- κ B was expressed as the fold change respect to HAS treatment of the optical density ratio between nucleus and cytoplasm. ROS production was expressed as the ratio between the cytochrome c reduction rate of each treatment and the HSA treatment. Two-group comparisons were analyzed by the 2-tailed Student's t-test. Multiple comparisons were evaluated by ANOVA followed by Tukey test. Statistical significance was considered for $p < 0.05$.

Results

a) Role of the transcription factors in NOX4 and P22PHOX expression induced by gHSA.

Firstly, we studied the role of two transcription factors, NF- κ B and AP-1, which have been previously related to an expression change of NOX4 and P22PHOX. The expression of NOX4 and P22PHOX were quantified in HUVEC treated with HSA or gHSA (25 μ g/mL) for 4 hours. The expression levels after these treatments were measured both in the presence and in the absence of BAY11-7082 (2 μ M) or SP600125 (20 μ M), NF- κ B and AP-1 inhibitor, respectively, during 30 minutes before and during the 4 hours of treatment. Like in our previous work⁵, gHSA increased NOX4 and P22PHOX expression with respect to HSA (1.25 ± 0.10 NOX4 fold change for gHSA, $p < 0.05$, $n = 13$; Figure 1a; 1.12 ± 0.05 P22PHOX fold change for gHSA, $p < 0.05$, $n = 10$; Figure 1b).

The NF- κ B inhibitor, BAY11-7082, suppressed the gHSA-enhanced NOX4 expression (1.25 ± 0.10 NOX4 fold change for gHSA vs. 0.83 ± 0.10 fold change for gHSA+BAY, $p > 0.05$, $n = 5$; Figure 1a). This inhibitor tended to reduce P22PHOX expression but this reduction was not statistically significant (1.12 ± 0.05 P22PHOX fold change for gHSA vs. 0.91 ± 0.16 fold change for gHSA+BAY, $p > 0.05$, $n = 5$; Figure 1b). On the other hand, the treatment with AP-1 inhibitor SP600125 markedly increased NOX4 expression, independently of the treatment

with HSA or gHSA (2.16 ± 0.32 NOX4 fold change for HSA+SP600125, $p < 0.05$, $n = 6$; Figure 1a; 1.25 ± 0.10 NOX4 fold change for gHSA vs. 2.39 ± 0.51 NOX4 fold change for gHSA+SP600125, $p < 0.05$, $n = 6$; Figure 1a). Also, the presence of AP-1 inhibitor increased significantly P22PHOX expression in the presence of HSA (1.14 ± 0.07 P22PHOX fold change for HSA+SP600125, $p < 0.05$, $n = 5$; Figure 1b) but SP600125 in combination with gHSA did not modify P22PHOX expression with respect to gHSA alone (1.12 ± 0.06 P22PHOX fold change for gHSA vs. 1.12 ± 0.07 P22PHOX fold change for gHSA+SP600125, $p > 0.05$, $n = 5$; Figure 1b).

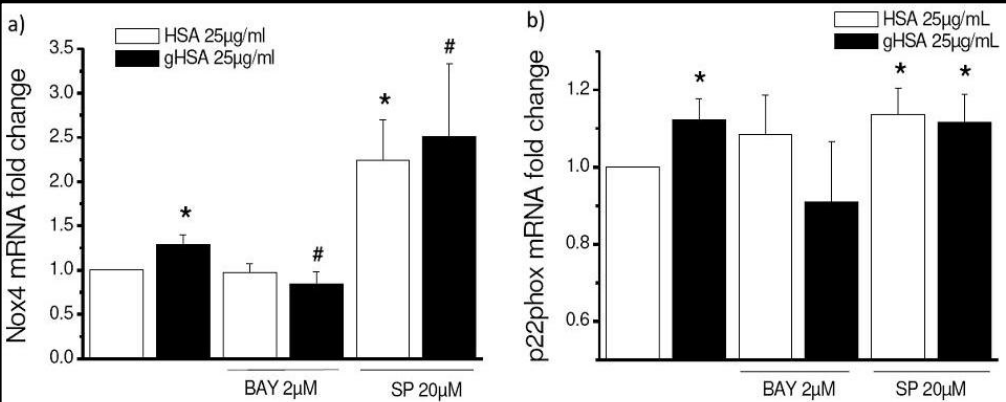


FIGURE 1. Role of NF-κB and AP-1 transcription factors in NOX4 and P22PHOX expression induced by gHSA.

mRNA expression of NOX4 (a) and P22PHOX (b) NADPH subunits in HUVEC pretreated with BAY11-7082 2µM (BAY) or SP600125 20µM (SP) during 30 minutes and in the presence of HSA (white columns) or gHSA (black columns) 25µg/mL during 4 hours. Columns represent the fold change with respect to HSA treatment of Mrna levels for each gene, expressed as mean values $\pm$ s.e.m. (vertical bars) of at least three independent experiments.

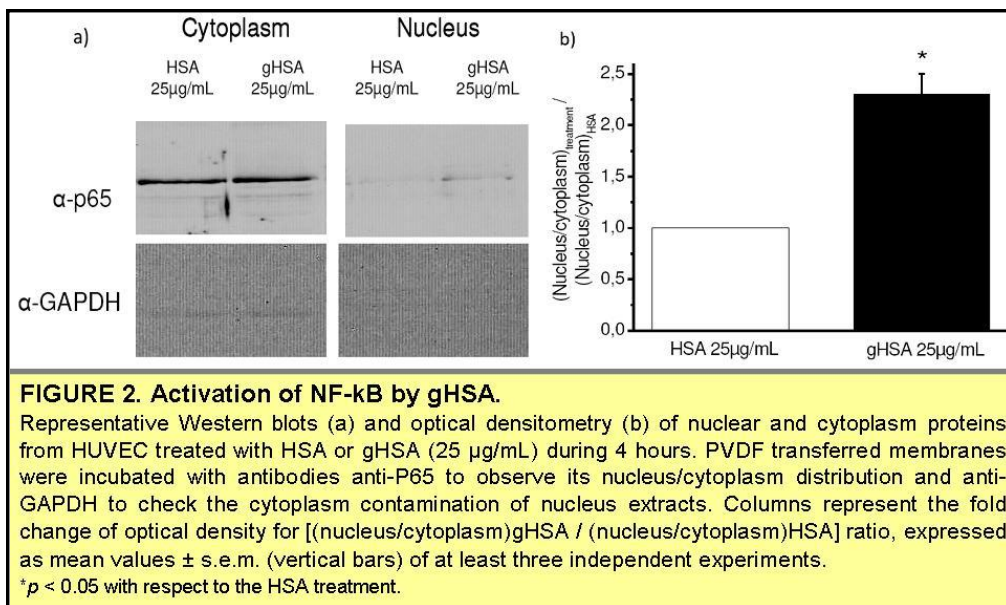
* $p < 0.05$ with respect to the HSA treatment; # $p < 0.05$ with respect to the gHSA treatment.

These results indicated the involvement of NF-κB in the gHSA-induced NOX4 expression. However, SP600125 modified NOX4 expression independently of HSA or gHSA. With regard to P22PHOX, AP-1 inhibition in the presence of HSA significantly up-regulated P22PHOX expression to the same levels than gHSA treatments.

