

# Università degli Studi di Napoli Federico II



## Facoltà di Medicina e Chirurgia

### Dottorato di Ricerca

### Fisiopatologia Clinica e Medicina Sperimentale

### CICLO XXV

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

---

### CATTEDRA DI GERIATRIA

### DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA

### SCIENZE CARDIOVASCOLARI E IMMUNOLOGICHE

---

**La riduzione dopo esercizio fisico della *G-protein coupled receptor kinase 2* (GRK2) predice la sopravvivenza in pazienti con insufficienza cardiaca cronica.**

RELATORE

Chia.mo Prof. Dario Leosco

CANDIDATO

Dott. Salvatore Russo

# INDICE

<b>Introduzione</b>	<b>pag. 2</b>
<b>Materiali e Metodi</b>	<b>pag. 5</b>
<b>Risultati</b>	<b>pag. 7</b>
<b>Discussione</b>	<b>pag. 9</b>
<b>Conclusioni</b>	<b>pag. 11</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>pag. 12</b>
<b>Tabella 1</b>	<b>pag. 18</b>
<b>Tabella 2</b>	<b>pag. 19</b>
<b>Tabella 3</b>	<b>pag. 20</b>
<b>Tabella 4</b>	<b>pag. 21</b>
<b>Figura 1</b>	<b>pag. 22</b>
<b>Figura 2</b>	<b>pag. 23</b>
<b>Figura 3</b>	<b>pag. 24</b>

## INTRODUZIONE

L'insufficienza cardiaca (Heart Failure, HF), risultato finale di molteplici forme di patologie cardiache, è una condizione morbosa caratterizzata dalla incapacità del cuore a pompare quantità di sangue sufficiente a soddisfare le esigenze metaboliche dell'organismo ovvero dalla possibilità di farlo solo a discapito di elevate pressioni di riempimento. Nonostante significativi progressi farmacologici, l'insufficienza cardiaca rimane una malattia con prognosi infausta e rappresenta la causa principale di exitus nelle società occidentali [1-3]. Tuttavia, negli ultimi anni il raggiungimento di una maggiore conoscenza e comprensione della patogenesi molecolare dell'HF ha portato all'identificazione di nuove specifiche entità molecolari che svolgono un ruolo cruciale nello sviluppo e nella progressione della patologia. In particolare, grazie a studi condotti su cavie geneticamente modificate, incentrati sulle alterazioni molecolari del cuore scompensato, sono stati indentificati nuovi potenziali bersagli terapeutici, attualmente in fasi diverse di approvazione [3,4].

Nella patogenesi dell'insufficienza cardiaca, riveste un ruolo chiave nel mantenimento delle performance a breve termine "l'iperattivazione adrenergica", benchè nel tempo essa tenda a trasformarsi in un meccanismo sfavorevole. L'ipertono del sistema nervoso simpatico (SNS), associato ad una attivazione neuroormonale generalizzata, determina infatti effetti biologici avversi sui cardiomiociti [5, 6], determinando un danno strutturale d'organo come dilatazione delle camere cardiache, ipertrofia e fibrosi [5]. E' stato dimostrato che la terapia con  $\beta$ -bloccanti esercita effetti benefici sulla funzione cardiaca e soprattutto, che riduce la morbilità e mortalità correlate allo scompenso cardiaco, grazie all'inibizione dell'azione cardiotossica delle catecolamine, prevenendo il legame di quest'ultime con i recettori  $\beta$ -adrenergici [7, 8]. In particolare, è stato

riportato che la terapia a lungo termine con  $\beta$ - bloccanti è in grado di ridurre l'iperattivazione del SNS che si associa allo scompenso cardiaco, sia in modelli sperimentali di HF [9, 10] che nell'uomo [11, 12, 13]. Tuttavia, i meccanismi sottostanti responsabili di tali effetti restano ancora non del tutto identificati.

Uno dei percorsi molecolari esplorati più promettenti per l'identificazione di nuovi target terapeutici è stato appunto il ripristino del segnale cardiaco dei recettori  $\beta$ -adrenergici (AR), normalmente alterato nel miocardio scompensato.

### **Il sistema recettoriale adrenergico nel cuore scompensato.**

In generale, i recettori  $\beta$ -adrenergici ( $\beta$ ARs) svolgono un ruolo cruciale nella regolazione della risposta inotropica e cronotropica cardiaca alle catecolamine. Le alterazioni che si verificano nel sistema  $\beta$ AR durante la progressione dello scompenso cardiaco (SC) sono ben definite [14, 15], e comprendono la down-regulation  $\beta$ 1AR selettiva e il disaccoppiamento di entrambi i sistemi recettoriali  $\beta$ 1ARs e  $\beta$ 2ARs. Quest'ultimo fenomeno è noto come desensibilizzazione ed è la conseguenza della fosforilazione dei  $\beta$ ARs ad opera di una famiglia di proteine serina/treonin chinasi, note come *G protein coupled receptor kinases* (GRKs). Entrambi i sistemi recettoriali,  $\beta$ 1ARs e  $\beta$ 2ARs, sono fosforilati da queste chinasi [16-18], in particolare GRK2 (nota anche come  $\beta$ ARK1), che è la più abbondante GRK espressa a livello cardiaco. L'aumento dell'espressione e dell'attività GRK2 sembra essere il meccanismo cardine nella disfunzione dei recettori  $\beta$ -adrenergici [14-16, 19] nei modelli umani ed animali di scompenso cardiaco, e contribuisce alla progressione della patologia. A tal proposito, lo scompenso cardiaco è associato ad un aumento di tre volte dell'espressione e dell'attività di GRK2 miocardica [20, 21]. L'importanza dell'"up-regulation" di GRK2

a livello cardiaco nel miocardio malato è supportata dall'osservazione che la sua inibizione migliora il rimodellamento ventricolare sinistro (LV) e la contrattilità del cuore scompensato [10]. Inoltre, un recente studio su topi knockout miocardio-specifico per GRK2 ha rivelato che tali chinasi rivestono un ruolo fisiopatologico fondamentale nell'insorgenza e progressione dello scompenso cardiaco post-ischemico [22].

