

Anticorpi agonisti del recettore dell'angiotensina II nell'ipertensione in gravidanza

G. PERRONE¹, M.G. DE STEFANO¹, E. BEVILACQUA¹, B. CASALI², D. NICOLI², P. GALOPPI¹, C. STEFANUTTI³, M.G. PORPORA¹, O. CAPRI¹, R. BRUNELLI¹

RIASSUNTO: Anticorpi agonisti del recettore dell'angiotensina II nell'ipertensione in gravidanza.

G. PERRONE, M.G. DE STEFANO, E. BEVILACQUA, B. CASALI, D. NICOLI, P. GALOPPI, C. STEFANUTTI, M.G. PORPORA, O. CAPRI, R. BRUNELLI

Introduzione. Crescenti evidenze indicano che l'ipertensione in gravidanza è accompagnata da disfunzioni immunologiche e del sistema renina-angiotensina. Un autoanticorpo, di classe IgG, è stato proposto come fattore circolante in grado di dare inizio al processo patologico. L'obiettivo dello studio è stato quello di valutare la concentrazione sierica di anticorpi agonisti anti-recettore AT1 dell'angiotensina II (AAb anti AT1R), in pazienti con gravidanza complicata da ipertensione.

Metodi. Sono stati analizzati 3 gruppi di pazienti: 13 pazienti con ipertensione gestazionale, 9 pazienti affette da ipertensione cronica in gravidanza e 10 controlli (gravidanze fisiologiche). La ricerca degli AAb anti AT1R nel plasma è stata effettuata con metodica ELISA, usando come antigene il peptide corrispondente alla sequenza aminoacidica della seconda ansa extracellulare dell'AT1 receptor.

Risultati. Le pazienti con ipertensione gestazionale presentano una concentrazione di AAb anti AT1R più elevata rispetto ai controlli ($2,1 \pm 0,5$ vs. $1,5 \pm 0,5$ U/ml, $p=0,029$). Tra il gruppo di pazienti affette da ipertensione cronica e quello dei controlli non si è osservata alcuna differenza significativa.

Conclusioni. La concentrazione degli AAb anti AT1R è aumentata nell'ipertensione gestazionale. I risultati preliminari mettono in luce nuovi aspetti immunologici dell'ipertensione gestazionale. Un monitoraggio di questi autoanticorpi potrebbe giocare un ruolo importante nella diagnosi e nel trattamento di tale patologia.

KEY WORDS: Autoanticorpi antirecettore AT1 - Angiotensina II - Gravidanza - Ipertensione. Autoantibodies anti AT1 receptor - Angiotensin II - Pregnancy - Hypertension.

SUMMARY: Antibodies agonist of Angiotensin II receptor in pregnancy complicated by hypertension.

G. PERRONE, M.G. DE STEFANO, E. BEVILACQUA, B. CASALI, D. NICOLI, P. GALOPPI, C. STEFANUTTI, M.G. PORPORA, O. CAPRI, R. BRUNELLI

Introduction. There is growing evidence that Hypertension in pregnancy is linked to immunological and the renin-angiotensin system dysfunction. An autoantibody (class IgG), has been proposed as a circulating factor able to begin the disease process. The objective of this study was to evaluate the serum concentration of anti-AT1 receptor antibody agonist of angiotensin II (AAb anti AT1R), in patients with pregnancy complicated by hypertension.

Materials and methods. We analysed three groups of patients: 13 patients with gestational hypertension, 9 with chronic hypertension in pregnancy and 10 controls (physiological pregnancies). Peptide corresponding to amino acid sequence of the second extracellular loop AT1 receptor has been used as antigen for evaluating AAb anti AT1R plasma concentration.

Results. Patients with gestational hypertension have a concentration of anti AAb AT1R higher than controls ($2,1 \pm 0,5$ vs $1,5 \pm 0,5$ IU / ml, $p=0,029$). Between the group of patients affected by chronic hypertension and controls was not observed any significant difference.

Conclusions. The concentration of AAb anti AT1R is increased in gestational hypertension. These preliminary results highlight new immunological aspects of gestational hypertension. Monitoring these autoantibodies in pregnancy at risk could play an important role in the diagnosis and treatment of this disease.

Introduzione

L'ipertensione è una patologia importante e frequente della gravidanza. La patogenesi è attualmente sconosciuta ma potrebbe essere multifattoriale (1).

Il meccanismo molecolare responsabile dell'insorgenza dell'ipertensione gestazionale e della preeclampsia è stato oggetto di numerosi studi, che da più di

¹ Dipartimento di Scienze Ginecologiche-Ostetriche e di Scienze Urologiche.