Activation of NF-κB by gHSA

Since BAY 11-7082 2µM reverted gHSA-induced NOX4 up-regulation, we studied the effects of gHSA 25µg/mL for 4 hours in NF-κB activation. We carried out

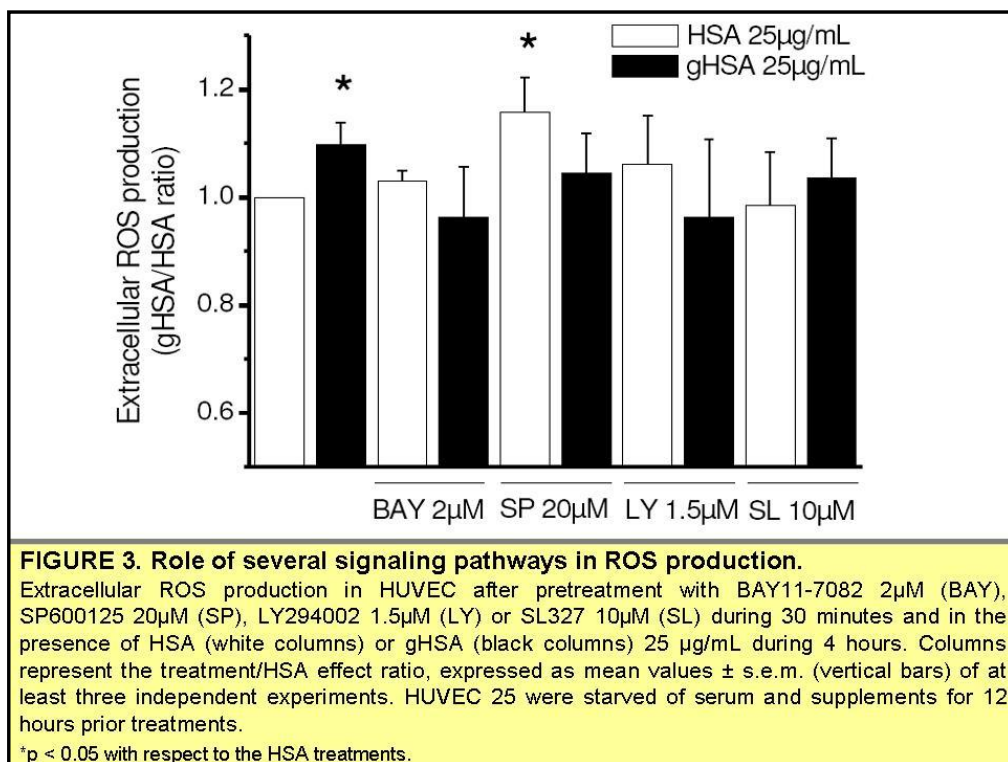
western blots to assess the presence of P65 NF- κ B subunit in the cytoplasm and in the nucleus of HUVEC treated with HSA or gHSA 25 μ g/mL (Figure 2a). It was observed a statistically significant increment of p65 subunit in the nucleus of HUVEC treated with gHSA for 4 hours (2.29 ± 0.23 fold change for gHSA, $p < 0.01$, $n = 3$; Figure 2b). These results demonstrated that gHSA activated the translocation of P65 subunit of NF- κ B to the nucleus. This activation of NF- κ B could be the reason for the increment of NOX4 mRNA levels induced by gHSA.



c) Role of several signaling pathways in ROS production

Previously, we have observed an increment in ROS production in HUVEC treated with gHSA 25 μ g/mL during 4 hours and it could be explained by an increment in NOX4 and P22PHOX subunits expression³⁵⁷. Now, we studied the effect of the inhibition of these transcription factors and of two important phosphorylation cascades in the gHSAinduced extracellular ROS production. Therefore, HUVEC were treated with HSA or gHSA (25 μ g/mL) for 4 hours in the presence and in the absence of the inhibitors of NF- κ B (BAY11-7082 2 μ M), AP-1 (SP600125 20 μ M), PI3K (LY294002 1.5 μ M) or MEK 1/2 (SL327 10 μ M). ROS production after HSA treatment was $6.58 \times 10^{-4} \pm 0.72 \times 10^{-4}$ Abs550nm/min ($n = 18$). gHSA increased ROS production significantly compared with HSA (1.09 ± 0.04 for gHSA, $p < 0.05$, $n=10$; Figure 3). None of the inhibitors had a statistically significant effect on this

gHSA-induced ROS production. The inhibition of NF- κ B transcription factor and PI3K tended to block the gHSA-induced ROS enhanced production, but the inhibition was not statistically significant. Interestingly, the AP-1 inhibitor, SP600125, in the presence of HSA significantly increased ROS production in comparison with HSA alone (1.15 ± 0.06 for HSA+SP, $p < 0.05$, $n = 5$; Figure 3). On the contrary, SP600125 in combination with gHSA did not significantly altered ROS production induced by gHSA alone (1.09 ± 0.04 for gHSA vs. 1.04 ± 0.07 for gHSA+SP600125, $p > 0.05$, $n = 5$; Figure 3).

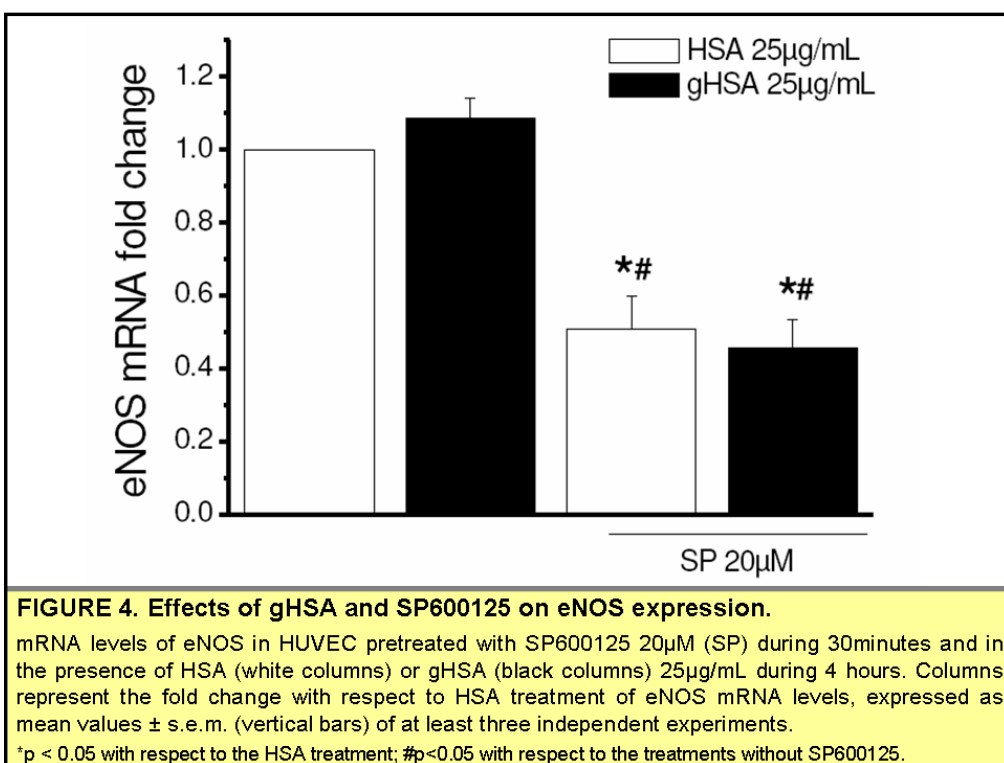


These results confirmed the enhanced extracellular ROS production induced by gHSA 25 μg/mL at 4 hours and showed an increment of ROS release in the presence of AP-1 inhibitor SP600125 with HSA 25 μg/mL treatment, but not with the combination of gHSA and SP600125. In summary, only AP-1 seemed to regulate ROS production and this regulation produced, at least in the presence of HSA, an increment of the extracellular ROS production in HUVEC. NF- κ B and PI3K showed a non-statistical tendency to regulate gHSA-induced ROS production.

d) Effects of gHSA and SP600125 on eNOS expression.