In particolare, è stato osservato che una iperespressione di GRK2 a livello linfocitario rispecchia ciò che si può osservare a livello miocardico [23-26, 28] [figura 1], probabilmente per analoghe esposizioni ad elevati livelli di catecolamine circolanti [27], e correla con il grado di disfunzione ventricolare sinistra [28]. Già nel 2002, Dzimiri et al [25] avevano riscontrato nei pazienti con sovraccarico ventricolare sinistro secondario a patologie valvolari, una iperespressione di GRK2- e GRK3- mRNA, e delle corrispettive proteine linfocitarie rispetto a controlli sani, in correlazione al grado dell'impegno emodinamico. Poi, nel 2005 Iaccarino et al [28] hanno dimostrato che nei pazienti affetti da SC, i livelli linfocitari di GRK2 rispecchiano l'espressione miocardica di tali chinasi per la comune stimolazione adrenergica, e che i livelli di GRK2 correlavano con la frazione d'iezione ventricolare sinistra e con la classe funzionale NYHA. Inoltre, è stato recentemente dimostrato che l'espressione/attività cardiaca di GRK2 si riduce dopo il miglioramento dello stato emodinamico indotto da un dispositivo di assistenza ventricolare (LVAD) ed è associata ad una normalizzazione del signaling beta adrenergico presente nel rimodellamento ventricolare sinistro [29]. È importante sottolineare che queste variazioni di GRK2 a livello miocardico correlano con quelle a livello linfocitario rinforzando il concetto che i livelli ematici di GRK2 possano essere utilizzati come marker indiretto delle variazioni di GRK2 riscontrabili nel cuore. Inoltre, questa osservazione suggerisce che i livelli di GRK2 linfocitari e le loro modifiche dopo specifici trattamenti per scompenso cardiaco possono essere

utilizzati come nuovi biomarkers in tale patologia e come indice di risposta del paziente al trattamento.

L'esercizio fisico esercita molteplici effetti benefici sul cuore scompensato [30-36] e studi preclinici hanno dimostrato che è in grado di normalizzare la disfunzione dei recettori  $\beta$ -adrenergici correlata all'insufficienza cardiaca riducendo i livelli cardiaci di GRK2 [37]. Tuttavia, rimane ancora da definire se quest'ultimo effetto si verifica anche nell'uomo affetto da scompenso cardiaco e se le modifiche indotte dall'esercizio fisico sui livelli della proteina GRK2 linfocitaria sono in grado di predire l'outcome nei pazienti con scompenso cardiaco.

Pertanto, l'obiettivo del presente studio è stato quello di valutare se i livelli di GRK2 linfocitaria, misurati in condizioni basali e dopo 3 mesi di training fisico, possano predire la mortalità cardiaca nei pazienti con insufficienza cardiaca post-ischemica.

## **MATERIALI E METODI**

### **Popolazione e Disegno di studio.**

Tra il Maggio del 2004 ed il Maggio del 2009, sono stati arruolati 209 pazienti consecutivamente, con diagnosi di insufficienza cardiaca secondaria a cardiomiopatia ischemica (classe NYHA II-III), ammessi presso il Centro di Riabilitazione Cardiologica dell'Università degli Studi di Napoli Federico II (Italia), e alla Riabilitazione della Fondazione Salvatore Maugeri (IRCCS, Telese, BN, Italia). I criteri di esclusione sono stati: diagnosi di insufficienza cardiaca per cardiomiopatia dilatativa o ipertrofica, malattie valvolari, ischemia miocardica e/o aritmie ventricolari maligne indotte da esercizio fisico, recente rivascolarizzazione miocardica (<12 settimane), funzionalità renale gravemente ridotta (filtrato glomerulare <30 ml/min), qualsiasi patologia che impedisse una regolare attività fisica. Sono state inoltre escluse comorbidity associate ad attivazioni linfocitarie (ad esempio malattie neoplastiche, gravi patologie croniche, infezioni in corso, e l'eccessiva assunzione di alcol). Tutti i partecipanti hanno fornito il loro consenso informato. I pazienti arruolati sono stati sottoposti a un programma di training fisico strutturato non randomizzato della durata di tre mesi. Ad un mese dall'arruolamento i pazienti dovevano essere clinicamente stabili sia da un punto di vista sintomatologico che per la terapia medica prescritta. Una valutazione clinica e funzionale completa è stata eseguita in tutti i pazienti al tempo zero e il giorno dopo la fine del periodo di training programmato. In tali circostanze sono stati eseguiti prelievi ematici multipli per le determinazioni dei parametri biochimici di routine, per l'estrazione dei linfociti, per la misurazione dei livelli di GRK2 linfocitaria, del frammento N-terminale del BNP (NT-proBNP) e di noradrenalina plasmatica. Ciascun paziente è stato poi sottoposto a Test Ergometrico

Cardiopulmonare (TECP) su cicloergometro, per la determinazione del consumo massimo di ossigeno al picco dell'esercizio (VO<sub>2</sub>picco).

Il training riabilitativo consisteva in un programma di esercizio fisico aerobico a frequenza trisettimanale, in cui il paziente, sotto la supervisione di fisioterapisti e medici specialisti, praticava per ciascuna seduta 5' di riscaldamento, 30' di esercizio fisico continuativo al cicloergometro e/o treadmill di moderata intensità, e 5' di defaticamento. Durante l'esercizio il soggetto poteva raggiungere un carico lavorativo massimo pari al 60-70% della VO<sub>2</sub>picco, calcolata al TECP eseguito in ingresso.

Dei 209 pazienti inizialmente inclusi nello studio, 193 hanno completato il protocollo di training e sono stati definitivamente arruolati.