"Sapienza" Università di Roma, Roma, Italia

² Azienda Ospedaliera di Reggio Emilia, Lab. Biologia Molecolare, Reggio Emilia, Italia

³ U.O. Tecniche Terapeutiche Extracorporee - U.O.C. Immunoematologia e Medicina Trasfusionale - Dipartimento di Medicina Molecolare. "Sapienza" Università di Roma, Roma, Italia

cinquanta anni hanno focalizzato l'attenzione sul sistema renina-angiotensina-aldosterone. L'angiotensina II è un potente agente vasocostrittore e può promuovere la ritenzione di sodio e acqua tramite il rilascio di aldosterone. Inoltre, l'angiotensina II è un fattore di crescita per i miociti cardiaci e le cellule muscolari lisce tramite il recettore AT1 (2). C'è una crescente evidenza che l'ipertensione sia accompagnata da disfunzioni immunologiche: aumento della concentrazione nel siero d'immunoglobuline e della loro secrezione, incremento di autoanticorpi diretti contro le membrane nucleari e dell'attività dei linfociti T sensibilizzati (3). È stato inoltre proposto un fattore circolante unico che inizierebbe le modificazioni associate all'ipertensione, porterebbe alla disfunzione delle cellule dell'endotelio materno, rappresentando l'evento chiave che può condurre alle diverse manifestazioni cliniche della preeclampsia (4). Ci sono diversi studi a supporto del ruolo preminente dell'endotelio nella preeclampsia (5). Il meccanismo coinvolto nella disfunzione delle cellule endoteliali è ancora poco conosciuto. Fattori multipli circolanti, come per esempio le lipoproteine alterate e gli autoanticorpi, potrebbero provocare lo spettro dei cambiamenti endoteliali (6-8). È stato dimostrato che il titolo di autoanticorpi diretti contro alcuni recettori accoppiati a proteine G, aumenta significativamente nei pazienti con ipertensione maligna (9). Ciò ha avvalorato l'ipotesi che le disfunzioni immunitarie potrebbero contribuire alla patogenesi di questa malattia. L'idea che tale fattore circolante possa avere una base immunologica è fondata, perché la gravidanza nel suo stesso essere rappresenta una "meraviglia immunologica". Un contributo fondamentale deriva dalle ricerche di Wollukat, il quale, nel '99, ha dimostrato la presenza di un anticorpo capace di legare il recettore AT1 dell'angiotensina mimando gli effetti della stessa (17). È stato dimostrato, inoltre, che l'autoanticorpo di tipo IgG anti-recettore AT1 agisce legandosi alla seconda ansa extracellulare (19). Diversi studi hanno rivelato l'azione stimolante degli autoanticorpi anti recettore AT1 (AAb-

AT1R) nelle singole cellule che assumono un ruolo centrale nella patologia ipertensiva (Tabella 1).

Per verificare la possibile implicazione dei meccanismi immunologici nell'ipertensione in gravidanza, abbiamo valutato la concentrazione sierica di autoanticorpi diretti contro il recettore AT1 dell'angiotensina II (AAb anti AT1R) in pazienti con gravidanza complicata da ipertensione gestazionale, in pazienti gravide affette da ipertensione cronica ed in pazienti normotese con gravidanza fisiologica.

Materiali e metodi

Il presente studio caso-controllo è stato condotto presso il Dipartimento di Scienze Ginecologiche-Ostetriche e Scienze Urologiche presso l'Università degli Studi di Roma "Sapienza", in collaborazione con il Laboratorio di Biologia Molecolare dell'Azienda Ospedaliera di Reggio Emilia.

Dell'intera casistica del nostro Dipartimento sono state prese in considerazione 22 donne in gravidanza, afferite presso il nostro istituto dal mese di agosto 2007 a febbraio 2008, con evidenza di disordini ipertensivi in gravidanza.

Tutte le pazienti avevano un'epoca gestazionale superiore alle 24 settimane (epoca gestazionale compresa tra le 24 e le 34 settimane). L'ipertensione è stata definita in base a valori pressori >140/90 mmHg.

Tra le suddette pazienti:

- 13 sono affette da ipertensione gestazionale (IG): rialzi pressori registrati dopo la ventesima settimana di gestazione;
- 9 pazienti sono affette da ipertensione cronica (IC): preesistente alla gravidanza.

Abbiamo considerato come controllo un gruppo di 10 pazienti gravide non ipertese.

Sono stati utilizzati i seguenti criteri d'inclusione:

- gravidanza singola in fisiologica evoluzione tra la 24a e la 34a settimana;

TABELLA 1 - RUOLO FISIOPATOLOGICO DELL'AA AT1R NELL'IPERTENSIONE GESTAZIONALE E NELLA PREECLAMPSIA.

