

**Università degli Studi di Napoli “Federico II”**



**DOTTORATO DI RICERCA IN  
FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA  
SPERIMENTALE**

**XXIII Ciclo**

**Coordinatore: Prof. Gianni Marone**

**TESI DI DOTTORATO**

***SISTEMA BETA-ADRENERGICO ED ASSE  
RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONE  
NELL'INVECCHIAMENTO CARDIOVASCOLARE***

**Tutor**

Ch. mo Prof. Pasquale Abete

**Candidato**

Dott. Luca Golino

## **Indice**

### Sistema Beta-adrenergico nell'invecchiamento cardiovascolare

- I meccanismi di signaling dei recettori  $\beta$ -adrenergici (pag. 4)
- I  $\beta$ ARs e la Regolazione della Funzione Cardiaca (pag. 7)
- Aging cardiovascolare e disfunzione dei  $\beta$ ARs età - correlata (pag. 8)
- Effetti dell'Invecchiamento sulla Riserva Vascolare e sulle alterazioni del signaling del  $\beta$ AR nel distretto arterioso (pag. 9)
- Effetti dell'invecchiamento sulla riserva cardiaca e sulle alterazioni del signaling del  $\beta$ AR a livello miocardico (pag. 12)
- Effetti favorevoli dell'esercizio fisico sulla depressione età-correlata della riserva funzionale cardiovascolare e sulla disregolazione del signaling del  $\beta$ AR (pag. 14)
- Ruolo del blocco  $\beta$ -recettoriale sulla disregolazione  $\beta$ -adrenergica età-correlata (pag. 18)

Conclusioni (pag. 19)

### Il sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone nell'invecchiamento vascolare

- Il RAS sistemico nell'invecchiamento (pag. 22)
- Il RAS renale nell'invecchiamento (pag. 23)

- RAAS intracardiaco nell'invecchiamento (pag. 25)
- Ormoni natriuretici e RAAS nell'invecchiamento (pag. 28)
- Il blocco del RAAS nell'anziano (pag. 30)
- Conclusioni (pag. 31)

Bibliografia (pag. 32)

Figure (pag. 47)

## **Sistema Beta-adrenergico nell'invecchiamento cardiovascolare**

### **I meccanismi di signaling dei recettori $\beta$ -adrenergici**

I recettori  $\beta$ -adrenergici ( $\beta$ ARs) appartengono alla famiglia delle G-protein-coupled receptors (GPCR). Questi recettori presentano una struttura comune caratterizzata da sette  $\alpha$ -eliche transmembrana coinvolte nei legami con gli agonisti ed unite da tre loops intra ed extracellulari (84). I  $\beta$ ARs presentano tre sottotipi ben caratterizzati, i  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ , che, per quanto tutti sensibili agli stessi agonisti (epinefrina e norepinefrina), presentano modalità di risposte cellulari sostanzialmente diverse gli uni dagli altri (9).

L'attivazione di tutti i tipi di  $\beta$ ARs comporta la genesi, mediata dal sistema delle G-proteins, di secondi messaggeri e l'attivazione di canali ionici. La stimolazione del  $\beta$ AR, inducendo modificazioni conformazionali del recettore, ne consente l'interazione con le G-proteins eterotrimeriche e promuove la dissociazione delle G-proteins nelle subunità  $G_\alpha$  e  $G_{\beta\gamma}$  con conseguente attivazione di queste ultime. Entrambe le subunità  $G_\alpha$  e  $G_{\beta\gamma}$  amplificano e propagano i segnali intracellulari attivando una o più molecole effettrici.

Data la rilevanza biologica di questi recettori, non è sorprendente che, nel corso dell'evoluzione, gli stessi abbiano sviluppato sofisticati sistemi di

regolazione e modulazione del segnale e, primo tra questi quello della desensibilizzazione, rappresentato da una rapida riduzione della responsività recettoriale anche in presenza di una stimolazione continuativa. Un meccanismo più lento (ore o giorni) di desensibilizzazione è quello cosiddetto di “downregulation” (80). In questo caso, una riduzione della sintesi recettoriale, una destabilizzazione dell’RNA messaggero o un aumento della degradazione dei recettori stessi, sono tutti meccanismi che determinano una riduzione del numero di recettori sulla membrana cellulare (2).

La rapida riduzione della responsività recettoriale (secondi o minuti) dipende usualmente dalla fosforilazione del recettore con conseguente disaccoppiamento dal sistema di trasduzione del segnale rappresentato dalle G-protein. La fosforilazione può essere mediata da secondi messaggeri kinasici (ad esempio le Protein Kinasi A o C) in un processo noto come desensibilizzazione “eterologa” o “non-agonista-specifica”, o da una differente famiglia di kinasi nota come “G-protein-coupled receptor kinases” (GRKs). Queste ultime sono delle serina/treonina kinasi che presentano la caratteristica di fosforilare esclusivamente i recettori impegnati dall’agonista, innescando quindi una desensibilizzazione “agonista-specifica” o “omologa”.  $\beta$ ARK1, anche nota come GRK2, rappresenta la GRK maggiormente espressa a livello cardiaco, laddove GRK3, GRK5 e GRK6 presentano livelli significativamente più bassi (80,

48). Il legame tra GRK2 e le subunità  $G_{\beta\gamma}$  a livello del citosol facilita la traslocazione della kinasi sulla membrana cellulare dove avviene il processo di fosforilazione recettoriale. La fosforilazione mediata dalle GRK esalta l'affinità del recettore per alcune proteine citosoliche note come  $\beta$ -arrestine. Queste proteine, una volta legatesi al recettore, non solo ne impediscono l'accoppiamento con le G-protein ed individuano i recettori attivati destinati al processo di endocitosi (57), ma agiscono anche come punti di assemblaggio di complessi pathways intracellulari come quello delle like mitogen-activated protein kinase (MAPK) (65,22). Una conseguenza importante della fosforilazione del  $\beta$ AR è rappresentata dall'endocitosi del recettore stesso all'interno del compartimento cellulare, processo anche noto di "internalizzazione" (17). Quest'ultima può avvenire attraverso due pathways distinti, denominati "clathrin-coated pits" e "caveolae", che fungono da micro-domini per l'integrazione dei meccanismi di trasporto. L'internalizzazione dei  $\beta_2$ ARs avviene attraverso un clathrin coated pit (2,57), mentre quella dei  $\beta_1$ ARs può avvenire con entrambi i pathways a seconda della kinasi coinvolta nel processo di fosforilazione (83). Il pathway preferito rimane, comunque, quello GRK-mediato e procede attraverso un clathrin-coated-pit; in alternativa l'internalizzazione può avvenire via caveolae attraverso una cascata PKA-dipendente (83).

Vi sono attualmente numerose evidenze che i fosfolipidi fosfatidilinositolici giocano un ruolo importante nell'endocitosi recettoriale. A tal proposito è stato recentemente dimostrato come GRK2 e la fosfatidilinositol 3-kinasi (PI3K) formino un complesso citosolico responsabile della traslocazione di PI3K a livello del recettore dove vengono prodotti D-3 fosfoinositidi che regolano l'internalizzazione recettoriale (75). La distruzione del complesso GRK2/PI3K, attraverso l'iperespressione del dominio interattivo di PI3K (phosphoinositide kinase domain, PIK), previene la traslocazione della PI3K endogena e determina una marcata attenuazione dei processi di endocitosi dei  $\beta_2$ ARs (76).

### **I $\beta$ ARs e la Regolazione della Funzione Cardiaca**

I recettori adrenergici svolgono un ruolo cruciale nella regolazione della funzione cardiaca sia in condizioni fisiologiche che patologiche. I  $\beta_1$ ARs rappresentano il tipo predominante di recettori adrenergici a livello cardiaco e sono responsabili della mediazione degli effetti cronotropi ed inotropi positivi indotti dalla stimolazione con catecolamine (85,86,12). Le correlazioni tra stimolazione dei  $\beta_2$ ARs ed incremento della contrattilità cardiaca sono invece meno definite e, soprattutto, specie dipendenti, essendo infatti presenti nell'uomo (12), ma non evidenti in alcune specie animali come il mouse (85). Meglio definito è il ruolo dei

$\beta_2$ ARs nella regolazione del tono vascolare e della pressione arteriosa (16).

Tutti i sottotipi conosciuti dei  $\beta$ ARs si accoppiano con le Gs e attivano l'adenilciclasi (AC) con produzione di AMPc e susseguente attivazione della PKA (11). Quest'ultimo rappresenta uno step critico nella mediazione dell'effetto inotropo che si realizza attraverso la fosforilazione dei canali del calcio L-type e la regolazione delle correnti del calcio e del suo reuptake (104). Nonostante il ruolo dominante nel  $\beta$ AR signaling del pathway Gs/AC/AMPc (in particolare di quello dei  $\beta_1$ ARs), alcuni sottotipi di  $\beta$ ARs sono in grado di legarsi con altre G-proteins attivando, quindi, più di un pathway intracellulare. Questo è il caso dei  $\beta_2$ ARs che, oltre alle Gs, sono in grado di accoppiarsi alle Gi sia in vitro (1) che in vivo (104, 105).