### **Follow-up.**

L'end-point primario era la mortalità correlata a cause cardiache. I pazienti sono stati seguiti fino al raggiungimento dell'end-point o al termine del periodo di studio designato (31.05.2009). Le cause di morte per patologie cardiache sono state stabilite da un comitato di tre medici, dopo una revisione delle cartelle cliniche, certificati di morte, e interviste ai membri della famiglia e/o medici di famiglia. I pazienti in cui la mortalità era legata a cause non-cardiache sono stati eliminati dallo studio.

### **Analisi statistica**

Tutte le analisi dei dati raccolti sono state effettuate utilizzando il software Statistical Package for Social Sciences (SPSS 16.0) (SPSS Inc., Chicago, Illinois). I dati continui, normalmente distribuiti, se non diversamente specificato, sono stati espressi come valori medi ( $\pm$  DS). L'analisi cumulativa univariata è stata condotta utilizzando il  $\chi^2$  test con un rapporto di rischio e intervalli di confidenza al 95%. Le variabili continue sono state

confrontate mediante t-test con l'analisi post hoc di Bonferroni. Per determinare i predittori indipendenti di mortalità, è stata utilizzata l'analisi dei rischi proporzionali di Cox e le variabili che raggiungevano una  $p < 0.10$  nell'analisi univariata sono state poi testate in un modello di sopravvivenza di regressione multipla secondo Cox (Modello 1). Una  $p < 0,05$  è stata considerata statisticamente significativa. I valori medi dei parametri clinici ed ematici valutati pre- e post-training sono stati confrontati con l'uso di t-test. È stata poi condotta una analisi univariata per valutare le correlazioni tra le variazioni dei parametri pre-e post-training ( $\Delta$ ) rispetto alla mortalità cardiaca. Per esplorare ulteriormente i predittori indipendenti di morte cardiaca, abbiamo effettuato una seconda analisi di sopravvivenza per regressione multipla secondo Cox (Modello 2), correlando fattori predittivi significativi al tempo 0 con variabili  $\Delta$  significative nell'analisi univariata. Le curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier per le modifiche nell'espressione della proteina linfocitaria GRK2 e della norepinefrina plasmatica indotte dall'esercizio fisico ( $\Delta$  %) sono state prodotte stratificando i pazienti al di sopra e al di sotto della mediana di ogni parametro.

## **RISULTATI**

### **Caratteristiche dei pazienti e follow-up**

Le caratteristiche cliniche e demografiche della popolazione dei pazienti sono descritte in Tabella 1. L'età media è di  $71 \pm 8$  anni (66,8% maschi). L'89,1% dei pazienti era in classe NYHA III, la FEVS media era del 31,7% e la VO<sub>2</sub>picco media era di 12,37 ml/kg/min. All'inizio e durante l'intero periodo di studio, tutti i pazienti erano in trattamento medico ottimale. Il periodo di follow-up medio è stato di  $37 \pm 20$  mesi. Nessun paziente è stato perso al follow-up. 87 soggetti sono deceduti per cause cardiache nel corso del periodo di 5 anni di monitoraggio. 15 soggetti sono morti per cause non cardiache. Il tasso annuo di mortalità cardiaca è stato del 9%.

### **Predittori principali di mortalità cardiaca basale**

Dall'analisi univariata, i predittori di mortalità cardiaca al basale erano: l'età, il diabete, l'ipercolesterolemia, precedenti by-pass aorto-coronarico/angioplastica coronarica, classe NYHA, FEVS, picco VO<sub>2</sub>, GRK2 linfocitaria, concentrazione sierica di NT-proBNP e norepinefrina plasmatica (contrassegnati con asterisco \* nella Tabella 1). L'analisi di regressione multipla secondo Cox è stata effettuata includendo i predittori univariati di cui sopra (Modello 1, Tabella 2). L'espressione della proteina GRK2 da parte dei linfociti, di NT-proBNP, di norepinefrina, ed il picco di VO<sub>2</sub> insieme con età, FEVS, classe NYHA, e precedenti rivascolarizzazioni coronariche sono risultati predittori di mortalità cardiaca.

## **Effetti dell'esercizio fisico su parametri clinici e biochimici**

La tabella 3 riporta gli effetti dei tre mesi dell'esercizio fisico su parametri clinici ed ematochimici. Il training ha migliorato significativamente il picco di VO<sub>2</sub> mentre i valori di norepinefrina plasmatica, NT-proBNP e frequenza cardiaca si sono ridotti dopo training come atteso (25,26). La riduzione dell'esposizione di catecolamine correlata all'esercizio fisico potrebbe anche giustificare la riduzione di GRK2 linfocitaria osservata nei nostri pazienti con scompenso cardiaco. La figura 2 mostra le modifiche indotte dall'esercizio fisico sui parametri ematochimici nei pazienti sopravvissuti e non sopravvissuti. È interessante notare che il training fisico riduce i livelli di NT-proBNP in entrambe le tipologie di pazienti, sopravvissuti e non sopravvissuti. Diversamente, l'espressione di GRK2 linfocitaria e di norepinefrina plasmatica si riducono nei sopravvissuti, mentre non subiscono variazioni significative nei "non sopravvissuti".

L'analisi multivariata di Cox (Modello 2) è stata effettuata utilizzando i valori di base e i "delta  $\Delta$ " (post-training vs valori basali) di variabili risultate significative all'analisi univariata. Il Valore  $\Delta$  della espressione proteica di GRK2 linfocitaria è risultato il più forte predittore di mortalità cardiaca osservato nel modello, insieme al GRK2- mRNA nei linfociti, al  $\Delta$  della frequenza cardiaca, di noradrenalina e del picco di VO<sub>2</sub> (Tabella 4). Il  $\Delta$  NT-proBNP, invece, non è risultato essere predittore indipendente di mortalità.

