



Ruolo del polimorfismo del gene RAGE in pazienti affetti da Scompenso Cardiaco con e senza evidenza angiografica di aterosclerosi coronarica emodinamicamente significativa

Alberto Benzi¹, Sara Bozzini², Benedetta Matrone¹, Anna Colonna¹, Marialisa Bondesan¹, Rossana Falcone¹, Margherita Calcagnino¹, Colomba Falcone¹

¹U.O. di Cardiologia, Ospedale Universitario "Istituti Clinici di Pavia e Vigevano", e ²Centro Interdipartimentale di Medicina Molecolare (CIRMC), Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italia

Ruolo del polimorfismo del gene RAGE in pazienti affetti da Scompenso Cardiaco con e senza evidenza angiografica di aterosclerosi coronarica emodinamicamente significativa

Nello scompenso cardiaco (SC), malattia multifattoriale in cui giocano un ruolo diversi fattori, varianti genetiche possono influenzarne lo sviluppo, la progressione e la risposta alla terapia farmacologica. Poco si sa circa il ruolo del sistema AGE-RAGE nello SC. Al fine di identificare i possibili rapporti tra il polimorfismo -374 T/A del gene RAGE e lo SC abbiamo quindi arruolato 386 pazienti con SC sia post-ischemico sia secondario a causa non ischemica e 639 con Coronary Artery Disease (CAD). Dalla nostra analisi è emerso che le frequenze del genotipo AA e dell'allele A erano significativamente più basse nei pazienti con SC post-ischemico rispetto a quelli con SC secondario a cause non-ischemiche e fra i pazienti con almeno una lesione coronarica emodinamicamente significativa, sia tra quelli con SC che tra quelli con CAD, rispetto a quelli a coronarie indenni. In conclusione, la nostra ricerca suggerisce che il polimorfismo -374 T/A sia legato alla genesi della malattia aterosclerotica coronarica, ma non alla sua evoluzione e conferma, anche fra la popolazione con SC di origine non-ischemica, il ruolo protettivo del genotipo AA nello sviluppo della malattia aterosclerotica.

Rage gene polymorphism in Heart Failure patients with and without angiographic evidence of significant coronary atherosclerosis

In Heart Failure (HF), a multifactorial disorder in which take a part various factors, common gene variants could affect developing, progression and response to pharmacological therapy. Little is known about the role of the AGE-RAGE system in HF. To identify possible relationship between -374 T/A RAGE gene polymorphism with HF, we studied 386 subjects with HF and 639 patients with Coronary Artery Disease (CAD). The frequencies of AA genotype and A allele were significantly lower in patients with post-ischemic HF with respect to HF secondary to non-ischemic causes and between the HF patients with at least one hemodynamically significant coronary lesion, both HF and CAD, and patients free from evidence of coronary significant lesions. In conclusion, our research reveals that the -374 T/A polymorphism is related to the genesis of atherosclerotic coronary artery dis-

ease but not to its evolution. It is therefore confirmed also in the HF population with non-ischemic origin, the protective role of AA genotype in respect of atheromatous disease.

Introduzione

Il recettore per i prodotti finali della glicazione avanzata (RAGE) è una proteina transmembrana, localizzata sulla superficie cellulare che, essendo in grado di riconoscere molecole tridimensionali, anziché sequenze amminoacidiche, rende questa molecola in grado di interagire con ligandi diversi [1]. RAGE rappresenta un importante componente dell'immunità innata contro i patogeni, ma interagisce anche con ligandi endogeni, causando infiammazione cronica. Il legame di RAGE sulla superficie cellulare innesca una serie di eventi di segnalazione cellulare, tra cui l'attivazione e la traslocazione nel nucleo del fattore di trascrizione NF-kappaB, che portano alla produzione di citochine pro-infiammatorie, chemochine, molecole di adesione e stress ossidativo causando infiammazione [2]. La trasmissione dei segnali RAGE è implicata in molteplici patologie umane, tra le quali il diabete mellito, l'aterosclerosi, l'artrite, la malattia di Alzheimer e altre malattie associate all'invecchiamento. Nonostante una serie di domande ancora senza risposta, RAGE ha senza ombra di dubbio un ruolo nell'inibire l'infiammazione AGE-mediata nell'uomo [3]. Il gene per il recettore RAGE è localizzato sul cromosoma 6p21.3 nel locus HLA e all'interno di tale gene sono stati individuati diversi polimorfismi, tra cui il -374 T/A [4]. Questo polimorfismo funzionale comunemente studiato ha un ruolo sull'attività trascrizionale, per cui le sue diverse varianti hanno suscitato notevole interesse [5-7]. L'omozigosi per l'allele A è stata suggerita come marcatore genetico di protezione dall'aterosclerosi nei pazienti diabetici tipo 1 e tipo 2 [8, 9]. Inoltre, studi eseguiti in soggetti non diabetici hanno dimostrato che il genotipo omozigote AA potrebbe legato ad una riduzione angiografica di lesioni coronariche aterosclerotiche, ad un miglioramento della sopravvivenza nei pazienti con malattia coronarica e ad una minore incidenza di restenosi nei pazienti sottoposti ad impianto di stent coronarico [10-12].