### **Aging cardiovascolare e disfunzione dei $\beta$ ARs età-correlata**

Nel corso degli ultimi venti anni numerosi studi clinici e sperimentali hanno rivolto l'attenzione alle modificazioni strutturali e funzionali del sistema cardiovascolare legate all'invecchiamento (26,69,95,87). In tal senso, il grande interesse della ricerca in campo cardiologico, geriatrico e biogerontologico risiede probabilmente nella necessità di definire il reale substrato anatomico-funzionale con il quale, in età avanzata, interagiscono



le diverse situazioni morbose. Ed è da questa interazione, ancora ampiamente inesplorata, che può generarsi quella “complessità” fisiopatologia e clinica tipica delle sindromi geriatriche.

Per quanto riguarda le modificazioni età-correlate che si riscontrano a livello cardiaco ed a livello vascolare, il primo quesito riguarda l’entità della compromissione anatomo-funzionale e, quindi, della riduzione dei meccanismi di riserva. Il secondo aspetto è quello della definizione dei meccanismi molecolari che sottendono i processi di involuzione dell’apparato cardiovascolare in età geriatrica. L’individuazione di tali meccanismi risulta di cruciale importanza non solo per definire a livello cellulare le modalità dell’invecchiamento “fisiologico” ma, e forse soprattutto, per capire se tali processi sono legati a modificazioni d’organo ed a perdita di funzione irreversibili. Di contro, la possibilità di interferire con le modificazioni molecolari attraverso differenti strategie d’intervento potrebbe aiutare da un lato a prevenire i processi involutivi dell’aging cardiovascolare, dall’altro ad attenuare l’impatto della patologia su un sistema caratterizzato da livelli diversi di “vulnerabilità”.

In questo capitolo saranno riportati i risultati di nostri studi sperimentali che hanno esplorato alcune delle modificazioni funzionali età-correlate che si verificano a livello cardiaco e vascolare unitamente ai meccanismi molecolari ad esse connesse. Un’attenzione particolare sarà rivolta alla disfunzione  $\beta$ -adrenergica che appare caratterizzare l’aging

cardiovascolare ed alle analogie tra le anomalie del signaling del recettore  $\beta$ -adrenergico ( $\beta$ AR) e quelle riscontrate in alcune condizioni morbose, quali ipertensione e scompenso cardiaco, che presentano un'elevata prevalenza in età geriatrica.

### **Effetti dell'Invecchiamento sulla Riserva Vascolare e sulle alterazioni del signaling del $\beta$ AR nel distretto arterioso**

Un aspetto particolare ed ormai noto dell'aging vascolare è rappresentato dalla disfunzione endoteliale età-correlata (69,99). Recentemente, sono state valutate le correlazioni tra le alterazioni della reattività vascolare in carotidi di ratti anziani e le anomalie età-correlate del  $\beta$ AR signaling (61). I dati indicano chiaramente che la responsività carotidea alla stimolazione del  $\beta$ AR risulta depressa nell'animale anziano rispetto al giovane e che tale depressione si associa ad un decremento della densità dei  $\beta$ AR a livello vascolare, sebbene la presenza di una downregulation età-correlata dei  $\beta$ AR sia ancora argomento controverso (35,101). Ma questi dati dimostrano che le anomalie del pathway adrenergico non si limitano ad una riduzione del numero dei recettori investendo anche alcune componenti intracellulari responsabili della desensibilizzazione del recettore stesso. Infatti, l'upregulation della GRK2 suggerisce un incremento dei processi di fosforilazione che conducono alla

desensibilizzazione ed internalizzazione del  $\beta$ AR. A livello vascolare l'incremento dell'espressione di GRK2 è stata dimostrata in ratti con ipertensione spontanea nei quali si registravano anomalie della vasodilatazione  $\beta$ AR-mediata del tutto simili a quanto rinvenuto nell'animale fisiologicamente invecchiato. Un upregulation di GRK2 è stata anche riscontrata a livello linfocitario sia in pazienti affetti da ipertensione arteriosa (34) e scompenso cardiaco (46) il che indica il ruolo di questa kinasi nei processi di desensibilizzazione recettoriale adrenergica nell'uomo. Un altro dato importante è quello relativo alla presenza di GRK2 nell'endotelio (61) a supporto dell'ipotesi che questa kinasi svolge un ruolo cruciale nel controllo adrenergico del tono vascolare (Figura 1). Questi risultati sono in accordo con quanto ormai noto in letteratura sul prevalente ruolo dell'endotelio nella vasodilatazione  $\beta$ AR-mediata in tutti i distretti vascolari che partecipano attivamente al controllo delle resistenze periferiche totali (21,41,59).

Sebbene il ruolo di GRK2 nella fosforilazione e desensibilizzazione del  $\beta$ AR sia ampiamente riconosciuto, numerose evidenze indicano una sua possibile implicazione nella regolazione di altri pathways recettoriali. A questo proposito vi è la recente osservazione di un cross-talk tra recettori muscarinici  $M_3$  e  $\beta$ AR in termini di fosforilazione e desensibilizzazione recettoriale (13,100). L'osservazione che GRK2 è in grado di fosforilare anche i recettori muscarinici  $M_3$  e  $M_2$  (45) può fornire una spiegazione ai

nostri risultati relativi alla depressione età-correlata anche della vasodilatazione indotta da stimolazione del recettore muscarinico con Acetilcolina (61). I risultati di questo studio, che depongono per una depressione dei meccanismi di vasodilatazione adrenergica nell'animale anziano, possono contribuire ad una migliore comprensione dei meccanismi che sottendono l'aging fisiologico del sistema cardiovascolare ma anche di quelli che regolano le manifestazioni cliniche delle malattie cardiovascolari in età geriatrica. Infatti, la downregulation e la desensibilizzazione del  $\beta$ AR nel distretto vascolare dell'anziano possono in parte spiegare i ridotti adattamenti vascolari a stress di differente natura così come possono contribuire alla vulnerabilità del sistema cardiovascolare tipica dell'età geriatrica. Le anomalie del signaling del  $\beta$ AR possono spiegare, inoltre, la progressione con l'età della disfunzione endoteliale, che rappresenta un comune denominatore di numerose condizioni patologiche come la cardiopatia ischemica, l'ipertensione e lo scompenso cardiaco. E ciò a supporto dell'ipotesi che le anomalie del signaling adrenergico riscontrate a livello vascolare nell'anziano possano rappresentare uno dei backgrounds molecolari per lo sviluppo delle malattie cardiovascolari.

## **Effetti dell'invecchiamento sulla riserva cardiaca e sulle alterazioni del signaling del $\beta$ AR a livello miocardico**

L'aging cardiovascolare si associa ad una ridotta risposta cronotropa ed inotropica alla stimolazione adrenergica con conseguente riduzione della funzione cardiaca in risposta a stress di differente natura (53,54,55,56,29). Ad esempio una riduzione della frequenza cardiaca massimale, un incremento dei volumi telediastolico e telesistolico ed un decremento della frazione di eiezione è descritto durante sforzo massimale in individui anziani in assenza di patologie cardiovascolari (56). Altri autori hanno dimostrato in vitro una ridotta risposta contrattile di cardiomiociti estratti da cuori invecchiati all'esposizione a dosi crescenti di isoproterenolo (20). Queste modificazioni età-correlate della risposta cardiaca alla stimolazione adrenergica sono state ricondotte, almeno in parte ad alterazioni del signaling del  $\beta$ AR soprattutto a livello post-recettoriale (87). La cronica stimolazione del  $\beta$ AR, che si verifica nell'invecchiamento fisiologico così come in numerose patologie cardiache, comporta una riduzione della densità recettoriale, soprattutto dei  $\beta$ AR ad elevata affinità e difetti della trasduzione del segnale legati soprattutto al disaccoppiamento tra il  $\beta$ AR ed il sistema delle G-proteins intracellulari (87,90,91). Negli ultimi anni, un ruolo importante, nelle alterazioni del signaling del  $\beta$ AR che si osservano nello scompenso

cardiaco, è stato attribuito all'upregulation intracellulare di GRK2 responsabile dei processi di fosforilazione e desensibilizzazione recettoriale anche a livello cardiaco (84,102,40,77). Recentemente, è stato condotto uno studio in ratti anziani fisiologicamente invecchiati rivolto alla valutazione della risposta contrattile ventricolare alla stimolazione adrenergica (62). I dati emodinamici, rilevati durante infusione di isoproterenolo, indicavano una significativa riduzione della risposta contrattile miocardica alla stimolazione del  $\beta$ AR rispetto agli animali giovani in cui, ai massimi dosaggi, si assisteva ad un incremento del dp/dt pari a circa il doppio dei valori basali. L'esplorazione del signaling del  $\beta$ AR in questi animali consentiva di verificare una significativa riduzione della densità recettoriale sia in termini di numero totale di recettori che di recettori ad alta affinità (Fig. 2 a). Quanto alle alterazioni post-recettoriali, la riduzione della produzione di AMPc nell'animale anziano era indicativa di una alterata funzionalità del recettore in termini di deficit di traduzione del segnale (Fig. 2 b). Ma il dato sicuramente più suggestivo era rappresentato dal significativo incremento dell'espressione citoplasmatica di GRK2 (Fig. 2 c). Questo risultato suggerisce che nel cuore fisiologicamente invecchiato si assiste non solo ad una downregulation del  $\beta$ AR ma anche ad una significativa desensibilizzazione del recettore da riferirsi verosimilmente all'upregulation di GRK2.