Nitric oxide (NO) produced by eNOS can react with superoxide anion and eNOS uncoupling can produce superoxide anion instead of NO³⁵⁹. Therefore, to assess the possible influence of eNOS on ROS production we have analysed its expression after SP600125 treatment in the presence of gHSA or HSA.

The eNOS expression was not changed in the presence of gHSA 25 µg/mL with respect to HSA 25 µg/mL (1.09 ± 0.05 eNOS fold change for gHSA, $p > 0.05$, $n = 5$; Figure 4). However, SP600125 showed a significant decrease on eNOS expression both in the presence of HSA (0.51 ± 0.09 eNOS fold change for HSA+SP600125, $p < 0.05$, $n = 5$; Figure 4) and in the presence of gHSA (0.46 ± 0.08 eNOS fold change for gHSA+SP600125 vs. 1.09 ± 0.05 eNOS fold change for gHSA, $p < 0.05$, $n = 5$; Figure 4).

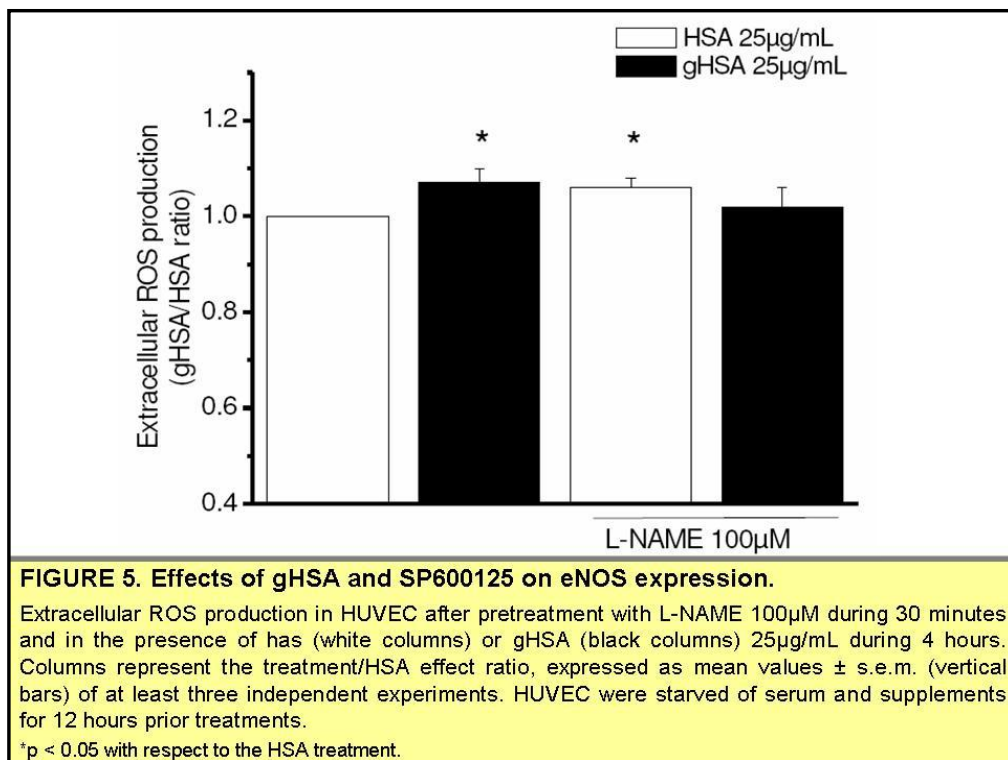


To summarize, gHSA 25µg/mL alone did not change eNOS expression levels, whereas the AP-1 inhibitor SP600125 significantly decreased eNOS expression independently of HSA and gHSA.

e) Effects of NOS activity on ROS production induced by gHSA.

As we have commented above, eNOS can be a source of superoxide anion when it is uncoupled⁷. Therefore, eNOS down-regulation by SP600125 would decrease ROS production if eNOS was uncoupled. On the contrary, down-regulation of wellfunctioning eNOS will cause an increase in superoxide anion biodisponibility (enhanced ROS production).

In order to determine the possible eNOS uncoupling in HUVEC, we measured the extracelular ROS production after treatment with HSA or gHSA (25 µg/mL) during 4 hours in the presence of the eNOS inhibitor L-NAME (100 µM). L-NAME (100µM), in the presence of HSA (25 µg/mL), induced a significant increment in ROS production (enhanced cytochrome c reduction), similar to that observed with gHSA (25 µg/mL) alone (1.06 ± 0.02 for HSA+L-NAME, $p < 0.05$, $n = 7$; Figure 5). On the other hand, the presence of L-NAME in the treatment with gHSA tended to decrease ROS production, although it was not statistically significant with respect to the treatment of gHSA alone (1.03 ± 0.05 for gHSA+L-NAME vs. 1.07 ± 0.03 for gHSA, $p > 0.05$, $n > 7$; Figure 5).



In summary, in the presence of HSA 25 µg/mL and L-NAME (100µM), HUVEC increased ROS production because the inhibition of NO production allowed higher superoxide anion biodisponibility. This effect was similar to that observed with the combination of SP600125 and HSA. On the contrary, L-NAME blocked the gHSA-induced ROS production. This could be explained if eNOS was uncoupled by gHSA, in which case eNOS inhibition would reduce superoxide anion production.

Discussion

For the first time, the regulation mechanisms of ROS production induced by Amadori glycated albumin in HUVEC are shown. We had previously demonstrated the enhanced ROS production in HUVEC treated during 4 hours with a low concentration of gHSA (25 µg/mL) and this increment in ROS production was related with an upregulation of NOX4 and P22PHOX NADPH oxidase subunits⁵. In the present work, we analyzed the regulation pathways of this enhanced extracellular ROS production. We studied the role of two important transcription factors, NF-κB and AP-1, and two important phosphorylation cascades mediated by PI3K and MEK 1/2. In summary, our data suggest that gHSA-induced extracellular ROS production is the combination of at least two mechanisms, 1) up-regulation of NADPH oxidase by NF-κB activation and 2) eNOS uncoupling. However, our results also showed that AP-1 activity is an important factor for the expression of NADPH oxidase and eNOS in HUVEC, independently of HSA or gHSA stimuli.