La stratificazione dei pazienti in base ai valori medi di  $\Delta$  GRK2 e  $\Delta$  noradrenalina ha permesso di riconoscere un aumento statisticamente significativo della mortalità nei gruppi di pazienti al di sotto dei valori medi delle due variabili ( $\Delta$  GRK2, log rank 45,02, p <.0001,  $\Delta$  noradrenalina, log rank 47,32 p <.0001) (Figura 3). A 24 e 36 mesi, i tassi di mortalità sono stati rispettivamente dell'84% e 95% per i pazienti con  $\Delta$  GRK2

al di sotto del valore medio, e del 77% e l'85% per i pazienti con  $\Delta$  noradrenalina al di sotto del valore medio.

## DISCUSSIONE

I risultati di questo studio hanno dimostrato che la riduzione dei livelli di GRK2 nei linfociti del sangue periferico dopo esercizio fisico predice la mortalità cardiaca nei pazienti con scompenso cardiaco post-ischemico.

Nonostante negli ultimi decenni i progressi nella prevenzione, nella gestione e nella terapia farmacologica hanno drasticamente ridotto il tasso complessivo di mortalità per cause cardiache, i decessi dovuti allo scompenso cardiaco continuano ad aumentare [40-42]. Quindi, appare evidente che vi è l'urgenza di ricercare e sviluppare trattamenti innovativi e/o nuovi biomarcatori per migliorare la terapia e la gestione dei pazienti con insufficienza cardiaca. Negli ultimi anni, utilizzando modelli animali in vitro e in vivo, abbiamo dimostrato che GRK2 rappresenta una molecola chiave sia nel *signaling* dei  $\beta$ -AR a livello cardiaco, ma anche nella patogenesi della disfunzione ventricolare sinistra e nello scompenso cardiaco [15-17, 10, 22, 37, 43]. Inoltre, i livelli di GRK2 misurati nei linfociti periferici rispecchiano quelli osservati nel miocardio scompensato e forniscono informazioni sulla gravità della malattia, e sul grado di disfunzione ventricolare sinistra [27]. È interessante notare che i livelli di GRK2 diminuiscono sia nel tessuto cardiaco che a livello linfocitario dopo interventi di *unloading* meccanico del ventricolo sinistro e di rimodellamento inverso [29]. Questa osservazione ha fornito la prima evidenza che i livelli di GRK2 linfocitaria possono essere utilizzati come marcatore indiretto per valutare la risposta del paziente al trattamento. In questo studio, i livelli di GRK2 linfocitaria risultavano ridotti nei pazienti con scompenso cardiaco sottoposti ad un breve programma di esercizio fisico e tali variazioni sono state poi associate ad un tasso di mortalità cardiaca in un follow up di 5 anni.

È già stato riportato in precedenti modelli animali sperimentali che l'esercizio fisico riduce l'espressione cardiaca di GRK2 e ripristina il sistema  $\beta$ AR miocardico nel cuore scompensato post-ischemico [37], nonché negli ipertesi [44], nel cuore invecchiato [45] e nel sistema vascolare [46]. L'inversione del danno sui recettori  $\beta$ ARs potrebbe essere spiegato con l'effetto ben noto dell'esercizio fisico sull'overdrive simpatico nello scompenso cardiaco [47-49]. Coerentemente con questi precedenti risultati, abbiamo osservato, dopo 3 mesi di allenamento, una significativa riduzione dei livelli di GRK2 linfocitaria e di norepinefrina plasmatica, suggerendo così che i livelli di GRK2 linfocitaria possano essere influenzati e regolati dalle catecolamine circolanti [50, 51]. Anche se l'esercizio fisico induce una riduzione significativa sia di GRK2 che della norepinefrina plasmatica, le modifiche di GRK2 meglio differenziano i sopravvissuti dai pazienti deceduti (Figura 2). Il ruolo potenziale dell'esercizio fisico nel ridurre i livelli di GRK2 linfocitaria è stato testato separatamente in un piccolo gruppo di 40 pazienti con scompenso cardiaco non sottoposti ad esercizio fisico con analoghe caratteristiche demografiche e cliniche. In questi pazienti non abbiamo riscontrato alcun cambiamento significativo dei livelli di GRK2 linfocitario in due determinazioni eseguite ad un intervallo di 3 mesi.

Inoltre, la riduzione GRK2 dopo training era indipendente dai cambiamenti della funzione miocardica, rimasta stabile dopo esercizio fisico. Anche se è stato dimostrato che la riduzione della GRK2 linfocitaria si verifica in associazione ad un miglioramento della funzione cardiaca [10, 22, 29], i nostri dati suggeriscono che i livelli linfocitari di GRK2 possono anche riflettere cambiamenti favorevoli dello squilibrio autonomo e della attivazione neuroumorale, noti predittori prognostici indipendenti dai parametri di funzione o morfologia del ventricolo sinistro in pazienti con insufficienza cardiaca. In particolare, i cambiamenti di GRK2 rappresentano un parametro fortemente associato

alla mortalità cardiaca. Diversamente, le modifiche del BNP dopo esercizio fisico non possono preannunciare l'outcome nella nostra popolazione di studio. Questi risultati sono in accordo con una recente meta-analisi che segnala la mancanza di associazione tra le modifiche del BNP e di outcome in pazienti con scompenso cardiaco [52].

### **Limitazioni dello studio**

Questo studio non consente una indicazione definitiva dell'utilità finale dei cambiamenti dei livelli di GRK2 linfocitaria come biomarker nella gestione dell'insufficienza cardiaca a causa della ridotta dimensione del campione utilizzato. Sono, quindi, necessari ulteriori studi su popolazioni più ampie al fine di convalidare questo nuovo biomarker nella popolazione generale di pazienti con insufficienza cardiaca. Inoltre, i risultati di questo studio sono stati ottenuti in una coorte di pazienti con scompenso cardiaco post-ischemico avanzato, così che la proiezione ad una popolazione più eterogenea di scompensati necessita di caute valutazioni critiche. In particolare, non sappiamo se GRK2 nei linfociti periferici può avere la stessa implicazione prognostica negli stadi meno avanzati della malattia e nei pazienti con scompenso cardiaco dovuto a causa non ischemiche. Infine, probabilmente a causa della elevata percentuale di pazienti trattati con antagonisti  $\beta$ AR (76,7%) nel nostro gruppo di studio, l'uso di  $\beta$ -bloccanti non risulta essere un fattore predittivo di mortalità cardiaca.