Questi dati, oltre a confermare l'importanza delle GRK nella di disregolazione del recettore adrenergico che si verificano nell'invecchiamento, offre nuovi elementi per la comprensione dei meccanismi responsabili della riduzione della riserva contrattile cardiaca età-correlata. E' importante sottolineare come le alterazioni recettoriali e post-recettoriali del pathway del  $\beta$ AR osservate nell'animale anziano si presentino simili a quelle riscontrate in diversi modelli sperimentali di scompenso cardiaco così come in cuori umani scompensati. Ciò indicherebbe che il cuore anche se fisiologicamente invecchiato già esprime a livello funzionale e molecolare caratteristiche che mimano quelle riscontrate in condizioni patologiche e ne giustificano la particolare vulnerabilità allo stress. Questo alterato substrato anatomo-funzionale potrebbe da solo spiegare le ragioni per le quali stimoli differenti (cardiaci ed extracardiaci), innocui per il cuore sano dell'adulto, siano in grado di innescare nel cuore senile meccanismi a cascata che ne inducono repentinamente la decompensazione.

## **Effetti favorevoli dell'esercizio fisico sulla depressione età-correlata della riserva funzionale cardiovascolare e sulla disregolazione del signaling del $\beta$ AR**

E' noto come una regolare attività fisica sia in grado di interferire favorevolmente con il declino della funzione cardiovascolare età-correlata (26,97). Il miglioramento della performance ventricolare sinistra, in termini di incremento dello stroke volume massimale, della portata cardiaca e della frazione di eiezione, unitamente alla riduzione delle resistenze vascolari periferiche, rappresentano tutti effetti favorevoli dell'esercizio fisico nell'anziano e risultano verosimilmente correlati ad un incremento della responsività del  $\beta$ AR a livello cardiaco e vascolare (10,96). Ciò è confermato dalla osservazione che un esercizio dinamico cronico è in grado di modificare l'attività del sistema nervoso simpatico, il rilascio di catecolamine, la densità e la responsività dei  $\beta$ AR (10,96,30,71,70,72,74,81,92). In linea con questi dati sono i risultati di studi sperimentali che hanno esplorato gli effetti del training fisico sulle alterazioni età correlate della responsività vascolare e cardiaca alla stimolazione adrenergica, effetti che si realizzano attraverso la correzione dei meccanismi di downregulation e desensibilizzazione del  $\beta$ AR associati all'invecchiamento. A livello vascolare, un training fisico condotto per otto settimane era in grado di ripristinare la risposta



vasodilatatrice  $\beta$ AR-mediata della carotide di ratti anziani riportandola a livelli comparabili a quelli ottenuti nell'animale giovane (61) (Fig. 3). L'esplorazione del signaling del  $\beta$ AR indicava come il training era in grado di correggere la downregulation recettoriale (incremento della densità totale dei  $\beta$ AR e del numero di recettori ad alta affinità) così come i processi di desensibilizzazione attraverso una riduzione dell'attività intracellulare di GRK2. Quanto a quest'ultimo aspetto, i dati su riportati forniscono la prima dimostrazione che l'esercizio fisico è in grado di ridurre l'attività vascolare di GRK2 e di esercitare un ruolo favorevole sulla vasodilatazione  $\beta$ AR-mediata. La riduzione dell'attività di GRK2 ottenuta negli animali anziani allenati era in grado di migliorare anche la responsività del recettore muscarinico fornendo, quindi, una spiegazione a precedenti studi che mostravano un incremento della vasodilatazione indotta da acetilcolina dopo training (15,50). Questo studio fornisce, inoltre, nuove informazioni sui meccanismi attraverso cui l'esercizio è in grado di migliorare la vasodilatazione endotelio-dipendente. Attualmente, la teoria maggiormente accreditata è quella che il principale meccanismo attraverso il quale l'esercizio migliora la vasodilatazione è rappresentato dall'incremento della disponibilità endoteliale di ossido nitrico (NO) (99,45,38). I dati sono solo in apparente contrasto con queste precedenti osservazioni, in quanto, pur riconoscendo il ruolo cruciale dell'NO nel recupero della funzione endoteliale indotto dal training, si può sostenere

che l'attivazione del pathway dell'NO negli animali allenati sia strettamente legato ad uno specifico miglioramento della funzionalità del  $\beta$ AR. Se l'unico meccanismo attraverso cui l'esercizio fisico migliora la vasodilatazione endotelio-dipendente fosse rappresentato semplicemente da un incremento della disponibilità di NO, tutte le risposte vascolari che implicano l'NO quale effettore finale della risposta dovrebbero essere esaltate. I dati indicano, invece, che il training esercita i suoi effetti favorevoli sulla reattività vascolare attraverso un meccanismo selettivo di correzione della disregolazione solo di alcuni recettori ( $\beta$ AR e recettori muscarinici), mentre non esercita alcun effetto su altri sistemi recettoriali, quali quello degli  $\alpha_2$ -AR che pur prevedono una vasodilatazione endotelio-mediata NO-dipendente. Risulta evidente, quindi, l'importanza dell'integrità del signaling del  $\beta$ AR a livello vascolare per il mantenimento di adeguati livelli di produzione di NO e per preservare il controllo endoteliale del tono vascolare.

Quanto agli effetti dell'esercizio sulla funzione cardiaca, le rilevazioni emodinamiche effettuate su ratti anziani allenati dimostrano chiaramente come il training sia in grado di ripristinare la risposta contrattile ventricolare alla stimolazione del  $\beta$ AR e come la stessa risulti addirittura esaltata rispetto agli animali sedentari quasi ad indicare un upregulation del signaling adrenergico. Anche a livello cardiaco, gli effetti favorevoli dell'esercizio fisico a livello molecolare si traducevano in un complessivo

miglioramento del pathway del  $\beta$ AR. Accanto al significativo incremento della densità recettoriale (sia del numero dei recettori totali che di quelli ad alta affinità) si assisteva ad un aumento dell'attività adenilciclasica e della produzione di AMPc. Questi dati evidenziano, inoltre, come il training sia in grado di correggere l'iperpressione di GRK2 nella cellula miocardica riportando i livelli della kinasi a quelli riscontrati nell'animale giovane ed attenuando, quindi, i processi di desensibilizzazione recettoriale innescati dalla GRK.

Le potenzialità del training fisico nel recupero della riserva cardiovascolare e nel ripristino di una normale responsività del recettore adrenergico, fanno ben comprendere le ragioni per cui negli ultimi anni l'esercizio fisico stia assumendo una reale fisionomia autonoma quale strategia di intervento in numerose patologie cardiovascolari. La correzione della downregulation e della desensibilizzazione recettoriale adrenergica rappresenta sicuramente uno dei meccanismi cruciali che possono giustificare gli effetti favorevoli del training nell'ischemia miocardica (39,33) ed in pazienti con scompenso cardiaco (19,39,28,8)

## **Ruolo del blocco $\beta$ -recettoriale sulla disregolazione $\beta$ -adrenergica età-correlata**

Un'altra osservazione, proveniente da dati recenti su modelli animali, offre interessanti spunti sul ruolo del blocco  $\beta$ -recettoriale nel miglioramento dei meccanismi di signaling del  $\beta$ AR (62). Animali anziani sedentari, trattati per un periodo di 4 settimane con metoprololo per os, presentavano una normalizzazione della risposta inotropica alla stimolazione con il  $\beta$ -agonista isoproterenolo con livelli di contrattilità paragonabili a quelli dei giovani. Così come precedentemente osservato dopo training fisico, il  $\beta$ -bloccante era in grado di indurre una normalizzazione del signaling del  $\beta$ AR a livello recettoriale e post-recettoriale (Fig. 4). Questi dati appaiono in linea con quanto osservato sugli effetti del blocco del  $\beta$ AR in modelli animali di scompenso cardiaco (40,47). Sorprendentemente, infatti, le modificazioni del signaling del recettore adrenergico, osservate negli animali anziani trattati con metoprololo, appaiono molto simili a quelle indotte dal blocco  $\beta$ -recettoriale in animali scompensati. Prima tra tutte è la correzione dell'upregulation di GRK2 a livello miocardico. E' possibile, infatti, che gli effetti benefici del  $\beta$ -bloccante nello scompenso includano la regolazione di GRK2 intesa come riduzione dei livelli citoplasmatici e dell'attività di questa GRK responsabile dei processi di

desensibilizzazione recettoriale. Il miglioramento della funzione recettoriale adrenergica indotto dal  $\beta$ -bloccante non solo può rappresentare un meccanismo importante nel recupero della riserva contrattile in cuori scompensati ma può anche giustificare l'incremento della frazione di eiezione ventricolare basale in pazienti scompensati con cardiopatia dilatativa primitiva o post-ischemica (82,38).