Our results demonstrated that NF-κB controlled the up-regulation of NOX4 induced by gHSA and that this Amadori product promoted translocation to the nucleus of p65, a subunit of NF-κB²⁴. This NF-κB activation by glycated proteins had been previously described in vascular smooth muscle cells²⁵, macrophage RAW cells¹⁵ and human peritoneal mesothelial cells²⁶. Manea et al. have shown that NF-κB regulated NOX4 expression in human aortic vascular smooth muscle cells¹⁹, but they did not observe an activation of NF-κB at 4 hours, as we did. With regard to P22PHOX, we observed a non-statistical tendency to a genetic

expression reduction after NF- κ B inhibition. However, other authors described a P22PHOX expression regulation by NF- κ B in human aortic smooth muscle cells²⁷. The inhibition of NF- κ B reversed the increased expression of NOX4 by gHSA and it could explain the slight decrease in the gHSA-induced ROS production in the presence of the NF- κ B inhibitor. Our results provide the first evidence of a role of AP-1 transcription factor on NADPH oxidase subunits expression in human endothelial cells. We chose SP600125 as a good pharmacological tool to study the role of AP-1²⁸. AP-1 inhibition by SP600125 induced a significant upregulation of NOX4 and P22PHOX subunits expression independently of the presence of HSA or gHSA. It was previously observed a role for AP-1 in the TNF- α -induced up-regulation of NOX4 and P22PHOX in human aortic smooth muscle cells²⁰ and Gauss et al. also showed in human myeloid cell lines a modulation by AP-1 of mRNA levels of P67PHOX, another NADPH oxidase subunit²⁹.

In correlation with NOX4 and P22PHOX expression modification, gHSA induced a significant increment of ROS production in HUVEC in comparison to non-glycated HSA, as we previously shown⁵. Although ROS enhancement could seem slight, small changes in oxidative stress in a chronic disease as diabetes can be very important. Moreover, low concentrations of gHSA as used in this work, are early reached and maintained in the diabetic process.

An increase in ROS production leads to a reduced biologic functions of eNOS by uncoupling the enzyme or by forming peroxynitrite from the reaction between NO and superoxide anion. Little is known about the effects of Amadori modified albumin on eNOS. Amore et al. did not see a change in eNOS production by gHSA treatment and they attributed all the effects of gHSA on NO production in endothelial cells to the inducible NOS^{30,31}. They observed an awesome increment of nitric oxide at high gHSA concentrations which induced apoptosis. We did not observed eNOS expression changes by gHSA or HSA treatments, but SP600125, the AP-1 inhibitor, significantly dropped eNOS mRNA levels independently of the presence of HSA or gHSA.

The eNOS promoter lacks of TATA box and has potential binding sites for AP-1³². AP-1 up-regulates eNOS transcription by cyclosporine A, hypoxia, shear stress

and nordihydroguaiaretic acid, whereas H₂O₂ decreased binding of AP-1 to the eNOS promoter, leading to a reduced eNOS expression³³. These data suggest an important role of AP-1 in eNOS expression. In agreement with these previous works we observed a decrease in eNOS expression when AP-1 activation was inhibited by SP600125. Interestingly, in human aortic endothelial cells, acute exposure (4 hours) to high glucose concentrations increased eNOS activity and expression, whereas chronic exposure (7 days) reduced NO production and eNOS expression at the same time that AP-1 activity increased, an effect reduced by the inhibition of ROS production³⁴. Surprisingly, the AP-1 inhibitor SP600125 only induced an increment of ROS production in the presence of HSA, but not with gHSA. The SP600125-induced downregulation of eNOS in HUVEC is important to explain this effect, since a reduced eNOS expression can increase superoxide anion biodisponibility.

On the other hand, the combination of gHSA on SP600125 reduced superoxide anion production. These results could be explained if eNOS was uncoupled in the presence of gHSA.

The experiments with L-NAME showed that gHSA uncoupled eNOS, since eNOS inhibition reduced gHSA-induced ROS production. However, L-NAME enhanced ROS production in the presence of HSA. So, our results suggested the uncoupling of eNOS by Amadori modified albumin.

There are several mechanisms to triggering the eNOS uncoupling: oxidation or degradation of (6R-) 5, 6, 7, 8 - tetrahydrobiopterin (BH₄), degradation of intracellular Larginine by arginases, uncoupling by oxidative stress through S-glutathionylation³⁵ and a possible role of asymmetric dimethyl-L-arginine (ADMA), an endogenous inhibitor of NOS⁷. Since BH₄ can be oxidized and suffer depletion by oxidative stress⁷, gHSA could uncouple eNOS by enhancing ROS production. ADMA was proposed as a possible mechanism for endothelial dysfunction induced by AGE³⁶. In rats treated with gBSA, was observed an increment of ADMA and a decrease of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH), the enzyme that degrades ADMA. In endothelial cells over-expressing DDAH, gBSA decreased DDAH expression and activity and, consequently, increased ADMA levels³⁷.

Without discard other possible mechanisms, the incremented ROS production with HSA+SP600125 and the decreased ROS production with gHSA+SP600125 can be explained by the uncoupling of eNOS by gHSA. That is, AP-1 inhibition with SP600125 induced down-regulation of eNOS and up-regulation of NADPH oxidase expression leading to an enhanced ROS production. This is the normal situation in the presence of HSA. However, AP-1 inhibition in the presence of gHSA resulted in a partial reduction of the gHSA-enhanced ROS production. This happens because, as we have shown, gHSA uncoupled eNOS, which in this situation produces superoxide anion instead of NO. So, part of the gHSA-induced ROS production came from the uncoupled eNOS (Figure 6). Therefore, down-regulation of eNOS by SP600125 in these conditions will partially reduce ROS production whereas the up-regulating effect of SP600125 on NADPH oxidase expression overlaps the gHSA activation of the same genes resulting in a null increase of the net ROS production.

	HSA	gHSA	HSA +SP600125	gHSA +SP600125
NADPH oxidase subunits expression	↓ ↑	↑	↑ ↑	↑ ↑
eNOS expression	↓ ↑	↓ ↑	↓	↓
Uncoupled eNOS	↓ ↑	↑	↓ ↑	↑
Net ROS production	↓ ↑	↑	↑	↓ ↑

FIGURE 6. The net ROS production hypothesis.

gHSA enhanced ROS production with respect to HSA because it up-regulated NADPH oxidase subunits expression and uncoupled eNOS. SP600125, independently of other co-treatments, up-regulated NADPH oxidase and down-regulated eNOS. So, the combination of SP600125 and HSA provokes a ROS production enhancement whereas the combination of SP600125 and gHSA did not induce any modification of the net ROS production.

Conclusions

Our data suggest that gHSA-enhanced ROS production in HUVEC is the result of the stimulation of two different sources of ROS. In one hand, by an unknown mechanism, gHSA uncouples eNOS, promoting ROS production instead of NO. In the other hand, gHSA activates NF- κ B and promotes NOX4 and P22PHOX, two subunits of NADPH oxidase, the main source of ROS in the endothelium. Furthermore, we observed that AP-1 is a main transcription factor controlling NADPH oxidase and eNOS expression in human endothelial cells. The inhibition of this factor translates a marked increase in ROS production. All these results open new ways to the investigation of the causes of endothelial dysfunction in cardiovascular diabetic complications.