## CONCLUSIONI

I risultati di questo studio indicano che i livelli/attività di GRK2 linfocitaria possono diminuire in pazienti con scompenso cardiaco dopo un intervento specifico, come l'esercizio fisico aerobico, in grado di influenzare favorevolmente l'overdrive simpatico HF-correlato. I pazienti con una maggiore riduzione di GRK2 mostrano un miglioramento della mortalità cardiaca nel medio periodo di follow-up.

Sono comunque necessari studi prospettici più ampi per verificare se le variazioni di GRK2 a breve termine possano rappresentare un nuovo semplice end-point per l'impostazione della terapia e per predire la sopravvivenza nei pazienti con insufficienza cardiaca.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al. 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation* 2009; 119: e391-479.
- [2] Williams ML, Koch WJ. Viral-based myocardial gene therapy approaches to alter cardiac function. *Annu Rev Physiol* 2004; 66: 49-75.
- [3] Vinge LE, Raake PW, Koch WJ. Gene therapy in heart failure. *Circ Res* 2008; 102: 1458-70.
- [4] Rengo G, Lymperopoulos A, Koch WJ. Future G Protein-Coupled Receptor Targets for Treatment of Heart Failure. *Curr Treatment Opt Cardiovasc Med* 2009; 11: 328-38.
- [5] Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J (2009). The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 54:1747-1762.
- [6] Lymperopoulos A, Rengo G, Funakoshi H, Eckhart AD, Koch WJ. (2007) Adrenal GRK2 upregulation mediates sympathetic overdrive in heart failure. *Nat Med* 13:315-323.
- [7] Bristow MR (2000). Mechanistic and clinical rationales for using beta-blockers in heart failure. *J Card Fail* 6:8-14.
- [8] Foody JM, Farrell MH, Krumholz HM (2002). beta-Blocker therapy in heart failure: scientific review. *JAMA* 287:883-889.
- [9] Pleger ST, Most P, Boucher M, Soltys S, Chuprun JK, Pleger W, et al. (2007). Stable myocardial-specific AAV6-S100A1 gene therapy results in chronic functional heart failure rescue. *Circulation* 115:2506-2515.

- [10] Rengo G, Lympopoulos A, Zincarelli C, et al. Myocardial adeno-associated virus serotype 6-betaARKct gene therapy improves cardiac function and normalizes the neurohormonal axis in chronic heart failure. *Circulation* 2009;119:89-98.
- [11] Nemanich JW, Veith RC, Abrass IB, Stratton JR (1990). Effects of metoprolol on rest and exercise cardiac function and plasma catecholamines in chronic congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 66:843-848.
- [12] Andersson B, Hamm C, Persson S, Wikström G, Sinagra G, Hjalmarson A, et al. (1994). Improved exercise hemodynamic status in dilated cardiomyopathy after betaadrenergic blockade treatment. *J Am Coll Cardiol* 23:1397-1404.
- [13] Yoshikawa T, Handa S, Anzai T, Nishimura H, Baba A, Akaishi M, et al. (1996). Early reduction of neurohumoral factors plays a key role in mediating the efficacy of beta-blocker therapy for congestive heart failure. *Am Heart J* 131:329-336.
- [14] Rockman HA, Koch WJ, and Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 2002;415:206–212.
- [15] Rengo G, Perrone-Filardi P, Femminella GD, et al. Targeting the  $\beta$ -Adrenergic Receptor System Through G-Protein-Coupled Receptor Kinase 2: A New Paradigm for Therapy and Prognostic Evaluation in Heart Failure: From Bench to Bedside. *Circ Heart Fail* 2012;5:385-91.
- [16] Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptor kinases. *Cell* 1993;74:409–412.
- [17] Femminella GD, Rengo G, Pagano G, et al.  $\beta$ -Adrenergic Receptors and G Protein-Coupled Receptor Kinase-2 in Alzheimer's Disease: A New Paradigm for Prognosis and Therapy? *J Alzheimers Dis.* Epub ahead of print 3 Dec 2012. DOI: 10.3233/JAD-121813.
- [18] Cipolletta E, Campanile A, Santulli G, et al. The G protein coupled receptor kinase 2 plays an essential role in beta-adrenergic receptor-induced insulin resistance. *Cardiovasc Res* 2009;84:407-415.
- [19] Rengo G, Lympopoulos A, Leosco D, et al. GRK2 as a novel gene therapy target in heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50:785-92.