Scopo del lavoro

Lo scopo principale del presente studio è stato quello di definire il ruolo del polimorfismo RAGE -374 T/A nelle forme più comuni di disfunzione ventricolare sinistra e di identificare i possibili rapporti esistenti tra tale polimorfismo e insufficienza cardiaca.

Materiali e metodi

Studio di popolazione

La popolazione dello studio è costituita da 1,025 soggetti di razza caucasica (827 uomini e 198 donne) giunti per valutazione clinica presso il dipartimento di cardiologia dell'Ospedale Universitario di Pavia. Trecentoottantasei pazienti erano affetti da scompenso cardiaco e presentavano, ad una valutazione ecocardiografica, una LVEF depressa (Left Ventricular Ejection Fraction < 45%), 639 pazienti, senza LVEF depressa, usati come gruppo di controllo, avevano CAD documentata all'angiografia coronarica. Sono stati esclusi dallo studio: i pazienti con sindrome coronarica acuta o insufficienza cardiaca acuta entro 3 mesi, i pazienti con stati infiammatori acuti o con esacerbazioni in atto di malattie infettive, malattie infiammatorie croniche o autoimmuni e i pazienti con neoplasie note, i pazienti con insufficienza renale o epatica, i pazienti con macroalbuminuria e i pazienti con nota forma acquisita di cardiomiopatia dilatativa.

I pazienti inclusi nello studio sono stati sottoposti alle seguenti indagini: una anamnesi accurata, remota e prossima, con l'individuazione dei principali fattori di rischio cardiovascolare; visita cardiologica; rilievo della pressione arteriosa basale, sia sistolica che diastolica; campione periferico di sangue venoso per la determinazione del genotipo di RAGE -374 T/A; angiografia coronarica.

I fattori di rischio cardiovascolare sono stati definiti come segue: ipertensione arteriosa (pressione sistolica >140 mmHg o pressione diastolica >90 mmHg o terapia antiipertensiva), storia familiare di CAD (malattia coronarica in un parente di primo grado di età inferiore ai 60 anni), fumo di sigaretta, iperlipidemia, diabete mellito. Per quanto riguarda il fumo di sigaretta, i soggetti sono stati raggruppati nei sottogruppi "sempre" o "mai": nel gruppo "sempre" sono stati inclusi tutti quei soggetti che avevano fumato ogni giorno per almeno 1 anno. Sono stati definiti dislipidemici i pazienti con livelli di colesterolo superiori a 200 mg/dl o in trattamento con farmaci ipolipemizzanti. La diagnosi di diabete mellito è stata posta in pazienti precedentemente trattati con diete per diabetici, che avevano ricevuto farmaci antidiabetici orali o insulina o che avevano riscontrato un valore di glicemia a digiuno superiore a 126 mg/dL. Prima dello studio tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato. Lo studio è stato condotto in accordo con le Linee Guida della Dichiarazione di Helsinki per la ricerca umana e con le Linee Guida del nostro comitato etico locale.

Angiografia coronarica

L'Angiografia coronarica è stata eseguita secondo la tecnica Judkins. La ventricolografia sinistra è stata effettuata prima dell'angiografia coronarica. In tutti i pazienti sono stati calcolati i valori di volume ventricolare e la frazione di eiezione del ventricolo sinistro.