### **Conclusioni**

La disfunzione età-correlata dei  $\beta$ ARs a livello cardiaco e vascolare rappresenta un fenomeno reversibile e che interventi sia di natura farmacologica che non farmacologica, come i  $\beta$ -bloccanti e l'esercizio fisico, possono indurre un significativo miglioramento del signaling a livello recettoriale e post-recettoriale. Ciò aggiunge nuove informazioni sui meccanismi molecolari attraverso i quali queste due strategie d'intervento esercitano i loro effetti favorevoli nel trattamento delle patologie cardiovascolari nella popolazione geriatrica.

## **Il Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone nell'invecchiamento**

### **cardiovascolare**

Il normale processo di invecchiamento è caratterizzato da modificazioni dell'attività e della sensibilità di numerosi sistemi che alterano i meccanismi di controllo omeostatici nell'anziano. Uno di questi è il sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS), la cui attività è fisiologicamente ridotta nell'invecchiamento (103). L'attività reninica plasmatica si riduce del 30-50% nell'anziano, nonostante i livelli normali di substrato reninico. Lo stimolo alla secrezione di renina indotto da alcuni farmaci e/o da misure comportamentali (p. es., somministrazione di diuretici, restrizione dell'introito di sale, stazione eretta) provoca l'innalzamento della concentrazione reninica plasmatica che, tuttavia, rimane sempre del 30-50% al di sotto di quella delle persone più giovani, nelle stesse condizioni.

Il calo della reninemia nell'anziano provoca una diminuzione del 30-50% dei livelli plasmatici di aldosterone con tassi di secrezione e di clearance che si riducono proporzionalmente. Le risposte dell'aldosterone e del cortisolo plasmatici alla stimolazione corticotropinica non si riducono con l'età. Nell'anziano, pertanto, il deficit di aldosterone dipende generalmente dal deficit coesistente di renina e non è secondario ad alterazioni surrenaliche intrinseche.

La riduzione dell'aldosteronemia e della reninemia nell'anziano contribuiscono allo sviluppo di diversi disturbi idroelettrolitici. Per esempio, gli anziani che seguono una dieta povera di sale hanno una minore capacità di conservare sodio. È stato descritto che la diminuzione della produzione di angiotensina II (AngII), anch'essa conseguenza del calo della stimolazione reninica, danneggia seriamente la capacità di concentrazione tubulare renale. Congiuntamente, queste condizioni contribuiscono ad aumentare la tendenza degli anziani a sviluppare una deplezione di volume e una disidratazione. Inoltre, la causa più importante di disidratazione, specialmente nella sua forma ipernatriemica che si verifica quando la perdita idrica è superiore a quella del sodio, è la perdita dello stimolo della sete, caratteristica dell'anziano in risposta all'aumento dell'osmolarità sierica o alla deplezione di volume. La perdita dello stimolo della sete assume particolare importanza quando gli anziani si trovano ad affrontare una malattia che aumenta il fabbisogno, o riduce l'apporto di sale e di acqua (p. es., un'infezione).

La riduzione età-correlata della renina e dell'aldosterone contribuisce anche all'aumento del rischio di iperkaliemia, cui gli anziani sono esposti in diverse situazioni cliniche. Attraverso la sua azione sul tubulo renale distale, l'aldosterone aumenta il riassorbimento del sodio e favorisce l'escrezione del potassio. L'ormone è responsabile di uno dei meccanismi

protettivi principali per la prevenzione dell'iperkaliemia durante i periodi di maggiore assunzione di potassio. Ad accentuare il rischio vi sono anche la riduzione età-correlata del filtrato glomerulare, altro fattore determinante dell'escrezione di potassio, e l'acidosi, dal momento che il rene senile è lento a correggere gli aumenti del carico acido.

Numerosi studi hanno messo in evidenza che oltre al ben noto RAAS circolante o sistemico, esistono una serie di RAAS tissutali indipendenti e regolati localmente. La loro attività può non essere necessariamente parallela a quella del RAAS sistemico e non ne sono ancora chiarite le modificazioni che si determinano a carico di questi sistemi con l'invecchiamento.

### **Il RAS sistemico nell'invecchiamento**

I livelli plasmatici di renina e aldosterone si riducono con l'avanzare dell'età (103). I meccanismi attraverso i quali si verificano alterazioni del funzionamento del RAAS non sono ben noti ma, indubbiamente, la riduzione età-correlata del numero di nefroni funzionanti è alla base di tali meccanismi. Questa riduzione induce una iperfiltrazione compensatoria ad opera dei nefroni rimanenti che determina un aumento della quantità di sodio cloruro che giunge a livello della macula densa con una riduzione della sintesi e del rilascio di renina e conseguentemente della sintesi di



AngII e aldosterone. La riduzione della sintesi e del rilascio renale di renina determina, di conseguenza, una riduzione dei suoi livelli plasmatici (51). Pochi sono stati gli studi effettuati per valutare i livelli di Ang II nell'anziano. Alcuni studi preliminari su animali invecchiati hanno messo in evidenza che la riduzione dei livelli plasmatici di AngII non è parallela a quella della renina. A tal proposito, Duggan et al. hanno evidenziato una riduzione dei livelli plasmatici di AngII non significativa nell'anziano anche se il campione preso in considerazione era esiguo e non includeva soggetti cosiddetti "oldest old" (23).

Oltre alla riduzione età correlata dei livelli di renina e aldosterone, nell'anziano si evidenzia anche una inadeguata capacità di risposta del RAAS agli stimoli. Negli animali invecchiati il rilascio di renina in risposta ad una deplezione acuta di volume (51) o ad una restrizione sodica (103,36) è ridotto rispetto a quello di un animale adulto. Anche la risposta tubulare alla somministrazione di aldosterone è compromessa (68), così come la risposta dell'aldosterone plasmatico all'infusione di potassio.

## **Il RAS renale nell'invecchiamento**

Nell'invecchiamento fisiologico del rene si evidenzia un deterioramento della struttura e delle funzioni di quest' organo tali da non compromettere marcatamente la funzionalità renale a meno che non intervenga una patologia acuta, come un'insufficienza renale acuta, che comporti un'ulteriore riduzione del numero di nefroni funzionanti.

Studi riguardanti diverse patologie renali hanno definito il ruolo del RAAS come effettore di danno tubulare glomerulare. L'utilizzo di ACE inibitori nei ratti invecchiati sia nelle fasi precoci che tardive della vita è in grado di rallentare l'insorgenza del danno renale e la comparsa di proteinuria (3). Conclusioni analoghe sono state riportate in altri modelli d'invecchiamento (49). Anche se il beneficio dell'utilizzo degli ACE inibitori sembra essere chiaro, dati indiretti suggeriscono che gli effetti favorevoli di tale utilizzo sono meno evidenti nel rene senile rispetto a quello giovane.

Non sono ancora stati definiti dei metodi ottimali per valutare il RAAS tissutale intrarenale. Tuttavia, si suppone che il RAAS renale possa essere costituito da due distinti sistemi: 1) Il RAAS vascolare, costituito da componenti circolanti e dal RAAS dei vasi renali intraglomeruli; 2) il RAAS tubulare o tubulointerstiziale che comprende il RAAS del tubulo prossimale e dell'interstizio. Dati preliminari funzionali, biochimici, e

molecolari depongono a favore della downregulation del RAAS vascolare. Nell'invecchiamento sia la concentrazione plasmatica di renina che di AngII si riducono (103). La riduzione età correlata della concentrazione plasmatica di renina è dovuta principalmente a una riduzione della sintesi renale (valutata dai livelli di mRNA della renina) e al lento rilascio della stessa in risposta a stimoli acuti. Inoltre, l'attività dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) a livello dei vasi renali e dei glomeruli è soppressa negli animali invecchiati (51). Pertanto, la vasocostrizione renale in risposta alla AngII esogena è aumentata nel rene invecchiato, molto probabilmente a causa dell'upregulation del recettore dell'angiotensina II (AT1). Ciò può riflettersi in eventi negativi laddove un soggetto anziano sia sottoposto ad una stimolazione del RAAS, ad esempio a seguito di ipotensione o restrizione dell'introito di sodio.

A differenza del RAS vascolare, vi sono alcune evidenze che dimostrano che il RAS tubulo-interstiziale potrebbe non essere soppresso allo stesso modo nell'invecchiamento del rene. Nonostante l'ACE del tubulo prossimale sia soppressa nei ratti di età media, evidenze preliminari, suggeriscono che nell'invecchiamento avanzato i livelli di AngII renale (che probabilmente riflettono i compartimenti tubulointerstiziali) sono sostanzialmente elevati (106). Benché preliminari, tali studi indicano una

dissociazione patogeneticamente significativa tra il RAAS plasmatico e quello intrarenale in età avanzata.