References

1. Deshpande AD, Harris-Hayes M, Schootman M: Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther* 2008, 88(11):1254-1264.
2. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H: Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1988, 318(20):1315-1321.
3. Higgins PJ, Bunn HF: Kinetic analysis of the nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. *J Biol Chem* 1981, 256(10):5204-5208.
4. Makita Z, Vlassara H, Cerami A, Bucala R: Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *J Biol Chem* 1992, 267(8):5133-5138.
5. Rodino-Janeiro BK, Gonzalez-Peteiro M, Ucieda-Somoza R, Gonzalez-Juanatey JR, Alvarez E: Glycated albumin, a precursor of advanced glycation endproducts, up-regulates NADPH oxidase and enhances oxidative stress in human endothelial cells: molecular correlate of diabetic vasculopathy. *Diabetes Metab Res Rev* 2010, 26(7):550-558.

6. Cohen MP, Ziyadeh FN, Chen S: Amadori-modified glycated serum proteins and accelerated atherosclerosis in diabetes: pathogenic and therapeutic implications. *J Lab Clin Med* 2006, 147(5):211-219.
7. Forstermann U: Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch* 2010, 459(6):923-939.
8. Fatehi-Hassanabad Z, Chan CB, Furman BL: Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes. *Eur J Pharmacol* 2010, 636(1-3):8-17.
9. Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, Wakisaka M, Ibayashi S, Utsumi H, Iida M: Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* 2004, 109(2):227-233. 20
10. Yoo CW, Song CY, Kim BC, Hong HK, Lee HS: Glycated albumin induces superoxide generation in mesangial cells. *Cell Physiol Biochem* 2004, 14(4-6):361-368.
11. Higai K, Shimamura A, Matsumoto K: Amadori-modified glycated albumin predominantly induces E-selectin expression on human umbilical vein endothelial cells through NADPH oxidase activation. *Clin Chim Acta* 2006, 367(1-2):137-143.
12. Hattori Y, Kakishita H, Akimoto K, Matsumura M, Kasai K: Glycated serum albumin-induced vascular smooth muscle cell proliferation through activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal regulated kinase pathway by protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 281(4):891-896.
13. Choi KH, Park JW, Kim HY, Kim YH, Kim SM, Son YH, Park YC, Eo SK, Kim K: Cellular factors involved in CXCL8 expression induced by glycated serum albumin in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2010, 209(1):58-65.
14. Ichiki T, Funakoshi Y, Ito K, Takeshita A: Expression of monocyte chemoattractant protein-1 by nonenzymatically glycated albumin (Amadori adducts) in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 269(3):666-670.
15. Cohen MP, Shea E, Chen S, Shearman CW: Glycated albumin increases oxidative stress, activates NF-kappa B and extracellular signal-regulated kinase (ERK), and stimulates ERK-dependent transforming growth factor beta 1 production in macrophage RAW cells. *J Lab Clin Med* 2003, 141(4):242-249.

16. Mandl-Weber S, Haslinger B, Schalkwijk CG, Sitter T: Early glycated albumin, but not advanced glycated albumin, methylglyoxal, or 3-deoxyglucosone increases the expression of PAI-1 in human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 2001, 21(5):487-494. 21
17. Hattori Y, Suzuki M, Hattori S, Kasai K: Vascular smooth muscle cell activation by glycated albumin (Amadori adducts). *Hypertension* 2002, 39(1):22-28.
18. Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, Marie JC, Pouzet C, Samadi M, Elbim C *et al*: NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biol* 2004, 24(24):10703-10717.
19. Manea A, Tanase LI, Raicu M, Simionescu M: Transcriptional regulation of NADPH oxidase isoforms, Nox1 and Nox4, by nuclear factor-kappaB in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 396(4):901-907.
20. Manea A, Manea SA, Gafencu AV, Raicu M, Simionescu M: AP-1-dependent transcriptional regulation of NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells: role of p22phox subunit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008, 28(5):878-885.
21. Park S, Ahn JY, Lim MJ, Kim MH, Yun YS, Jeong G, Song JY: Sustained expression of NADPH oxidase 4 by p38 MAPK-Akt signaling potentiates radiation-induced differentiation of lung fibroblasts. *J Mol Med* 2010, 88(8):807-816.
22. Anrather J, Racchumi G, Iadecola C: NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *J Biol Chem* 2006, 281(9):5657-5667.
23. Hunt JV, Dean RT, Wolff SP: Hydroxyl radical production and autooxidative glycosylation. Glucose autooxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J* 1988, 256(1):205-212.
24. Zhang M, Kho AL, Anilkumar N, Chibber R, Pagano PJ, Shah AM, Cave AC: Glycated proteins stimulate reactive oxygen species production in cardiac myocytes: involvement of Nox2 (gp91phox)-containing NADPH oxidase. *Circulation* 2006, 113(9):1235-1243.

25. Hattori Y, Banba N, Gross SS, Kasai K: Glycated serum albumin-induced nitric oxide production in vascular smooth muscle cells by nuclear factor kappaB-dependent transcriptional activation of inducible nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 259(1):128-132.
26. Nevado J, Peiro C, Vallejo S, El-Assar M, Lafuente N, Matesanz N, Azcutia V, Cercas E, Sanchez-Ferrer CF, Rodriguez-Manas L: Amadori adducts activate nuclear factor-kappaB-related proinflammatory genes in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Br J Pharmacol* 2005, 146(2):268-279.
27. Manea A, Manea SA, Gafencu AV, Raicu M: Regulation of NADPH oxidase subunit p22(phox) by NF-kB in human aortic smooth muscle cells. *Arch Physiol Biochem* 2007, 113(4-5):163-172.
28. Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y *et al*: SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98(24):13681-13686.
29. Gauss KA, Bunger PL, Quinn MT: AP-1 is essential for p67(phox) promoter activity. *J Leukoc Biol* 2002, 71(1):163-172.
30. Amore A, Cirina P, Mitola S, Peruzzi L, Gianoglio B, Rabbone I, Sacchetti C, Cerutti F, Grillo C, Coppo R: Nonenzymatically glycated albumin (Amadori adducts) enhances nitric oxide synthase activity and gene expression in endothelial cells. *Kidney Int* 1997, 51(1):27-35.
31. Amore A, Cirina P, Conti G, Cerutti F, Bagheri N, Emancipator SN, Coppo R: Amadori-configured albumin induces nitric oxide-dependent apoptosis of endothelial cells: a possible mechanism of diabetic vasculopathy. *Nephrol Dial Transplant* 2004, 19(1):53-60.
32. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT: Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993, 268(23):17478-17488.
33. Kumar S, Sun X, Wedgwood S, Black SM: Hydrogen peroxide decreases endothelial nitric oxide synthase promoter activity through the inhibition of AP-1 activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008, 295(2):L370-377.