Ecocardiografia

Ecocardiografia M-mode, bidimensionale e Doppler sono state eseguite con un sistema ecografico dotato di trasduzione, multi-frequenza in conformità con le Linee Guida. Tutte le immagini sono state memorizzate digitalmente e analizzate off-line con il software per PC Dimensioni EchoPAC (GE Medical). Il volume telediastolico, telesistolico e la frazione d'eiezione del ventricolo sinistro sono stati misurati in proiezione apicale a 4 e 2 camere utilizzando la formula biplane Simpson, sempre in conformità con le Linee Guida. Il Picco precoce (E) e tardivo (A) della velocità di riempimento, rapporto E/A e il tempo di decelerazione della velocità sono stati misurati dal modello LV-afflusso alle punte della valvola mitrale alla fine dell'inspirazione. La misurazione della pressione arteriosa polmonare sistolica è stata eseguita utilizzando la velocità massima di rigurgito alla valvola tricuspide utilizzando il Doppler continuo.

Analisi del genotipo RAGE

Il DNA genomico è stato estratto da sangue trattato con acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) utilizzando il kit di purificazione del DNA GFX Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Il polimorfismo -374T/A del promotore RAGE è stato analizzato mediante PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism). La sequenza del promotore RAGE contenente il polimorfismo -374T/A è stata amplificata mediante PCR. Le sequenze dei primer erano 5'-CCTGGGTTTAGTTGAGATTTTT-3' per il primer upstream e 5'-GAAGGCACTTCCTCGGGTTCT-3' per il primer downstream. Le condizioni di amplificazione sono: 94° C per 2 min, 30 cicli a 94° C per 30 sec, 58° C per 30 sec, 72° C per 1 min, ed infine 10 min a 72° C. Il prodotto di PCR (671 bp) è stato quindi sottoposto a digestione enzimatica con l'endonucleasi di restrizione Tsp509 I (New England Biolabs, Beverly, MA) per 16 ore a 65 ° C. I risultati della digestione enzimatica sono stati quindi visualizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio al 3%. Il trattamento dell'allele T con Tsp509 portava alla produzione di cinque frammenti di 284 bp, 217 bp, 110 bp, 44 bp e 16 bp. Nel caso dell'allele A, la digestione ha prodotto quattro frammenti di

327 bp, 284 bp, 44 bp e 16 bp. Per ridurre la possibilità di errori di genotipizzazione, tutti i risultati sono stati registrati da due ricercatori indipendenti in cieco riguardo allo stato clinico dei pazienti.

Analisi statistica

L'ipotesi di distribuzione normale per le variabili continue è stata testata secondo le statistiche di Kolmogorov-Smirnov. Le variabili continue sono state espresse come $\text{media} \pm \text{deviazione standard}$ nel caso della distribuzione gaussiana e come mediana (range interquartile) nel caso di variabili con distribuzione non normale. I dati sono stati analizzati con il test t di Student. Le variabili categoriche sono state confrontate con il test chi-quadro. Un'analisi di regressione lineare è stata effettuata per valutare la possibile correlazione tra il sRAGE plasmatico e le variabili clinico-strumentali. La significatività statistica è stata definita come $p < 0.05$.

Risultati

Le caratteristiche cliniche e biochimiche dell'intera popolazione sono indicate in Tabella I. Abbiamo osservato differenze significative nella frequenza di diabete ($p < 0.01$), ipertensione ($p < 0.01$), ipercolesterolemia ($p < 0.001$), storia familiare di malattia coronarica ($p < 0.001$) tra i pazienti con scompenso cardiaco e quelli con malattia coronarica. Le distribuzioni genotipiche e alleliche del polimorfismo -374 T/A sono riportate in Tabella II. Le distribuzioni delle frequenze di ciascun genotipo del polimorfismo sono in equilibrio di Hardy-Weinberg. La frequenza di omozigosi per l'allele -374 A è emersa essere significativamente più bassa nei pazienti con CAD rispetto a quelli senza CAD e, mediante analisi di regressione logistica multipla, il genotipo AA del polimorfismo -374 T/A è stato dimostrato essere indipendentemente associato con un ridotto rischio di CAD. Nel nostro studio, non sono emerse differenze statisticamente significative tra le due patologie né per quanto riguarda le frequenze alleliche né per quelle genotipiche.