- [20] Ungerer M, Bohm M, Elce JS, et al. Altered expression of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase and  $\beta$ 1-adrenergic receptors in the failing heart. *Circulation* 1993;87:454-463.
- [21] Ungerer M, Parruti G, Bohm M, et al. Expression of  $\beta$ - arrestins and  $\beta$ -adrenergic receptor kinases in the failing human heart. *Circ Res* 1994;74:206-213.
- [22] 10. Raake PW, Vinge LE, Gao E, et al. G protein-coupled receptor kinase 2 ablation in cardiac myocytes before or after myocardial infarction prevents heart failure. *Circ Res* 2008;103:413-422.
- [23] Bristow MR, Larrabee P, Muller-Beckmann B, et al. Effects of carvedilol on adrenergic receptor pharmacology in human ventricular myocardium and lymphocytes. *Clin Investig* 1992;70:S105-113.
- [24] Brodde OE, Kretsch R, Ikezono K, et al. Human  $\beta$ -adrenoceptors: relation of myocardial and lymphocyte  $\beta$ -adrenoceptor density. *Science* 1986;231:1584-1585.
- [25] Dzimiri N, Basco C, Moorji A, et al. Characterization of lymphocyte  $\beta$ 2-adrenoceptor Signaling in patients with left ventricular volume overload disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29:181- 188.
- [26] Dzimiri N, and Moorji A. Relationship between alterations in lymphocytes and myocardial  $\beta$ -adrenoceptor density in patients with left heart valvular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996;23:498-502.
- [27] Werner C, Werdan K, Ponicke K, et al. Impaired beta-adrenergic control of immune function in patients with chronic heart failure: reversal by beta1-blocker treatment. *Basic Res Cardiol* 2001;96:290–298.
- [28] Iaccarino G, Barbato E, Cipolletta E, et al. Elevated myocardial and lymphocyte GRK2 expression and activity in human heart failure. *Eur Heart J* 2005;26:1752-1758.
- [29] Hata JA, Williams ML, Schroder JN, et al. Lymphocyte levels of GRK2 (betaARK1) mirror changes in the LVAD-supported failing human heart: lower GRK2 associated with improved beta-adrenergic signaling after mechanical unloading. *J Card Fail* 2006;12:360-368.

- [30] Hambrecht R, Gielen S, Linke A, et al. Effects of exercise training on left ventricular function and peripheral resistance in patients with chronic heart failure: A randomized trial. *JAMA* 2000;283:3095-3101.
- [31] 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;99:1173-1182.
- [32] Piepoli MF, Davos C, Francis DP, et al. Exercise training metaanalysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH). *BMJ* 2004;328:189-195.
- [33] Flynn KE, Piña IL, Whellan DJ, et al; HF-ACTION Investigators. Effects of exercise training on health status in patients with chronic heart failure: HF-ACTION randomized controlled trial. *JAMA* 2009;301:1451-1459.
- [34] Giallauria F, Acampa W, Ricci F, et al. Exercise training early after acute myocardial infarction reduces stress-induced hypoperfusion and improves left ventricular function. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Epub ahead of print 6 Dec 2012. DOI: 10.1007/s00259-012-2302-x.
- [35] Rinaldi B, Corbi G, Boccuti S, et al. Exercise training affects age-induced changes in SOD and heat shock protein expression in rat heart. *Exp Gerontol* 2006;41:764-70.
- [36] McKelvie RS, Teo KK, Roberts R, et al. Effects of exercise training in patients with heart failure: the Exercise Rehabilitation Trial (EXERT). *Am Heart J* 2002;144:23-30.
- [37] Leosco D, Rengo G, Iaccarino G, et al. Exercise promotes angiogenesis and improves beta-adrenergic receptor signalling in the post-ischaemic failing rat heart. *Cardiovasc Res* 2008;78:385-394.
- [38] Giallauria F, De Lorenzo A, Pilerici F, et al. Reduction of NT-pro-BNP levels with exercise-based cardiac rehabilitation in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2006; 13:625-632.
- [39] Giallauria F, De Lorenzo A, Pilerici F, et al. long-term effects of cardiac rehabilitation on end-exercise heart rate recovery after myocardial infarction. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2006;13:544-550.

- [40] Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, et al. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:1397–1402.
- [41] Roger VL, Weston SA, Redfield MM, et al. Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA* 2004;292:344–350.
- [42] Rengo G, Pagano G, Squizzato A, Moja L, Femminella GD, de Lucia C, Komici K, Parisi V, Savarese G, Ferrara N, Perrone-Filardi P, Leosco D. Oral anticoagulation therapy in heart failure patients in sinus rhythm: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. Epub ahead of print Jan 2 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0052952.
- [43] Rengo G, Zincarelli C, Femminella GD, et al. Myocardial  $\beta(2)$ -adrenergic receptor gene delivery promotes coordinated cardiac adaptive remodeling and angiogenesis in heart failure. *Br J Pharmacol* 2012;166:2348-61
- [44] MacDonnell SM, Kubo H, Crabbe DL, et al. Improved myocardial beta-adrenergic responsiveness and signaling with exercise training in hypertension. *Circulation* 2005;111:3420-3428.
- [45] 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;293:H1596-603.
- [46] 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:H369-74.
- [47] Gademan MG, Swenne CA, Verwey HF, et al. Effect of exercise training on autonomic derangement and neurohumoral activation in chronic heart failure. *J Card Fail*. 2007;13:294-303.
- [48] Rengo G, Leosco D, Zincarelli C, et al. Adrenal GRK2 lowering is an underlying mechanism for the beneficial sympathetic effects of exercise training in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;298:H2032-8.
- [49] Cohn JN. Sympathetic nervous system in heart failure. *Circulation* 2002;106:2417-2418.

[50] Iaccarino G, Tomhave ED, Lefkowitz RJ, Koch WJ. Reciprocal in vivo regulation of myocardial G protein-coupled receptor kinase expression by  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation and blockade. *Circulation* 1998;98:1783-1789.

[51] Rengo G, Lympopoulos A, Zincarelli C, et al.  $\beta$ -adrenergic receptor blockade restores the GRK2-mediated adrenal  $\alpha(2)$  -adrenergic receptor-catecholamine production axis in heart failure. *Br J Pharmacol* 2012;166:2430-40.

[52] Wessler BS, Kramer DG, Kelly JL, et al. Drug and device effects on peak oxygen consumption, 6-minute walk distance, and natriuretic peptides as predictors of therapeutic effects on mortality in patients with heart failure and reduced ejection fraction. *Circ Heart Fail* 2011;4:578-88.

## LEGENDA

Figura 1. Il sistema recettoriale adrenergico  $\beta$ AR nel cuore e nei linfociti periferici in condizioni fisiologiche (a sx) e nel cuore scompensato (a dx).