### **RAAS intracardiaco nell'invecchiamento**

Studi sperimentali hanno dimostrato nel cuore di animali giovani la sintesi di AngII a partire dall'angiotensinogeno (ANG) e quella dell'ACE (63). E' stato, inoltre, descritto che l'incremento dell'afterload determina un incremento dell'attività trascrizionale per l'angiotensinogeno e per l'ACE (5,94) unitamente all'aumento della sintesi di ormone natriuretico atriale (ANP) (73,58). Ciò ad indicare che stimoli meccanici possono giocare un ruolo nell'attivazione del RAAS intramiocardico.

Nell'animale anziano, simili fenomeni di attivazione del RAAS intramiocardico, ivi incluso l'incremento dell'attività trascrizionale per i recettori AT1 e AT2 dell'angiotensina (42), si osservano anche in assenza di incrementi sperimentalmente indotti dell'afterload, ma solo nel tessuto ventricolare sinistro (43). Queste osservazioni suggeriscono che il ben noto decremento età-correlato della concentrazione plasmatica di AngII potrebbe essere, almeno in parte, compensato dall'attivazione del RAAS cardiaco.

Con l'invecchiamento, numerosi fattori, quali le modificazioni delle attività trascrizionali e ormonali possono influenzare l'espressione genica

sia dell'angiotensinogeno che dell'ACE. Nel fegato, ad esempio, la riduzione della quantità di mRNA per l'ANG è da riferirsi ad una specifica riduzione dell'attività trascrizionale e della sintesi di questa proteina (25). Nel cuore, invece, ed esclusivamente nel ventricolo sinistro, non si assiste ad un'alterazione dei meccanismi trascrizionali e della stabilità dell'RNA deputato alla sintesi di ANG e ciò giustifica l'attivazione del RAAS intracardiaco.

Un potenziale meccanismo implicato nella regolazione del RAAS tissutale è quello ormonale. In particolare, l'incremento età-correlato dei livelli plasmatici di cortisolo, che stimola la sintesi di ANG, potrebbe giustificare l'attivazione del RAAS cardiaco. Ciò nonostante, la mancata attivazione dell'ANG nel ventricolo destro ed in altri organi, quali il fegato, depongono per una complessa regolazione tessuto specifica del RAAS ed implicano, verosimilmente, modificazioni dei livelli tissutali di specifici recettori per i glucocorticoidi che si verificano con l'invecchiamento (79,31).

Ma l'ipotesi attualmente più accreditata per giustificare l'attivazione del RAAS intracardiaco nel cuore senile è quella dello stress meccanico. A tal proposito, l'incremento della pressione diastolica e dello stiffness ventricolare sinistro, l'incremento dello stiffness vascolare, il caratteristico incremento dell'impedenza aortica e l'incremento della pulse-wave velocity (pressione carotido-femorale), modificando

significativamente la compliance ventricolare sinistra e l'afterload cardiaco, rappresentano tutti elementi importanti nel determinismo dello stress meccanico cui è sottoposto il miocardio invecchiato (53) e possono giustificare l'attivazione del RAAS nel tessuto ventricolare sinistro. Ad ulteriore dimostrazione dell'importanza dell'insulto meccanico vi è l'osservazione che unitamente all'incremento della sintesi di ANG si assiste ad un incremento dei livelli di ormoni natriuretici (ANP e BNP) che riflettono gli incrementi delle pressioni atriali e ventricolari sinistre (43).

L'attivazione della sintesi intracardiaca di AngII comporta influenze autocrine e paracrine che possono contribuire al determinismo delle modificazioni cellulari e strutturali che caratterizzano il cuore senile. Dal momento che l'AngII è un potente vasocostrittore, l'incremento dei suoi livelli nel cuore può associarsi ad alterazioni del flusso coronarico, ischemia e necrosi dei cardiomiociti. Lo stimolo ipertrofico sui cardiomiociti e la stimolazione della mitogenesi dei fibroblasti cardiaci indotti dall'AngII giustificano l'incremento della massa cardiaca e l'incremento del contenuto interstiziale di collagene, fenomeni entrambi alla base dell'incremento dello stiffness ventricolare sinistro e delle alterazioni della compliance ventricolare (93,88).

## **Ormoni natriuretici e RAAS nell'invecchiamento**

La secrezione di ANP e BNP, rispettivamente dagli atri e dai ventricoli cardiaci è regolata dalla distensione delle cavità atriali e dalle pressioni intraventricolari e determina un incremento della natriuresi, una riduzione della pressione arteriosa e una contrazione del volume plasmatico promuovendo uno spostamento dei liquidi dallo spazio intravascolare a quello extravascolare (27). Di contro l'attivazione del RAAS avviene in condizioni di contrazione del volume plasmatico e di riduzione della perfusione renale ed è rivolta al mantenimento del volume circolante e della pressione arteriosa attraverso il riassorbimento renale di sodio e l'effetto vasocostrittore. In virtù della differente natura degli stimoli che inducono l'attivazione degli ormoni natriuretici e del RAAS e degli opposti effetti biologici dei due sistemi, non ci sorprende l'osservazione che le concentrazioni plasmatiche di natriuretici e l'attività del RAAS circolante assumano andamenti divergenti in presenza di una varietà di stimoli fisiologici o sperimentalmente indotti (89,3). A tal proposito è necessario sottolineare come oltre all'effetto inibitorio dei natriuretici sulla secrezione di renina mediato dall'incremento del carico di sodio cloruro a livello della macula densa (66,14) esista un effetto inibitorio diretto, cGMP dipendente, sulle cellule iuxtaglomerulari renali (52). Inoltre, l'ANP, attraverso la sua azione inibitoria, G-protein mediata, sull'adenilato-ciclastasi tissutale, presenta un effetto inibitorio diretto sulla

secrezione surrenalica dell'aldosterone che si somma a quella esercitata attraverso l'inibizione Ca-dipendente della stimolazione secretagoga dell'AngII e del potassio (32).

Con l'invecchiamento si assiste ad un incremento dei livelli plasmatici di ANP e BNP (18,78) dipendente da un incremento della sintesi a livello cardiaco indotta da stimoli meccanici (incremento dello stiffness ventricolare, ridotta compliance ventricolare, incremento della pressione diastolica ventricolare ed atriale sinistra) ma anche da difetti della clearance imputabili ad una ridotta attività endopeptidasica tissutale (67,98). Tali incrementi dei tassi plasmatici di natriuretici sono giustificati anche da una iporesponsività d'organo alla loro azione (18). E' stato dimostrato infatti come il contributo fisiologico alla natriuresi dell'ANP si riduca progressivamente con l'invecchiamento (dal 50% del contributo totale presente nell'adulto a circa il 30% nell'anziano esente da patologia renale e cardiovascolare) (60). Ciò nonostante, anche in condizioni di incremento dell'intake (dieta ipersodica), l'escrezione dell'eccesso di sodio viene garantita nell'anziano al pari di quanto si osserva nel giovane. Ciò si verifica grazie sia al massivo incremento delle concentrazioni plasmatiche di natriuretici sia alla soppressione diretta ed indiretta dell'attività del RAAS. Si può concludere, quindi, che in vari setting fisiologici (incremento o riduzione dell'apporto di sale nella dieta), l'anziano è in grado di mantenere l'omeostasi elettrolitica attraverso



reciproche variazioni dei livelli di attivazione del sistema natriuretico e del RAAS.

### **Il blocco del RAAS nell'anziano**

In considerazione della depressione dell'attività del RAAS legata all'invecchiamento, ancora aperta rimane la problematica relativa all'utilizzo di farmaci quali ACE inibitori e bloccanti dei recettori dell'AngII (ARBs), da soli o in associazione, nel paziente iperteso anziano e, soprattutto nel molto anziano. Lo studio HYVET (Hypertension in the Very Elderly Trial) ha dimostrato una riduzione dell'incidenza di insufficienza cardiaca in soggetti ipertesi ultraottantenni in cui la somministrazione di un ACEi, il perindopril, era in grado di determinare una riduzione dei valori di pressione arteriosa sistemica al di sotto dei 140/80 mmHg (7). All'effetto terapeutico favorevole non si associavano significative modificazioni della funzionalità renale. Analogamente, lo studio SCOPE (Study on Cognition and Prognosis in the Elderly) ha evidenziato che l'utilizzo di un ARBs, il candesartan, in pazienti anziani ipertesi era in grado di ridurre significativamente gli eventi cardiovascolari, senza determinare alterazioni della creatinina sierica (64).