34. Srinivasan S, Hatley ME, Bolick DT, Palmer LA, Edelstein D, Brownlee M, Hedrick CC: Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells. *Diabetologia* 2004, 47(10):1727-1734.
35. Zweier J, Chen CA, Druhan LJ: S-glutathionylation reshapes our understanding of eNOS Uncoupling and NO/ROS-mediated signaling. *Antioxid Redox Signal* 2011, 14(10):1769-1775.
36. Yin QF, Fu SH, He P, Xiong Y: Dimethylarginine dimethylaminohydrolase inhibition and asymmetric dimethylarginine accumulation contribute to endothelial dysfunction in rats exposed to glycosylated protein: effects of aminoguanidine. *Atherosclerosis* 2007, 190(1):53-61.
37. Lu CW, Xiong Y, He P: Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 overexpression improves impaired nitric oxide synthesis of endothelial cells induced by glycated protein. *Nitric Oxide* 2007, 16(1):94-103.

ANEXO 2

Relation of Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products to Predict Mortality in Patients With Chronic Heart Failure Independently of Seattle Heart Failure Score

Sergio Raposeiras-Roubín, MD^{a,b}, Bruno K. Rodiño-Janeiro, BS^{a,b}, Lilian Grigorian-Shamagian, MD, PhD^{b,c}, María Moure-González, BN^a, Ana Seoane-Blanco, BN^a, Alfonso Varela-Román, MD^a, Luis Almenar-Bonet, MD^d, Ezequiel Álvarez, BPharm, PhD^{b,e,*}, and José R. González-Juanatey, MD, PhD^{a,b,e}

Knowledge of the role of the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGEs) in chronic heart failure (CHF) is very limited. In the present study, we measured plasma sRAGE levels in patients with CHF and examined whether plasma sRAGE predicts prognosis in patients with HF independently of validated scores as the Seattle Heart Failure Score (SHFS). We measured plasma sRAGE in 106 outpatients with CHF. Patients were prospectively followed during a median follow-up period of 1.3 years with end points of cardiac death or rehospitalization. Plasma sRAGE level increased with advancing New York Heart Association functional class, SHFS, age, and ischemic cause. Plasma sRAGE level was also higher in patients with cardiac death and/or events than in event-free patients. In Cox multivariate proportional hazard analysis, SHFS, sRAGE, and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide were independent risk factors for cardiac death (sRAGE hazard ratio 1.26, 95% confidence interval 1.09 to 1.45, $p = 0.002$) and/or cardiac events (sRAGE hazard ratio 1.07, 95% confidence interval 1.03 to 1.11, $p = 0.002$). Survival curves adjusted by Cox analysis clearly demonstrated that the high-sRAGE group (higher than median) had a significantly higher incidence of cardiac death than the low-sRAGE group ($p = 0.001$). In conclusion, sRAGE is a novel, highly sensitive, and specific prognostic marker in current optimally treated patients with CHF with an additive and independent value compared to the multimarker SHFS. © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved. (Am J Cardiol 2011;107:938–944)

The
American Journal
of Cardiology

The
American Journal
of Cardiology



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Cardiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijcard



Evidence for a role of advanced glycation end products in atrial fibrillation[☆]

Sergio Raposeiras-Roubín^a, Bruno K. Rodiño-Janeiro^a, Lilian Grigorian-Shamagian^{a,c}, Ana Seoane-Blanco^a, María Moure-González^a, Alfonso Varela-Román^a, Ezequiel Álvarez^{a,b,*}, José R. González-Juanatey^{a,b}

^a Cardiology Department, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Spain

^b Medicine Department, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

^c Cardiology Department, Hospital Meixoeiro de Vigo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 November 2010
Received in revised form 28 February 2011
Accepted 13 May 2011
Available online xxxx

Keywords:

Advanced glycation end products (AGEs)
Soluble receptor for AGE (sRAGE)
Atrial fibrillation
Oxidative stress
Left atrial remodelling

ABSTRACT

Background: Recent studies suggested that advanced glycation end-products (AGEs) and their receptor (RAGE) interaction may be promoted by inflammation and oxidative stress. These processes could also contribute to the pathogenesis of atrial fibrillation (AF), but their roles remain poorly defined. We studied the association of AGE–RAGE axis with AF in diabetic and non-diabetic patients, since the axis appears to play a key role in the process.

Methods: Ninety-seven consecutive outpatients were included in this transversal study. Fifty-nine patients were in sinus rhythm (SR) and 38 in permanent AF. Plasma fluorescent AGEs and soluble RAGE (sRAGE) were measured and comparisons between patients with and without AF were performed. A multivariate logistic regression analysis was made to define the independent factors associated with AF.

Results: Fluorescent AGEs and sRAGE were higher in AF group (74.9 ± 25.6 vs. 61.8 ± 20.1 a.u. for fluorescent AGEs, $p = 0.006$; 1714.2 ± 1105.5 vs. 996.1 ± 820.7 pg/mL for sRAGE, $p = 0.001$). These differences were specially marked in non-diabetic patients. Both AGEs and sRAGE directly correlated with left atrial dimensions ($r = 0.496$; $r = 0.536$ for atrial area and $r = 0.491$; $r = 0.511$ for atrial volume, for fluorescent AGEs and sRAGE, respectively, $p < 0.001$). In a multivariate analysis, fluorescent AGEs and sRAGE resulted as markers of AF independent of left atrial distension, diabetes and other confounding variables.

Conclusions: AGEs and sRAGE plasma levels were higher in patients with AF, independently of diabetes mellitus, and they positively correlated with atrial dimensions, indicating a role for the AGE–RAGE axis in the arrhythmogenic structural atrial remodelling.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.



Soluble receptor of advanced glycation end products levels are related to ischaemic aetiology and extent of coronary disease in chronic heart failure patients, independent of advanced glycation end products levels

New Roles for Soluble RAGE

Sergio Raposeiras-Roubín¹, Bruno K. Rodiño-Janeiro¹, Lilian Grigorian-Shamagian^{1,2}, María Moure-González¹, Ana Seoane-Blanco¹, Alfonso Varela-Román¹, Ezequiel Alvarez^{1,3*}, and José R. González-Juanatey^{1,3}

¹Cardiology Department and Coronary Unit, Clinical Hospital of Santiago de Compostela, Santiago, Spain; ²Cardiology Department, Hospital de Meixoeiro, Vigo, Spain; and ³Department of Medicine, University of Santiago de Compostela, Santiago, Spain

Received 12 January 2010; revised 5 April 2010; accepted 16 April 2010; online publish-ahead-of-print 3 August 2010

Aims	Knowledge of the role of advanced glycation end products (AGE), their receptor (RAGE), and the receptor's soluble form (sRAGE), in heart failure (HF) is very limited. We evaluated the clinical role of the AGE–RAGE system in HF and in particular any association it might have with ischaemic aetiology.
Methods and results	We measured fluorescent AGE, glycated albumin and sRAGE in 103 patients with chronic HF. We showed that sRAGE but not AGE was related to ischaemic aetiology (1638.3 ± 207.4 ischaemic vs. 1065.1 ± 94.2 pg/mL non-ischaemic group; $P = 0.016$) independent of age, sex, diabetes, renal function, clinical severity, or other variables (OR: 1.091; 95% CI (confidence interval): 1.032–1.153; $P = 0.007$). Moreover, sRAGE was directly associated with extent of coronary disease (OR for three vessel disease compared with non-coronary lesions: 1.186; 95% CI: 1.065–1.322; $P = 0.002$). We also found a correlation between sRAGE and severity of HF, which increased with New York Heart Association (NYHA) class (741.9 ± 88.9 pg/mL in class I, 1195.9 ± 113.2 pg/mL in class II, and 1724.8 ± 245.7 pg/mL in class III ($P < 0.05$)) and brain natriuretic peptide (BNP) levels (667.4 ± 68.0 vs. 1344.5 ± 126.0 pg/mL for BNP $<$ and ≥ 400 pg/mL, respectively).
Conclusion	sRAGE is an indicator of chronic heart failure severity and an independent marker of coronary artery disease and its severity in patients with CHF.
Keywords	Advanced glycation end products (AGE) • (soluble) AGE receptor [(s)RAGE] • Chronic heart failure • Coronary artery disease