Figura 2. Modificazioni indotte dall'esercizio ( $\Delta\%$ ) dei livelli proteici linfocitari di GRK2 e dei livelli di GRK2 mRNA, norepinefrina plasmatica, e di NT-proBNP plasmatico nel gruppo dei sopravvissuti e dei deceduti.

GRK2 = G-protein coupled receptor kinase-2, NT-proBNP = N-terminal pro brain natriuretic peptide. \*  $p < 0.001$  sopravvissuti vs non sopravvissuti.

Figura 3. Curve di sopravvivenza di Kaplan–Meier sviluppate sulle modificazioni indotte dall'esercizio ( $\Delta\%$ ) dei livelli proteici linfocitari di GRK2 e di norepinefrina plasmatica, dopo stratificazione dei valori sopra (linea blu) e sotto la mediana (linea verde) in riferimento alla mortalità cardiaca.

GRK2 = G-protein coupled receptor kinase-2.

**Tabella 1. Caratteristiche generali popolazione di studio (n=193).**

---

Età (anni)*	71±8
Maschi / Femmine	129(66.8%) / 64(33.2%)
Peso (kg)	79.4±12.0
Altezza (cm)	170±8.5
Body Mass Index (kg/m <sup>2</sup> )	27.3±4.8
Frequenza cardiaca (bpm)	83.9±24
Iperensione arteriosa sistemica	75.6%
Diabete*	41.4%
Ipercolesterolemia*	30.0%
Fumo	42.5%
Funzionalità Renale(GFR<60 ml/min)	39.9%
CABG/PTCA*	52.3%
Classe NYHA (II/III)*	21 (10.9%)/172 (89.1%)
FEVS (%)*	31.7±10.3
VO <sub>2</sub> picco (ml/kg/min)*	12.37±1.4
<b>Farmaci (%)</b>	
ACE inibitori	77.7
Sartani	13.5
β-bloccanti	76.7
Diuretici	73.6
Digossina	41.4
Nitrati	78.7
Ca <sup>++</sup> Antagonisti	32.1
<b>Determinazioni biochimiche</b>	
Espressione proteina GRK2 (DU)*	1.30±0.50
NT-proBNP (pg/ml)*	2127±1134
Noradrenalina (pg/ml)*	653±219

---

I valori sono espressi come media ± DS o %. DS= deviazione standard, GFR= glomerular filtration rate, CABG = coronary artery bypass grafting, PTCA = percutaneous transluminal coronary angioplasty, NYHA = New York Heart Association, FEVS= frazione di eiezione ventricolare sinistra, VO<sub>2</sub> picco= Massimo consumo di ossigeno al picco dell'esercizio, ACE = angiotensin converting enzyme, GRK2 = G-protein coupled receptor kinase-2, NT-proBNP = N terminal pro brain natriuretic peptide.

Le variabili indicate con (\*) nell'analisi univariata raggiungono una significatività p< 0.10.

**Tabella 2. Analisi multivariata di sopravvivenza con modelli di rischio proporzionale sec. Cox per i parametri basali.**

Variabile	Wald	P value
NT-proBNP	89.24	<0.0001
VO2 Picco	51.82	<0.0001
CABG/PTCA	28.330	<0.0001
Noradrenalina	11.24	<0.0001
FEVS	11.22	<0.0001
Età	8.37	<0.005
Classe NYHA (II/III)	7.92	<0.005
Espressione proteina GRK2	4.13	<0.05

NT-proBNP = N-terminal pro brain natriuretic peptide, VO2 picco= Massimo consumo di ossigeno al picco dell'esercizio, CABG/PTCA= coronary artery bypass grafting/percutaneous transluminal coronary angioplasty, FEVS= frazione di eiezione ventricolare sinistra, NYHA= New York Heart Association, GRK2 = G-protein coupled receptor kinase-2.

**Tabella 3. Effetti dell'esercizio fisico aerobico sui parametri clinici, funzionali e biochimici.**

<b>Variabile</b>	<b>Basale</b>	<b>3-mesi</b>	<b>p</b>
Frequenza cardiaca (bpm)	81.6±16	74.4±15	
			<0.0001
FEVS (%)	31.7±10.3	32.7±10.2	<0.56
VO <sub>2</sub> picco (ml/kg/min)	12.37±1.4	13.44±1.9	<0.01
Espress. proteina GRK2 (DU)	1.29±0.52	1.16±0.65	
			<0.0001
NT-proBNP (pg/ml)	2127±1134	1539±840	
			<0.0001
Noradrenalina (pg/ml)	653±219	587±210	
			<0.0001