Suddividendo la popolazione con SC in base alla genesi della malattia, sono stati creati un sottogruppo di pazienti con malattia secondaria a cause non-ischemiche ($n=228$) ed un sottogruppo di pazienti con scompenso cardiaco post-ischemico ($n=158$); quest'ultimi presentavano evidenza angiografica di aterosclerosi coronarica significativa in almeno uno degli assi coronarici principali. Le caratteristiche cliniche e le distribuzioni genotipiche e alleliche del polimorfismo -374 T/A in pazienti con SC, suddiviso sulla base dei risultati della coronarografia, sono riportate in Tabella III. Come previsto, i fattori di rischio comuni per CAD erano significativamente più frequenti nei pazienti con SC post-ischemico. Il campione del genotipo AA era significativamente più basso nei pazienti con SC post-ischemico rispetto a SC da cause non-ischemiche (11% vs 24%, $p < 0.001$). Una differenza significativa tra i due gruppi è stata anche osservata per quanto riguarda l'allele A che risulta presente nel 33% del gruppo post-ischemico e nel 48% del gruppo non-ischemico ($p < 0.0001$). Dopo la correzione per i comuni fattori di rischio per CAD, il genotipo AA del polimorfismo -374 T/A è rimasto significativamente correlato con lo SC post-ischemico ($p < 0.01$).

Infine, si è suddivisa la popolazione in base alla presenza o meno di coronaropatia: ciò ha permesso quindi di riconoscere un gruppo di pazienti con evidenza di aterosclerosi coronarica ed un gruppo di pazienti liberi da lesioni coronariche emodinamicamente significative. I Risultati delle analisi genotipica ed allelica per il polimorfismo -374 T/A nel gene RAGE sono riportate in Tabella IV. Differenze nelle frequenze genotipiche del genotipo omozigote AA sono state trovate tra i pazienti con scompenso cardiaco liberi da lesioni coronariche rispetto a quelli con almeno una lesione coronarica emodinamicamente significativa, sia SC che CAD. In particolare, questo genotipo si è rivelato più frequente nei pazienti senza malattia coronarica rispetto a quelli con aterosclerosi coronarica (rispettivamente 24% vs 15%, $p < 0.01$). Per quanto riguarda le frequenze alleliche, invece, l'allele T si è rivelato presente più frequentemente nella popolazione con CAD rispetto ai pazienti con scompenso cardiaco senza lesioni coronariche ($p < 0.001$).

Discussione

Nel corso degli anni è stato ampiamente studiato il ruolo del recettore RAGE nel processo infiammatorio, nel diabete e nelle malattie cardiache. I ligandi maggiormente analizzati di questo recettore sono gli AGEs e la loro presenza è stata trovata nel tessuto aterosclerotico di pazienti con e senza diabete, ma anche in molti processi infiammatori. Partendo dal fatto che l'espressione di RAGE favorisce l'amplificazione del processo della malattia, specialmente ateromatosa, diversi studi hanno analizzato la regolazione della trascrizione del gene che codifica il recettore RAGE dimostrando come il polimorfismo -374 T/A del promotore del gene svolga un ruolo chiave nella regolazione della trascrizione: in particolare, è emerso come l'allele A abbia una maggiore efficienza trascrizionale [6]. Analisi successive hanno cercato di valutare l'associazione tra il polimorfismo di RAGE e lo sviluppo di malattie, soprattutto infiammatorie [3]. Nel diabete è stato reso noto come le complicanze cardiache (cardiopatia ischemica, in particolare infarto del miocardio) siano più frequenti nei pazienti con genotipo AT o TT ed è stato anche scoperto come gli individui con genotipo AA abbiano avuto complicanze cardiovascolari meno frequentemente [9]. Lavori precedenti del nostro gruppo di ricerca hanno valutato il ruolo del polimorfismo -374 T/A in pazienti con CAD evidenziando frequenze superiori di genotipo TT in pazienti con malattia coronarica [10] e una correlazione negativa tra il genotipo omozigote per l'allele A e la gravità della malattia stessa. Il genotipo AA, infatti, era correlato ad un numero minore di vasi stenotici [11]. È stato inoltre dimostrato che i pazienti con genotipo omozigote AA presentano un minor rischio di restenosi dopo impianto di stent coronarico [12].