Benché entrambe le classi di farmaci (ACE-I e ARBs) si siano dimostrate efficaci nell'anziano, attualmente ancora insufficienti sono le evidenze disponibili sugli effetti sulla funzione renale e, pertanto, sussistono ancora considerevoli limitazioni sulla sicurezza dell'impiego degli stessi. Sulla base dei dati di varie recenti reviews della letteratura, sono state suggerite alcune raccomandazioni per il corretto utilizzo dei bloccanti del RAAS nell'anziano (6). Queste indicano che ACE-I e ARBs sono appropriati nei pazienti con insufficienza renale, fin quando l'aumento dei livelli di creatinina sierica non superi del 30% i livelli basali nei primi due mesi di terapia, mentre l'impiego di tali molecole dovrebbe essere limitato in caso di incrementi maggiori della creatininemia o della comparsa di iperpotassiemia.

Quanto all'inibizione diretta della renina nel paziente iperteso, esistono dati di buona efficacia e tollerabilità derivanti esclusivamente da uno studio clinico condotto su pazienti anziani affetti da ipertensione sistolica isolata (AGELESS – Aliskiren for Geriatric Lowering of Systolic Hypertension) (24). Allo stato attuale, comunque, non esistono evidenze sufficienti che possano giustificare la sostituzione nei pazienti anziani ipertesi di ACE-I e ARBs con l'inibitore diretto della renina.

## **Conclusioni**

L'invecchiamento si associa alla disregolazione di molti sistemi ormonali e il RAAS non fa eccezione a questo comportamento. Tuttavia, esistono ancora numerose lacune tra le conoscenze attualmente disponibili sulle specifiche interazioni tra RAAS sistemico e RAAS tissutali e sul significato della depressione del sistema ormonale circolante e sull'attivazione, invece, dei sistemi tissutali cardiaco e renale tubulo-interstiziale. Tali contraddizioni si accentuano ulteriormente laddove si consideri che la somministrazione di farmaci bloccanti il RAAS sia in grado anche nell'anziano ed in presenza di un RAAS sistemico depresso, di rallentare il danno d'organo renale e determinare un reverse-remodeling ventricolare sinistro.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abramson SN, Martin MW, Hughes AR, *et al.* Interaction of beta-adrenergic receptors with the inhibitory guanine nucleotide-binding protein of adenylate cyclase in membranes prepared from cyc-S49 lymphoma cells. *Biochem Pharmacol* 1998; 37:4289-97.
2. Akhter SA, Luttrell LM, Rockman HA, *et al.* Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science* 1998; 280:574-7.
3. Anderson S, Rennke HG, Zatz R. Glomerular adaptations with normal aging and with long term converting enzyme inhibition in the rat. *Am J Physiol* 1994; 267:F35-F43.
4. Anderson JV, Millar ND, O'Hare JP, *et al.* Atrial natriuretic peptide: physiological release associated with natriuresis during water immersion in man. *Clin Sci* 1986; 71:319-22.
5. Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, *et al.* Renin-angiotensin system involvement in pressure overload cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol* 1990; 259:H324-H332.
6. Bakris G, Weir M: Angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated elevations in serum creatinine: Is this a cause for concern? *Arch Intern Med* 2000; 160:685–93.

7. Beckett N, Peters R, Fletcher A, et al. HYVET Study Group: Treatment of hypertension in patients 80 years of age or older. *N Engl J Med* 2008; 358:1887–98.
8. Belardinelli R, Georgiou D, Cianci G, et al. Randomized, controlled trial of long-term moderate exercise training in chronic heart failure. Effects on functional capacity, quality of life, and clinical outcome. *Circulation* 1999; 99:1173-82.
9. Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* 1999; 18:1723-9.
10. Bohm M, Dorner H, Htun P, et al. Effects of exercise on myocardial adenylate cyclase and  $G_{i\alpha}$  expression in senescence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1993; 264: H805–H814.
11. Brodde OE, Michel MC, Zerkowski HR. Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 1995; 30:570-84.
12. Brodde OE. Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 1991; 43:203-42.
13. Budd DC, Challiss RA, Young KW, et al. Cross talk between m3-muscarinic and  $\beta_2$ -adrenergic receptors at the level of receptor phosphorylation and desensitization. *Mol Pharmacol* 1999;56: 813–823.

14. Burnett JC Jr, Granger JP, Opgenorth TJ. Effects of synthetic atrial natriuretic factor on renal function and rennin release. *Am J Physiol*. 1984 Nov; 247(5 Pt 2):F863-6.
15. Chen Y, Collins HL, DiCarlo SE. Daily exercise enhances acetylcholine-induced dilation in mesenteric and hindlimb vasculature of hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 1999; 21: 353–376.
16. Chruscinski AJ, Rohrer DK, Schauble E, *et al*. Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. *J Biol Chem* 1999; 274:16694-700.
17. Claing A, Laporte SA, Caron MG, *et al*. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* 2002; 66:61-79.
18. Clark BA, Elahi D, Epstein PH. Influence of gender and age on atrial natriuretic peptide in man. *J Clin Endocrin Metab* 1990; 70:349-53.
19. Coats AJS, Adamopoulos S, Meyer TE, *et al*. Effects of physical training in chronic heart failure. *Lancet* 1990; 335:63-66.
20. Davies CH, Ferrara N, Harding SE.  $\beta$ -Adrenoceptor function changes with age of subject from non-failing human ventricle. *Cardiovasc Res* 1996; 31:152-56.
21. Dawes M, Chowienczyk PJ, and Ritter JM. Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway on vasodilation caused by  $\beta$ -adrenergic agonists in human forearm. *Circulation* 1997; 95: 2293–7.

22. DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, *et al.* beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* 2000; 148:1267-81.
23. Duggan J, Kilfeather S, O'Malley K, *et al.* Effects of aging and hypertension on plasma angiotensin II and platelet angiotensin II receptor density. *Am J Hypertens* 1992; 5:687-93.
24. Duprez D, Davis P, Botha J: Abstract 4423: The AGELESS Study: The effect of aliskiren vs ramipril alone or in combination with hydrochlorothiazide and amlodipine in patients 65 years of age with systolic hypertension [Abstract]. *Circulation* 2008; 118[Suppl]:S886-S887.
25. Dzau VJ, Herrmann HC. Hormonal control of angiotensinogen production. *Life Sci* 1982; 30:577-84.
26. Ehsani AA. Cardiovascular adaptations to exercise training in the elderly. *Fed Proc* 1987; 46:1840-3.
27. Espiner EA. Physiology of natriuretic peptides. *J Intern Med* 1994; 235:527-41.
28. European Heart Failure Training Group. Experience from controlled trials of physical training in chronic heart failure: protocol and patient factors in effectiveness in the improvement in exercise tolerance. *Eur Heart J* 1998; 19:466-475.

29. Feldman RD. Physiological and molecular correlates of age-related changes in the human  $\beta$ -adrenergic receptor system. *Federation Proc* 1986; 45:48–50.
30. Fleg JL, Tzankoff SP, Lakatta EG. Age-related augmentation of plasma catecholamines during dynamic exercise in healthy males. *J Appl Physiol* 1985; 59:1033–9.
31. Funder JW. Mineralocorticoids, glucocorticoids, receptors and response elements. *Science* 1993; 259:1132-3.
32. Ganguly A. Atrial natriuretic peptide-induced inhibition of aldosterone secretion: a quest for mediator(s). *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1992; 263:E181-E194.
33. Gielen S, Schuler G, Hambrecht R. Exercise training in coronary artery disease and coronary vasomotion. *Circulation* 2001; 103(1):E1-6.
34. Gros R, Chorazyczewski J, Meek MD, et al. G-protein-coupled receptor kinase activity in hypertension: increased vascular and lymphocyte G-protein receptor kinase-2 protein expression. *Hypertension* 2000; 35:38–42.
35. Gurdal H, Friedman E, Johnson MD.  $\beta$ -adrenoceptor-G $\alpha$ S coupling decreases with age in rat aorta. *Mol Pharmacol* 1995; 47:772–8.



36. Hall JE, Coleman TG, Guyton AC. The renin–angiotensin system: normal physiology and changes in older hypertensives. *J Am Geriatr Soc* 1989; 37:801–13.
37. Hall SA, Cigarroa CG, Marcoux L, et al. Time course of improvement in left ventricular function, mass and geometry in patients with congestive heart failure treated with beta-adrenergic blockade. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25:1154 –61.
38. Hambrecht R, Adams V, Erbs S, et al. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2003; 107(25):3152-8.
39. Hambrecht R, Niebauer J, Fiehn E, et al. Physical training in patients with stable chronic heart failure: effects on cardiorespiratory fitness and ultrastructural abnormalities of leg muscles. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25:1239-49.
40. Harding VB, Jones LR, Lefkowitz RJ, et al. Cardiac beta ARK1 inhibition prolongs survival and augments beta blocker therapy in a mouse model of severe heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:5809-14.
41. Heijnenbrok FJ, Mathy MJ, Pfaffendorf M, et al. The influence of chronic inhibition of nitric oxide synthesis on contractile and relaxant

- properties of rat carot and mesenteric arteries. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 362:504–11.
42. Heymes C, Silvestre JS, Llorens-Cortes C, et al. Cardiac Senescence Is Associated with Enhanced Expression of Angiotensin II Receptor Subtypes. *Endocrinology* 1998; 139: 2579–87.
43. Heymes C, Swynghedauw B, Chevalier B. Activation of angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme gene expression in the left ventricle of senescent rats. *Circulation* 1994; 90:1328–33.
44. Higashi Y, Sasaki S, Kurisu S, et al. Regular aerobic exercise augments endothelium-dependent vascular relaxation in normotensive as well as hypertensive subjects: role of endothelium-derived nitric oxide. *Circulation* 1999; 100:1194–202.
45. Hosey MM, Benovic JL, DebBurman SK, et al. Multiple mechanisms involving protein phosphorylation are linked to desensitization of muscarinic receptors. *Life Sci* 1995; 56:951–55.
46. Iaccarino G, Barbato E, Cipolletta E, et al. Elevated myocardial and lymphocyte GRK2 expression and activity in human heart failure. *Eur Heart J* 2005; 26:1752-8.
47. Iaccarino G, Tomhave ED, Lefkowitz RJ, et al. Reciprocal in vivo regulation of myocardial G-protein-coupled receptor kinase expression by  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation and blockade. *Circulation* 1998; 98:1783-9.