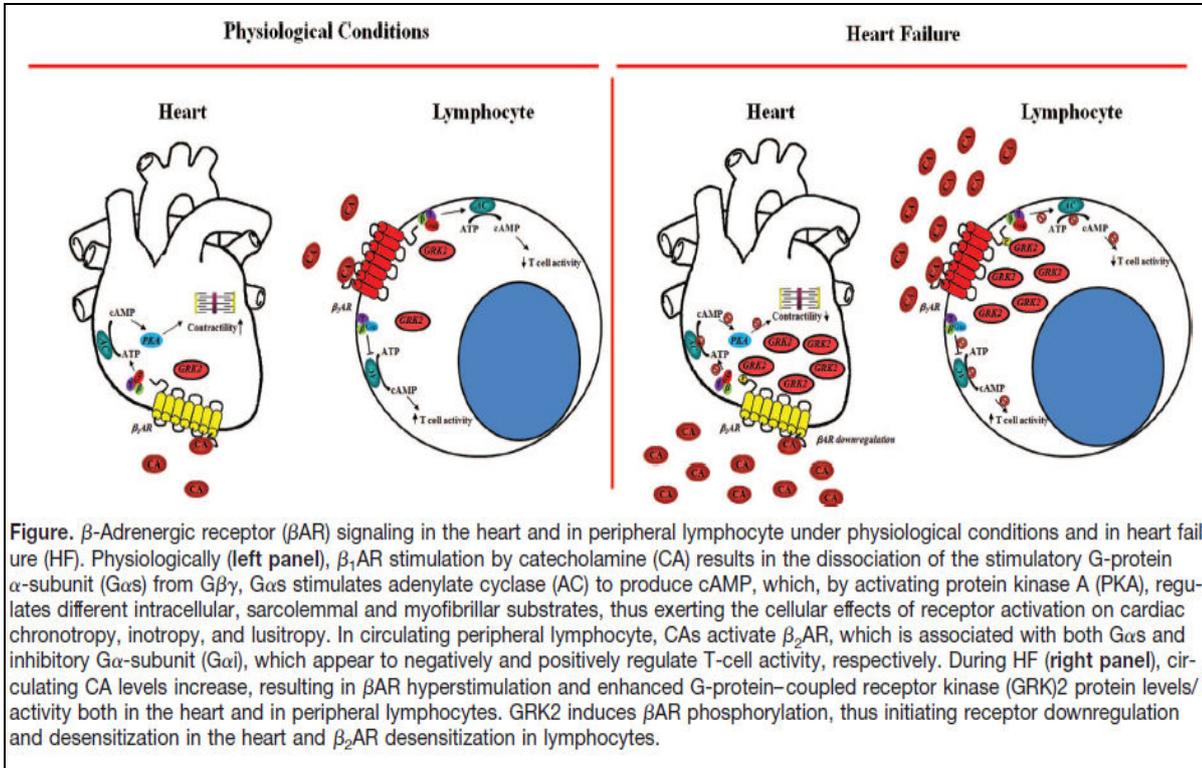
I valori sono espressi come media ± DS o %. FEVS= frazione di eiezione ventricolare sinistra, VO<sub>2</sub> picco = Massimo consumo di ossigeno al picco dell'esercizio, GRK2 = G-protein coupled receptor kinase-2, NT-proBNP = N-terminal pro brain natriuretic peptide.

**Tabella 4 . Analisi multivariata di sopravvivenza con modelli di rischio proporzionale sec. Cox per le variazioni dei parametri ematici e funzionali indotti dal training fisico.**

<b>Variabile</b>	<b>Wald</b>	<b>P value</b>
$\Delta$ Proteina GRK2 linfocitaria	45.27	<0.0001
$\Delta$ Frequenza Cardiaca	17.04	<0.0001
$\Delta$ Noradrenalina	15.91	<0.0001
$\Delta$ VO2 picco	4.10	0.043
$\Delta$ NT-proBNP	0.34	0.56

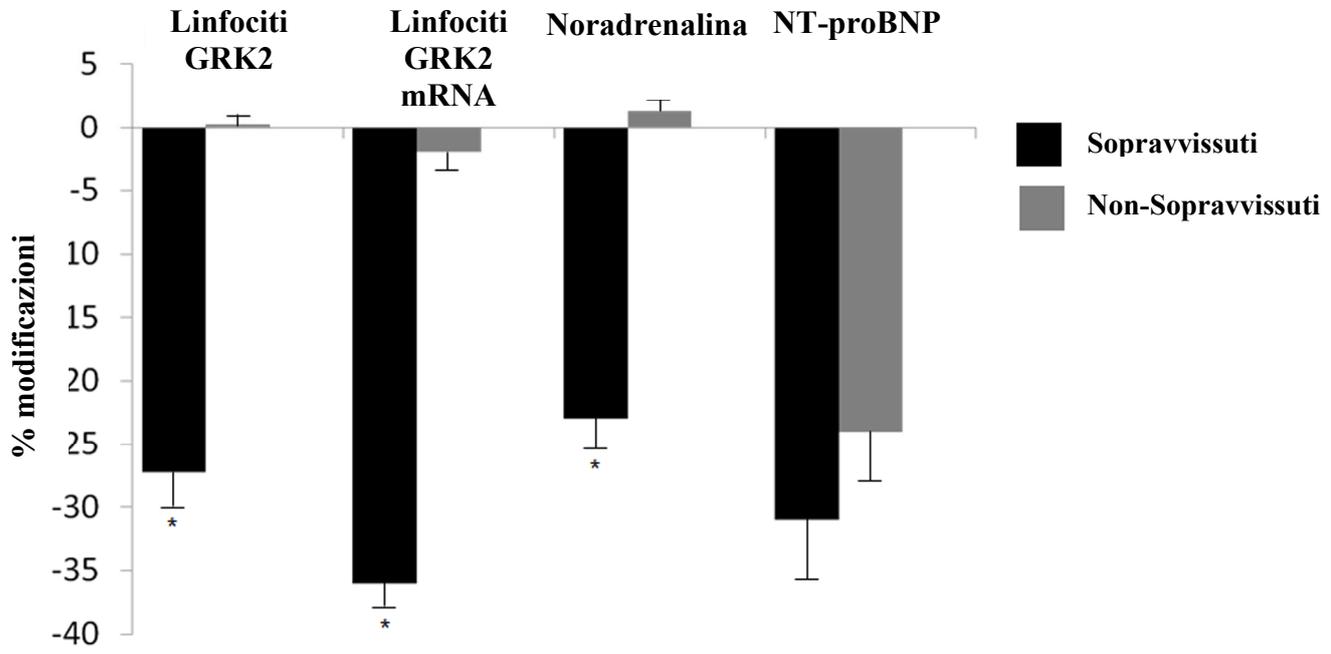
GRK2 = G-protein coupled receptor kinase-2, VO2 picco = Massimo consumo di ossigeno al picco dell'esercizio, NT-proBNP = N terminal pro brain natriuretic peptide.

**Figura 1**



Tratto da Rengo G, et al. Circ Heart Fail. 2012 May 1;5(3):385-91.

**Figura 2**



**Figura 3**