Original

Productos de glicación avanzada: nuevo marcador de disfunción renal en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica

Sergio Raposeiras-Roubín^a, Bruno K. Rodiño-Janeiro^b, Lilian Grigorian-Shamagian^{a,c}, María Moure-González^a, Ana Seoane-Blanco^a, Alfonso Varela-Román^a, Ezequiel Álvarez^{b,d,*} y José R. González-Juanatey^{a,b,d}

^aServicio de Cardiología, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, España

^bLaboratorio de Investigación 6, Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago de Compostela, España

^cServicio de Cardiología, Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, España

^dDepartamento de Medicina, Facultad de Medicina y Odontología, Santiago de Compostela, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 8 de abril de 2010

Aceptado el 29 de junio de 2010

On-line el 12 de febrero de 2011

Palabras clave:

Productos finales de glicación avanzada

Insuficiencia cardíaca crónica

Insuficiencia renal

Enfermedad renal oculta

RESUMEN

Fundamento y objetivo: Los productos finales de glicación avanzada (AGE) están involucrados en la fisiopatología y pronóstico de la insuficiencia cardíaca (IC), acumulándose en situaciones como la insuficiencia renal (IR). El objetivo del estudio fue analizar la relación de AGE e IR en pacientes con IC crónica.

Material y método: Se incluyeron un total de 102 pacientes de forma consecutiva procedentes de la consulta de IC. Se obtuvieron datos clínicos y analíticos, con medición de hemoglobina glicada, péptido natriurético cerebral, cistatina C y AGE fluorescente, estimándose de cada paciente la tasa de filtración glomerular (TFG).

Resultados: El 40,2% de los pacientes presentaron una TFG < 60 ml/min/1,73 m² y el 11,7% enfermedad renal oculta. Los AGE presentaron una clara correlación positiva con la creatinina ($r = 0,685$, $p < 0,001$) y la cistatina C ($r = 0,682$, $p < 0,001$) y negativa con la TFG ($r = -0,720$, $p < 0,001$). La media de AGE fluorescentes en pacientes con IR fue mayor que en aquellos sin IR (media [DE] de 83,4 [3,3] URF frente a 56,8 [2,1] URF, $p < 0,001$). En cuanto a su valor para el diagnóstico de enfermedad renal oculta, los AGE fluorescentes presentaron un área bajo la curva ROC superior a la de otros parámetros de IR, como la cistatina C. El análisis multivariado demostró que los AGE fluorescentes son un marcador independiente de IR (odds ratio [OR] 1,06; intervalo de confianza del 95% [IC 95%] 1,024–1,097; $p = 0,001$).

Conclusiones: Los AGE actúan como un marcador de IR en pacientes con IC crónica, tanto diabéticos como no diabéticos, siendo superiores a la cistatina C en la detección de enfermedad renal oculta.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Advanced glycation end-products: new markers of renal dysfunction in patients with chronic heart failure

ABSTRACT

Keywords:

Advanced glycation end-products

Chronic heart failure

Kidney failure

Hidden kidney disease

Background and objectives: Advanced glycation end-products (AGE) are implicated in the physiopathology and prognosis of heart failure (HF) and they accumulate in situations such as kidney failure (KF). Our objective was to analyze the relation between AGE and KF in patients with chronic HF.

Materials and methods: 102 consecutive patients of our medical center were included. Clinical and analytical data were obtained, with measurement of glycated haemoglobin, brain natriuretic peptide, cystatin C and fluorescent AGE. Glomerular filtration rate (GFR) was estimated for each patient.

Results: 40.2% of patients presented GFR < 60 ml/min/1.73m² and 11.7% had hidden kidney disease (HKD). AGE correlated positively with creatinine ($r = 0.685$, $p < 0.001$) and cystatin C ($r = 0.682$, $p < 0.001$) and negatively with GFR ($r = -0.720$, $p < 0.001$). Medium value of fluorescent AGE in patients with KF was higher than those without KF (83.4 [3.3] URF vs 56.8 [2.1] URF, $p < 0.001$). With regard to the diagnostic value for HKD, fluorescent AGE presented an area under the ROC curve higher than other

ANEXO 3

Letters to editor:

- Raposeiras-Roubín S, Barreiro Pardal C, Paradela Dobarro B, Alvarez Castro E, González-Juanatey JR. **Advanced glycation end products: a mysterious shadow beyond the relationship between HbA1c and atrial fibrillation.** Internacional Journal of Cardiology (in press). Factor de impacto: 6.802.

- Raposeiras-Roubín S, Alvarez Castro E, González Juanatey JR. **"Is glycated hemoglobin an accurate enough predictor of subclinical myocardial injury or is a simple precursor of advanced glycation end products?".** Journal of American Colleague of Cardiology (in press). Factor de impacto: 14.292.

Advanced glycation end products:

a mysterious shadow beyond the relationship between HbA1c and atrial fibrillation

Sergio Raposeiras Roubín^a

Cristina Barreiro Pardal^b

Filomena Roubín Camiña^c

Bruno K. Rodiño Janeiro^a

Beatriz Paradela Dobarro^a

Ezequiel Álvarez Castro^a

Lilian Grigorian Shamagian^d

José Ramón González-Juanatey^a

a) Department of Cardiology, University Clinical Hospital of Santiago de Compostela, A Coruña, Spain

b) Department of Anesthesiology, Montecelo Hospital, Pontevedra, Spain

c) Laboratory Unit, University Meixoeiro Hospital, Vigo, Spain

d) Department of Cardiology, University Meixoeiro Hospital, Vigo, Spain

No conflict of interest

* Correspondence should be addressed to Sergio Raposeiras Roubín:
Cardiology Department. Clinical University Hospital of Santiago de Compostela.
Travesía Choupana s/n. 15706. Santiago de Compostela. A Coruña. Spain

Phone: 981950000. E-mail: raposeiras26@hotmail.com

Dear editor,

We have read with great interest the paper by Iguchi et al. entitled “HbA1c and atrial fibrillation: A cross-sectional study in Japan”¹. We congratulate them for the excellent and comprehensive article about the correlation between glycated hemoglobin (HbA1c) and prevalence of atrial fibrillation (AF). Of the total 52,448 participants (median age, 72 years; range, 65–78 years; 17,980 men), AF prevalence was 2.2% (1161/52,448). After classifying all participants by HbA1c level, the proportion of participants with AF was 2.2% (1073/49,498) in the low group and 3.0% (88/2950) in high group ($p = 0.005$). In addition with age, gender, vascular risk factors, and cardiac disease, authors identified clinical associations between AF and level of HbA1c. Their results indicated that the important factor for the AF was not only having diabetes mellitus but also glycemic control for several months. In low HbA1c group (HbA1c<6.5%) but not in the high HbA1c group, increasing HbA1c level was associated with the AF.