48. Inglese J, Freedman NJ, Koch WJ, *et al.* Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 1993; 268:23735-8.
49. Inserra F, Romano LA, de Cavanagh EMV, *et al.* Renal interstitial sclerosis in aging: effects of enalapril and nifedipine. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7:676–80.
50. Johnson LR, Parker JL, Laughlin MH. Chronic exercise training improves ACh-induced vasorelaxation in pulmonary arteries of pigs. *J Appl Physiol* 2000; 88: 443–51.
51. Jung FF, Kennefick TM, Ingelfinger JR, *et al.* Downregulation of the intrarenal renin–angiotensin system in the aging rat. *J Am Soc Nephrol* 1995; 5:1573–80.
52. Kurtz A , Della Bruna R, Pfeilschifter J. Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP mediated process. *Proc Natl Acad Sci Usa* 1986; 83:4769-73.
53. Lakatta EG. Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age. *Physiol Rev.* 1993; 73:413-67.
54. Lakatta, EG. Age-related alterations in the cardiovascular response to adrenergic mediated stress. *Federation Proc* 1980; 39:3173–7.
55. Lakatta, EG. Deficient neuroendocrine regulation of the cardiovascular system with advancing age in healthy humans. *Circulation* 1993; 87:631–6.

56. Lakatta, EG, Gerstenblith G, Angell CS, et al. Diminished inotropic response of aged myocardium to catecholamines. *Circ Res* 1975; 36:262–9.
57. Laporte SA, Oakley RH, Holt JA, et al. The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J Biol Chem* 2000; 275:23120-6,.
58. Lattion AL, Michel JB, Arnaud E, et al. Myocardial recruitment during ANF mRNA increase with volume overload in rats. *Am J Physiol* 1988; 255:H245-H249.
59. Lembo G, Iaccarino G, Vecchione C, et al. Insulin modulation of an endothelial nitric oxide component present in the  $\alpha$ 2- and  $\beta$ - adrenergic responses in human forearm. *J Clin Invest* 1997; 100:2007-14.
60. Leosco D, Ferrara N, Landino P, et al. Effects of age on the role of atrial natriuretic factor in renal adaptation to physiologic variations of dietary salt intake. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7:1045-51.
61. Leosco D, Iaccarino G, Cipolletta E, et al. Exercise restores  $\beta$ -adrenergic vasorelaxation in aged rat carotid arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H369–H374.
62. Leosco D, Rengo G, Iaccarino G, et al. Exercise training and beta-blocker treatment ameliorate age-dependent impairment of beta-adrenergic receptor signaling and enhance cardiac responsiveness to

- adrenergic stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007 Sep; 293(3):H1596-603.
63. Lindpaintner K, Jin M, Niedermaier N, Wilhelm MJ, et al. Cardiac angiotensinogen and its local activation in the isolated perfused beating heart. *Circ Res* 1990; 67:564-73.
64. Lithell H, Hansson L, Skoog I, et al. The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): Principal results of a randomized double-blind intervention trial. *J Hypertens* 2003; 21:875–86.
65. Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, et al. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 1999; 283:655-61.
66. Maack T, Marion DN, Camargo MJF, et al. Effects of auriculin (atrial natriuretic factor) on blood pressure, renal function, and the renin-aldosterone system in dogs. *Am J Med* 1984; 77:1069-75.
67. Maack T, Suzuki M, Almeida F, et al. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* 1987; 238:675-8.
68. Macias Nunez JF, Garcia-Iglesias C, Tabemero-Romo JM, et al. Renal management of sodium under indomethacin and aldosterone in the elderly. *Age Ageing* 1980; 9:165–72.
69. Marin J. Age-related changes in vascular responses: a review. *Mech Ageing Dev* 1995; 79:71–114.

70. Mazzeo RS, Grantham PA. Norepinephrine turnover in various tissues at rest and during exercise: evidence for a training effect. *Metabolism* 1989; 38:479–83.
71. Mazzeo, RS, Podolin DA, Henry VA. Effects of age and endurance training on  $\beta$ -adrenergic receptor characteristics in Fischer 344 rats. *Mech Ageing Dev* 1995; 84:157–69.
72. Mazzeo, RS, Colburn RW, Horvath SM. Effect of aging and endurance training on tissue catecholamine response to strenuous exercise in Fischer 344 rats. *Metabolism* 1986; 35:602–7.
73. Mercadier JJ, Samuel JL, Michel JB, et al. Atrial natriuretic factor gene expression in rat ventricle during experimental hypertension. *Am J Physiol* 1989; 257:H979-H987.
74. Moore RL, Korzick DH. Cellular adaptations of the myocardium to chronic exercise training. *Prog Cardiovasc Dis* 1995; 37:1–26.
75. Naga Prasad SV, Barak LS, Rapacciuolo A, et al. Agonist-dependent recruitment of phosphoinositide 3-kinase to the membrane by beta-adrenergic receptor kinase 1. A role in receptor sequestration. *J Biol Chem* 2001; 276:18953-9,.
76. Naga Prasad SV, Laporte SA, Chamberlain D, et al. Phosphoinositide 3-kinase regulates beta2-adrenergic receptor endocytosis by AP-2 recruitment to the receptor/beta-arrestin complex. *J Cell Biol* 2002; 158:563-75.

77. Nienaber JJ, Tachibana H, Naga Prasad SV, *et al.* Inhibition of receptor-localized PI3K preserves cardiac beta-adrenergic receptor function and ameliorates pressure overload heart failure. *J Clin Invest* 2003; 112:1067-79.
78. Ohashi M, Fujio M, Nawata H, *et al.* High plasma concentrations of human atrial natriuretic polypeptide in aged men. *J Clin Endocrin Metab* 1987; 64: 81-5.
79. Pearce D, Yamamoto KR. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor activities distinguished by nonreceptor factors at a composite response element. *Science* 1993; 259:1161-5.
80. Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:653-92.
81. Plourde G, Rosseau-Migneron S, Nadeau A. Adrenoceptor adenylate cyclase system adaptation to physical training in rat ventricular tissue. *J Appl Physiol* 1991; 70: 1633–8.
82. Ramahi TM, Longo MD, Cadariu AR, *et al.* Left ventricular inotropic reserve and right ventricular function predict increase of left ventricular ejection fraction after betablocker therapy in nonischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37:818–24.
83. Rapacciuolo A, Suvarna S, Barki-Harrington L, *et al.* Protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation mediates

- beta-1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways. *J Biol Chem* 2003; 278:35403-11.
84. Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 2002; 415:206-12.
85. Rohrer DK, Desai KH, Jasper JR, *et al.* Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:7375-80.
86. Rohrer DK, Schauble EH, Desai KH, *et al.* Alterations in dynamic heart rate control in the beta 1-adrenergic receptor knockout mouse. *Am J Physiol* 1998; 274:H1184-93.
87. Roth DA, White CD, Podolin DA, *et al.* Alterations in myocardial signal transduction due to aging and chronic dynamic exercise. *J Appl Physiol* 1998; 84:177-84.
88. Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensinII-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. *Circ Res* 1993; 73:413-23.
89. Sagnella GA, Markandu ND, Shore AC, *et al.* Effects of changes in dietary sodium intake and saline infusion on immunoreactive atrial natriuretic peptide in human plasma. *Lancet* 1985; ii:1208-11.
90. Scarpace, PJ. Decreased b-adrenergic responsiveness during senescence. *Federation Proc* 1986; 45:51-4.