Tipi di cellula	Fattore implicato	Ipotesi associata a preeclampsia
Miociti cardiaci	Incremento del grado di contrazione	Ipertrofia cardiaca (10,11)
Cellule mesangiali	Incremento di PAI-1 e IL-6	Proteinuria e ipercoagulazione (12) Incremento della risposta infiammatoria
Trofoblasti umani	Incremento di PAI-1. 2sFlt-1 NADPH-ossidasi	Invasione superficiale e ipercoagulazione (13) Disfunzione endoteliale materna (14) Incremento delle specie reattive dell'ossigeno (15)
Linee cellulari AT1-r dipendenti	Incremento di Ca ²⁺	Aumento della contrattilità (16) Disfunzione piastrinica
Cellule muscolari lisce dei vasi	Incremento di TF NADPH-ossidasi	Ipercoagulazione (17) Incremento delle specie reattive dell'ossigeno
Monociti	Incremento TF	Ipercoagulazione (18)

- assenza di disordini di natura immunologica e dismetabolica;
- assenza di patologie su base infettiva.

Le pazienti sono state sottoposte ad un prelievo di sangue venoso. Il sangue è stato raccolto in provette sterili della capienza di 10 ml in assenza di anticoagulante.

Tali campioni sono stati centrifugati alla velocità di 4000 giri per 20 minuti e successivamente è stato prelevato il siero sovranatante. Questo è stato conservato ad una temperatura di -80°C e trasportato in crioconservazione da Roma al laboratorio di Reggio Emilia; in questa sede si è proceduto all'analisi dei campioni.

Per la ricerca degli AAb anti AT1R, abbiamo utilizzato la metodica ELISA che prevede l'utilizzo di un sistema immunoenzimatico "home made", creato nel 2002 da Yu-Hua L. et al. (21).

Il peptide, corrispondente alla sequenza amminoacidica 165-191 (I-H-R-N-V-F-F-I-E-N-T-N-I-T-V-C-A-F-HY-E-S-Q-N-S-T-L) della seconda ansa extracellulare del recettore AT1 umano, è stato sintetizzato dalla ditta Invitrogen.

In ogni pozzetto della micropiastre sono stati coattati 100 μl di tale peptide con una soluzione di 100 mM di Na_2CO_3 (pH 9,6) alla concentrazione di 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, e incubati a temperatura ambiente per 16 ore.

Ogni pozzetto è stato in seguito saturato con la soluzione tampone PBS-Tween 20 (*phosphate buffered saline*) alla concentrazione di 0,01 mol/l e pH di 7,4.

Dopo tre lavaggi con PBS-Tween 20 è stato aggiunto il siero in precedenza diluito (1:100) e il tutto incubato per 1 ora a 37°C . Effettuati tre lavaggi successivi, è stato aggiunto uno specifico anticorpo secondario anti-IgG umane, coniugato con perossidasi di rafano, diluito precedentemente 1:2000 in PBS.

La micropiastre veniva incubata per 1 ora a 37°C e poi venivano effettuati altri 3 lavaggi.

Sono stati aggiunti 100 μl di substrato cromogeno TMB (3,3', 5,5'-Tetrametil-benzidina) e sono stati incubati a costante agitazione e a temperatura ambiente (RT) per 5 minuti.

Venivano aggiunti 100 μl della soluzione di stop ed infine si procedeva alla lettura della reazione.

La densità ottica (OD-optical density) è stata misurata a 450 nm in un lettore di micropiastre.

Per l'esecuzione dell'analisi statistica ci siamo avvalsi del programma SPSS 13.0 for Windows. Abbiamo reputato significativo il valore di probabilità $p < 0,05$.

Risultati

Dall'analisi dei campioni abbiamo ottenuto 32 valori di densità ottica (OD) corrispondenti al titolo anticorpale. Il valore più basso risulta essere 0,77 U/ml ed il più alto 2,853 U/ml, con una media di $1,807 \pm 0,53$ U/ml.

Nel siero delle pazienti con ipertensione gestazionale (IG) abbiamo trovato un titolo anticorpale medio di $2,1 \pm 0,5$ U/ml, nei controlli il valore medio corrisponde a $1,5 \pm 0,5$ U/ml, nel gruppo di pazienti con ipertensione cronica (IC) $1,68 \pm 0,45$ U/ml (IG vs controlli $p < 0,05$). I dati sono illustrati nella Figura 1.

Discussione

Gant et al. nel 1973 avevano dimostrato l'ipersensibilità all'infusione di angiotensina II nelle pazienti preeclampatiche (20). Altri studi sostengono tale evidenza basandosi su osservazioni genetiche, ambientali ed immunologiche.

Yu-Hua Liao et al. nel 2002 hanno sperimentato lo stesso tipo di analisi da noi eseguita nella ricerca degli AAb anti AT1R nel siero di pazienti, non in gravidanza, affetti da ipertensione refrattaria, ottenendo risultati positivi (21).