AF is the most common cardiac rhythm disturbance. The fundamental mechanisms underlying AF have been long debated. A growing body of evidence indicates that inflammation and oxidative stress contribute to the pathogenesis of AF, mediating atrial fibrosis. Related to this, there is a controversy about the relation between AF and diabetes mellitus (DM), a chronic illness with one of the most rapidly growing incidence in the western countries population. The presence of both pathologies increases the risk of major cardiovascular events. So, the understanding of this pathophysiological linkage would be essential to achieve a therapeutic risk reduction.

Non-enzymatic glycation of proteins and lipids occurs with ageing, but the process is markedly accelerated in the setting of DM and oxidative stress. The resulting new products are defined as advanced glycation end-products (AGEs). The increase of AGEs level is determined fundamentally by two factors: long-standing hyperglycaemia and high degree of oxidative stress. Several lines of evidence have emerged recently, indicating that the interaction of AGEs with their receptor (RAGE) is an important player in the initiation and propagation of inflammatory responses. In fact, high levels of AGEs and are associated with oxidative stress

and inflammatory activity, and they are even implicated in atrial fibrosis in animal models.

AGEs promote protein cross-linking which alters protein structure and function, as in the case of type I collagen and elastin in the extracellular matrix, resulting in atrial fibrosis. Apart from the changes in the extracellular matrix, resulting in a decrease of elasticity, AGE–RAGE interaction induces oxidative stress and activation of intracellular signalling, causing secretion of cytokines, contributing to inflammation and progression of fibrosis. Atrial fibrosis is a hallmark of arrhythmogenic structural remodelling. Taken together, these observations support an important pathophysiological role of AGE–RAGE axis in AF through inflammation, oxidative stress and atrial fibrosis.

In 2008 Kato et al² demonstrated in rats that DM promoted atrial structural remodeling via the activation of the AGEs-RAGE system with upregulating of connective tissue growth factor. Authors suggested that the inhibition of AGEs formation could be a novel upstream therapeutic approach for diabetes-related atrial fibrosis.

Recently, our research group published an article about the evidence of a role of advanced glycation end products in atrial fibrillation³. We demonstrated that AGEs plasma levels were higher in patients with AF, independently of diabetes presence of DM, and they positively correlated with atrial dimensions, indicating a role for the AGE–RAGE axis in the arrhythmogenic structural atrial remodelling.

With these comments we want to emphasize the role that AGEs can play in the genesis of AF. Probably the interaction between HbA1c and FA is due to the AGE plasma levels. We thought that this is a very interesting suggestion in terms of research and development of new therapies (*AGEs breakers*) for prevention of AF.

References

1. Iguchi Y, Kimura K, Shibazaki K, Aoki J, Sakai K, Sakamoto Y, Uemura J, Yamashita S. HbA1c and atrial fibrillation: A cross-sectional study in Japan. *Int J Cardiol.* 2012;156(2):156-9.
2. Kato T, Yamashita T, Sekiguchi A, Tsuneda T, Sagara K, Takamura M, Kaneko S, Aizawa T, Fu LT. AGEs-RAGE system mediates atrial structural remodeling in the diabetic rat. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2008;19(4):415-20.
3. Raposeiras-Roubín S, Rodiño-Janeiro BK, Grigorian-Shamagian L, Seoane-Blanco A, Moure-González M, Varela-Román A, Alvarez E, González-Juanatey JR. Evidence for a role of advanced glycation end products in atrial fibrillation. *Int J Cardiol.* 2011 Jun 6. [Epub ahead of print]

Is glycated hemoglobin an accurate enough predictor of subclinical myocardial injury or is a simple precursor of advanced glycation end products?

Sergio Raposeiras Roubín^a

Cristina Barreiro Pardal^b

Ezequiel Álvarez Castro^a

José Ramón González-Juanatey^a

a) Department of Cardiology, University Clinical Hospital of Santiago de Compostela, A Coruña, Spain

b) Department of Anesthesiology, Montecelo Hospital, Pontevedra, Spain

No conflict of interest

* Correspondence should be addressed to Sergio Raposeiras Roubín:
Cardiology Department. Clinical University Hospital of Santiago de Compostela.

Travesía Choupana s/n. 15706. Santiago de Compostela. A Coruña. Spain

Phone: 981950000. E-mail: raposeiras26@hotmail.com

Dear editor,

We read with interest the elegantly written paper by Rubin et al. [1] relating to the analysis of the association between categories of glycated haemoglobin (HbA_{1c}) and high-sensitivity cardiac troponin-T (hs-cTnT) in participants without coronary heart disease in the ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) study. In a community-based population of almost 10,000 subjects without clinically evident CHD, chronic hyperglycemia was independently associated with subclinical myocardial injury, as assessed by elevated levels of hs-cTnT in both persons with and without diabetes.

We congratulate the authors for this research. However, we have some major concerns regarding the explanation that the authors find to this relationship. In particular, although the authors already refer in the discussion that advanced glycation end-products (AGE) may play an important role in the association between HbA_{1c} and hs-cTnT, we would like to emphasize this interaction. Interestingly, within the DCCT study [2], AGE levels were a better predictor of progression to complications than HbA_{1c}, with over a third of the variance in complications attributed to differences in AGE indices. The influence of AGE levels was even more evident in the intensive glycaemic control cohort, suggesting that, while glycaemic control is important, it is not sufficient to prevent progressive complications

AGE are molecules that appear in plasma and tissues and are generated non-enzymatically by glycation and oxidation of proteins as a consequence of the Maillard reaction, which is driven by oxidative stress in its final step. Arteriosclerosis and diastolic dysfunction are more prevalent in both diabetic patients and those with renal impairment; in this context, AGEs may provide the common pathophysiological link. An increase in AGEs can be determined fundamentally by two factors: the existence of chronic hyperglycaemia and/or a high degree of oxidative stress [3]. Although AGEs occur as a result of hyperglycaemia, their effects can occur independently of glycaemic control. This finding may explain the paradoxical progression of diabetic complications in some patients with comparatively good glycaemic control. Results from the DCCT are consistent with the hypothesis that other factors such as oxidative stress may be

more important mediators of advanced glycation than hyperglycaemia per se in patients already receiving interventions directed towards improved glycaemic control

We introduce the question about whether the relationship between HbA1c and hs-cTnT is primary or is mediated by AGE. Perhaps it would be necessary to conduct a multivariate analysis to consider whether HbA1c levels predict silent coronary disease regardless of the levels of AGEs.

References

1. Rubin J, Matsushita K, Ballantyne CM, Hoogeveen R, Coresh J, Selvin E. Chronic hyperglycemia and subclinical myocardial injury. *J Am Coll Cardiol* 2012; 59(5):484-9.
2. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33) *Lancet* 1998; 352: 837–53.
3. Yao D, Brownlee M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes* 2010; 59(1): 249-55.