Il presente studio analizza per la prima volta il ruolo del polimorfismo -374 T/A nel gene RAGE come possibile fattore predisponente allo sviluppo di scompenso cardiaco. L'insufficienza cardiaca è una malattia sempre più diffusa, con una considerevole morbilità e mortalità. Molti meccanismi causali sono facilmente identificabili nella pratica clinica, ma gli eventi che determinano la progressione del danno verso l'insufficienza cardiaca e il rimodellamento ventricolare avverso non sono ancora chiari. L'età, il diabete mellito, l'insufficienza renale, noti fattori di rischio per SC, concorrono a determinare l'accumulo di prodotti AGE che possono cambiare l'idrofilia, il turnover e l'elasticità della matrice extracellulare [20]. Tessuti ricchi in AGEs producono alti livelli di RAGE e l'interazione ligando-recettore innesca la trasduzione del segnale inducendo un'attivazione cronica delle cellule che impedisce la normale riparazione tissutale [19,20]. Gli AGEs possono pertanto contribuire allo sviluppo della disfunzione attraverso alterazioni strutturali e funzionali del miocardio, per esempio mediando la formazione di legami crociati tra proteine intra ed extracellulari. L'attivazione ligando-mediata di RAGE potrebbe altresì concorrere all'amplificazione del processo infiammatorio e quindi all'espressione di citochine coinvolte nel rimodellamento ventricolare [2]. Il recettore RAGE attivato potrebbe quindi condurre ad un significativo ritardo nell'uptake di Ca^{2+} intracellulare e aumentare quindi la durata della fase di ripolarizzazione mediante alterazione del metabolismo dei miociti. Nella nostra valutazione non sono emerse differenze significative tra pazienti con CAD e SC per quanto riguarda le frequenze alleliche e genotipiche. Suddividendo invece i pazienti con scompenso cardiaco in base alla genesi della malattia, si è rilevata una prevalenza del genotipo omozigote AA in pazienti con SC non ischemico. Questi dati confermano i risultati dei nostri studi precedenti che hanno mostrato una maggiore prevalenza di genotipo AA nella popolazione sana rispetto alla popolazione di pazienti con cardiopatia ischemica. Il genotipo AA sembra essere associato ad una minore espressione del recettore RAGE di superficie e, di conseguenza, ad una minor stimolazione del processo infiammatorio. Inoltre, frazionando la popolazione in base alla presenza o all'assenza di CAD, indipendentemente dalla presenza/assenza di deterioramento della funzione contrattile, si è dimostrato come il genotipo AA sia più diffuso in pazienti senza lesioni coronariche rispetto a pazienti con aterosclerosi coronarica; nei pa-

zienti con CAD, invece, vi è una prevalenza dell'allele T. In conclusione, la nostra ricerca mostra come il polimorfismo -374 T/A del gene RAGE sia correlato alla genesi della malattia aterosclerotica coronarica, ma non alla sua evoluzione. Si conferma pertanto il ruolo protettivo del genotipo AA in materia di malattia aterosclerotica anche fra la popolazione con scompenso cardiaco di origine non-ischemica. Tuttavia, la coronaropatia è una malattia multifattoriale in cui giocano un ruolo più fattori di rischio, sia genetici che ambientali; un singolo allele o genotipo non può essere considerato fattore causale, ma solo un fattore predisponente o di protezione. Altri studi sono quindi necessari per definire meglio il ruolo del polimorfismo nell'eziologia della malattia coronarica.

Tabelle e figure

Tabella 1. Caratteristiche cliniche dei partecipanti allo studio.

	SC (n=386)	CAD (n=639)	P value
<i>Maschi, n (%)</i>	323 (83%)	507 (79%)	n.s.
<i>Età, mediana ±SD</i>	63±8	62±10	n.s.
<i>Iperensione, n (%)</i>	126 (33%)	375 (59%)	P<0.01
<i>Ipercolesterolemia, n (%)</i>	58 (15%)	466 (73%)	P<0.001
<i>Diabete, n (%)</i>	116 (30%)	332 (52%)	P<0.01
<i>Fumo di sigaretta, n (%)</i>	260 (67%)	441 (69%)	n.s.
<i>Familiarità per CAD, n (%)</i>	2 (0.5%)	355 (56%)	P<0.001

Tabella 2. Frequenze alleliche e genotipiche in pazienti con SC e CAD.

	SC (n=386)	CAD (n=639)	P value
Genotipo			
<i>AA</i>	72 (19%)	97 (15%)	n.s.
<i>AT</i>	178 (46%)	303 (47.5%)	n.s.
<i>TT</i>	136 (35%)	239 (37.5%)	n.s.
Allele			
<i>A</i>	322 (42%)	497 (39%)	n.s.
<i>T</i>	450 (58%)	781 (61%)	n.s.

Tabella 3. Caratteristiche cliniche, frequenze alleliche e genotipiche in pazienti con SC di origine non ischemica e post-ischemica.