91. Scarpace, PJ. Forskolin activation of adenylate cyclase in rat myocardium with age: effects of guanine nucleotide analogs. *Mech Ageing Dev* 1990; 52:169–78.
92. Scarpace, PJ, Shu Y, Tumer N. Influence of exercise training on myocardial b-adrenergic signal transduction: differential regulation with age. *J Appl Physiol* 1994; 77:737–41.
93. Schelling P, Fischer H, Ganten D. Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? *J Hypertens* 1991; 9:3-15.
94. Schunkert H, Dzau VJ, Shih Tang S, et al. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 1990; 86:1913-20.
95. Schutzer WE, Reed JF, Bliziotis M, et al. Upregulation of G protein-linked receptor kinases with advancing age in rat aorta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280:R897–R903.
96. Spina RJ, Turner MJ, Ehsani AA.  $\beta$ -Adrenergic-mediated improvement in left ventricular function by exercise training in older men. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998; 274: H397–H404.
97. Spurgeon HA, Steinbach MF, Lakatta EG. Chronic exercise prevents characteristic age-related changes in rat cardiac contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1983; 244: H513–H518.

98. Stephenson SL, Kenn AJ. The hydrolysis of alpha human atrial natriuretic peptide by the pig kidney microvillar membranes is initiated by endopeptidases-24.11. *Biochem J* 1987; 243:183-7.
99. Taddei S, Galetta F, Viridis A, et al. Physical activity prevents age-related impairment in nitric oxide availability in elderly athletes. *Circulation* 2000; 101:2896–901.
100. Tsuga H, Okuno E, Kameyama K, et al. Sequestration of human muscarinic acetylcholine receptor hm1–hm5 subtypes: effect of G protein-coupled receptor kinases GRK2, GRK4, GRK5 and GRK6. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284:1218–26.
101. Tsujimoto G, Lee CH, Hoffman BB. Age-related decrease in  $\beta$  adrenergic receptor-mediated vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 239:411–5.
102. Ungerer M, Bohm M, Elce JS, et al. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation*. 1993; 87:454-63.
103. Weidman P, De Myttanaere-Bursztein S, Maxwell MH, et al. Effect of aging on plasma renin and aldosterone in normal man. *Kidney Int* 1975; 8: 325–33.

104. Xiao RP, Avdonin P, Zhou YY, *et al.* Coupling of beta2-adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circ Res* 1999; 84:43-52.
105. Xiao RP, Ji X, Lakatta EG. Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 1995; 47:322-9.
106. Zoja C, Remuzzi A, Coma D, *et al.* Renal protective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition in aging rats. *Am J Med* 1992; 92 [Suppl 4B]:60S–63S.

**FIGURE**

**$\beta$ ARK è espresso nell'endotelio**

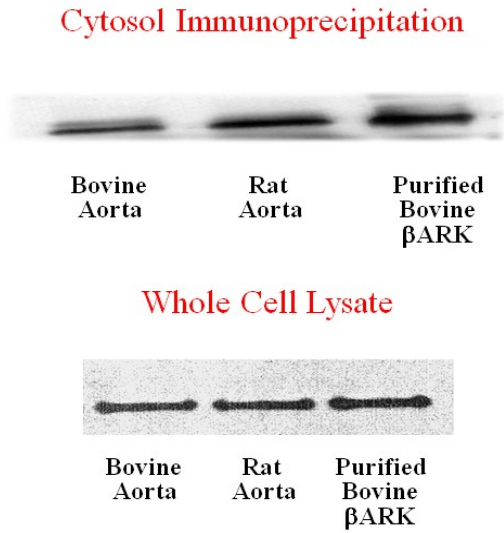


Figura 1. Espressione endoteliale di  $\beta$ ARK (Western-blot) in aorte bovine e di ratto.

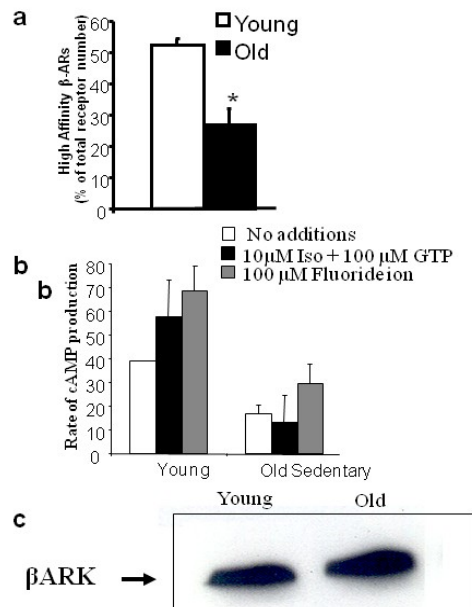


Figura 2. Alterazioni età-correlate del signaling cardiaco del  $\beta$ AR a livello recettoriale (**Panel a**. Riduzione dei  $\beta$ ARs ad alta affinità) e a livello post-recettoriale (**Panel b e c**. Riduzione della produzione di AMPc ed aumentata espressione di  $\beta$ ARK) in ratti anziani.

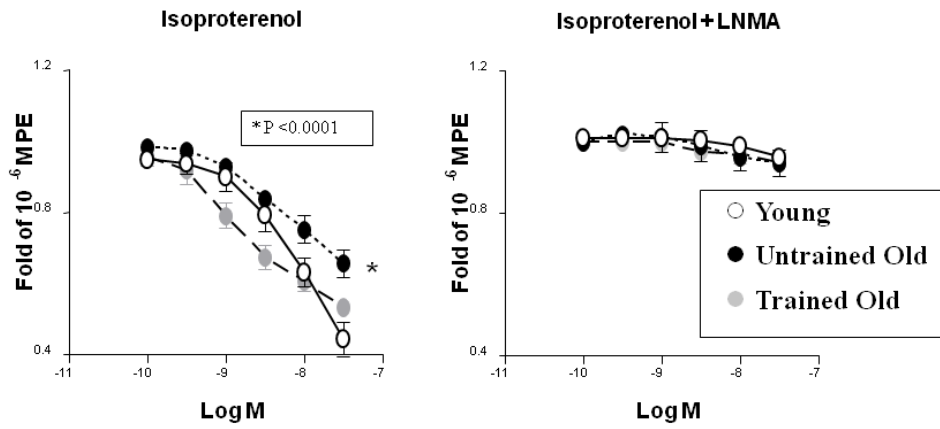


Figura 3. Effetti dell'esercizio fisico sul recupero della risposta vasodilatatrice  $\beta$ -mediata in rings di carotide comune di ratti anziani precostretti con fenilefrina (PE).

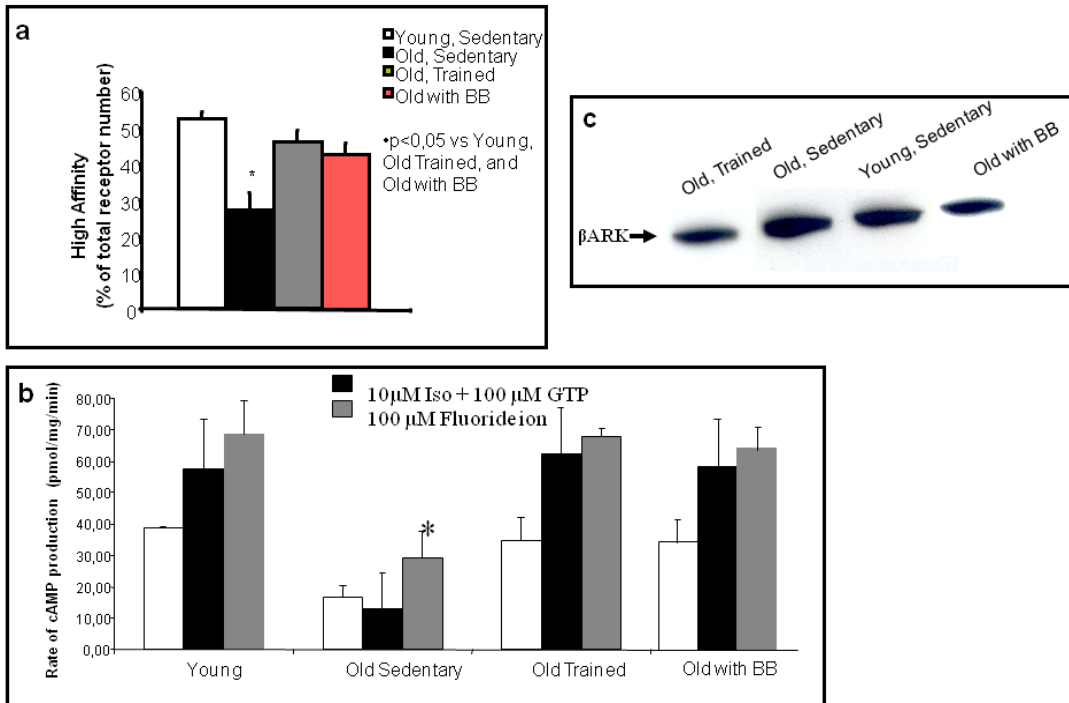


Figura 4. Effetti del blocco  $\beta$ -recettoriale con metoprololo sulle alterazioni età-correlate del signaling cardiaco del  $\beta$ AR a livello recettoriale (Panel a. Incremento dei  $\beta$ ARs ad alta affinità) e a livello post-recettoriale (Panel b e c. Incremento della produzione di AMPc e riduzione dell'espressione di  $\beta$ ARK) in ratti anziani.