	SC non ischemico (n=228)	SC post-ischemico (n=158)	P value
Maschi, n (%)	178 (78%)	144 (91%)	P<0.01
Età, mediana \pm SD	64 \pm 8	62 \pm 7	n.s.
Iperensione, n (%)	55 (24%)	71 (45%)	P<0.01
Ipercolesterolemia, n (%)	34 (15%)	24 (15%)	n.s.
Diabete, n (%)	51 (22%)	65 (41%)	P<0.01
Fumo di sigaretta, n (%)	136 (60%)	124 (78%)	135 (60%)
Familiarità per CAD, n (%)	0	2 (1%)	n.s.
Genotipo			
AA	54 (24%)	18 (11%)	P<0.001
AT	110 (48%)	68 (43%)	n.s.
TT	64 (28%)	72 (46%)	P<0.001
Allele			
A	218 (48%)	104 (33%)	P<0.0001
T	238 (52%)	212 (67%)	P<0.0001

Tabella 4. Frequenze alleliche e genotipiche in pazienti con almeno un vaso compromesso e in pazienti con coronarie indenni da lesioni.

	SC non ischemico (n=228)	SC post-ischemico+CAD (n=797)	P value
Genotipo			
AA	54 (24%)	115 (15%)	P<0.01
AT	110 (48%)	371 (46%)	n.s.
TT	64 (28%)	311 (39%)	0.013
Allele			
A	218 (48%)	601 (38%)	P<0.001
T	238 (52%)	993 (62%)	P<0.001

Bibliografia

1. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. The receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and cardiovascular disease. *Expert Rev Mol Med* 2009;11:9.
2. Striker LJ, Striker GE. Administration of AGEs in vivo induces extracellular matrix gene expression. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:62-65.
3. Creagh-Brown BC, Quinlan GJ, Evans TW et al. The RAGE axis in systemic inflammation, acute lung injury and myocardial dysfunction: an important therapeutic target? *Intensive Care Med* 2010;36:1644-1656.
4. Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto K et al. 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;23:408-419.
5. Hudson BI, Stickland MH, Grant PJ. Identification of polymorphisms in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene: prevalence in type 2 diabetes and ethnic groups. *Diabetes* 1998;47:1155-1157.
6. Hudson BI, Stickland MH, Futers TS et al. Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes* 2001;50:1505-1511.
7. Zee RY, Romero JR, Gould JL et al. Polymorphisms in the advanced glycosylation end products specific receptor gene and risk of incident myocardial infarction or ischemic stroke. *Stroke* 2006;37:1686-1690.

8. Pettersson-Fernholm K, Forsblom C, Hudson BI et al. Finn-Diane Study Group. The functional -374 T/A RAGE gene polymorphism is associated with proteinuria and cardiovascular disease in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 2003;52:891-894.
9. Picheth G, Costantini CO, Pedrosa FO et al. The -374A allele of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene promoter is a protective factor against cardiovascular lesions in type 2 diabetes mellitus patients. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45:1268-1272.
10. Falcone C, Campo I, Emanuele E et al. -374T/A polymorphism of the RAGE gene promoter in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2005;354:111-116.
11. Falcone C, Emanuele E, Buzzi MP et al. The -374T/A variant of the rage gene promoter is associated with clinical restenosis after coronary stent placement. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2007;20:771-777.
12. Falcone C, Geroldi D, Buzzi MP et al. The -374T/A RAGE polymorphism protects against future cardiac events in nondiabetic patients with coronary artery disease. *Arch Med Res* 2008;39:320-325.
13. Gullestad L, Ueland T, Vinge LE et al. Inflammatory Cytokines in Heart Failure: mediators and markers. *Cardiology* 2012;122:23-35.
14. Hartog JW, Voors AA, Bakker SJ et al. Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications. *Eur J Heart Fail* 2007;9:1146-1155.
15. Van Heerebeek L, Paulus WJ. The dialogue between diabetes and diastole. *Eur J Heart Fail* 2009;11:3-5.
16. Bucciarelli LG, Kaneko M, Ananthakrishnan R et al. Receptor for advanced-glycation end products: key modulator of myocardial ischemic injury. *Circulation* 2006;113:1226-1234.
17. Cipollone F, Iezzi A, Fazio M et al. The receptor RAGE as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: role of glycemic control. *Circulation* 2003;108:1070-1077.
18. Forbes JM, Yee LT, Thallas V et al. Advanced glycation end product interventions reduce diabetes-accelerated atherosclerosis. *Diabetes* 2004;53:1813-1823.
19. Hartog JW, Voors AA, Schalkwijk CG et al. Clinical and prognostic value of advanced glycation end-products in chronic heart failure. *Eur Heart J* 2007;28:2879-2885.
20. Smith AJ, Hartog JW, Voors AA et al. Advanced glycation endproducts in chronic heart failure. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1126:225-230.