I dati emersi dalla nostra ricerca mettono in luce una significativa differenza di concentrazione di AAb anti AT1R tra le pazienti affette da ipertensione gestazionale e le normotesi in gravidanza fisiologica. Ciò permette di supporre che gli AAb-AT1R, presenti in maggior quantità nelle pazienti ipertese, possano svolgere un ruolo centrale in tale patologia. Questo risultato sostiene l'ipotesi patogenetica dell'ipertensione gestazionale su base anticorpale e permette di considerare un possibile monitoraggio della gravidanza a rischio per disordini ipertensivi basato su una metodica di rilevazione degli autoanticorpi.

Inoltre non abbiamo evidenziato alcuna differenza tra la concentrazione di autoanticorpi nel siero delle

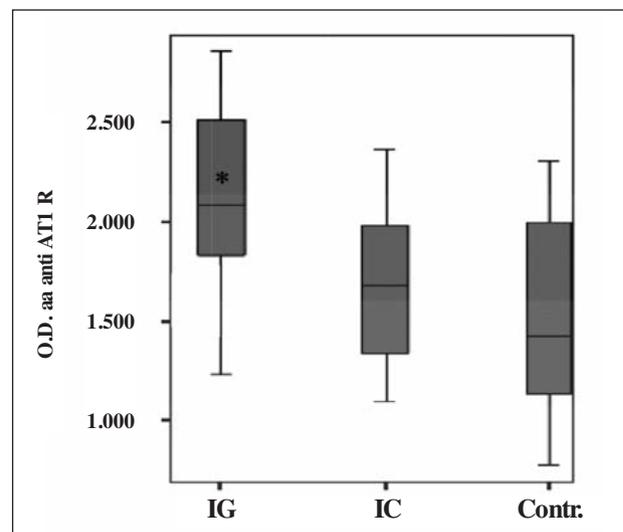


Fig. 1 - Concentrazione sierica di AA-AT1R nei 3 gruppi: Ipertensione Gestazionale: IG; Ipertensione Cronica in Gravidanza: IC; Controlli sani in gravidanza: Contr. (IG vs Contr. : * $p < 0,05$).

pazienti in gravidanza con ipertensione cronica e le pazienti normotese. Ciò rimane in accordo con l'ipotesi patogenetica per cui la disfunzione immunologica rappresenterebbe una delle prime tappe fondamentali dell'ipertensione indotta dalla gravidanza. Un'ipertensione preesistente allo stato gravidico non dovrebbe associarsi ad alterazioni dello stato immunitario, poiché la produzione di autoanticorpi dovrebbe essere scatenata dalla gravidanza stessa.

In questi ultimi anni c'è un crescente interesse nei confronti degli AAB anti AT1R, non solo nel campo dell'ostetricia ma anche in altri campi, come la cardiologia, la nefrologia, la terapia dei trapianti.

Sono in corso numerosi studi che tentano di spiegare come avviene la produzione patologica degli AAB-

AT1R. Sono stati proposti fattori genetici, immunitari, ambientali (22,23). Inoltre è stato suggerito che la produzione anticorpale sia secondaria alla ridotta perfusione placentare ed all'incremento della risposta infiammatoria materna (14,24,25). In ogni caso, l'eziologia della disfunzione immunitaria rimane in gran parte sconosciuta.

In conclusione i nostri dati, pur ottenuti su una casistica poco numerosa, dimostrano che gli autoanticorpi anti-recettore AT1 potrebbero essere coinvolti nella patogenesi dell'ipertensione gestazionale e non nella patologia ipertensiva cronica in gravidanza. Il monitoraggio di questi autoanticorpi potrebbe giocare un ruolo importante nella diagnosi precoce ed in approcci terapeutici innovativi di tale patologia.

Bibliografia

- Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of preeclampsia: Linking placental ischemia/hypoxia with microvascular dysfunction. *Microcirculation* 2002;9:147-160.
- Xoriuchi M, Hamai M, Cui TX, Iwai M, Minokoshi Y. Cross talk between angiotensin II type 1 and type 2 receptors: cellular mechanism of angiotensin type 2 receptormediated cell growth inhibition. *Hypertens Res* 1999 Jul;22(2):67-74.
- Fu ML. Do immune system changes have a role in hypertension? *J Hypertens* 1995;13:1259-65.
- Roberts JM, Taylor RN, Goldfien A. Endothelial cell activation as a pathogenetic factor in preeclampsia. *Semin Perinatol* 1991 Feb;15(1):86-93.
- Taylor WR. Mechanical deformation of the arterial wall in hypertension: A mechanism for vascular pathology. *Am J Med Sci* 1998;316:156-161.
- Haller H, Hempel A, Homuth V, et al. Endothelial-cell permeability and protein kinase C in pre-eclampsia. *Lancet* 1998;351:945-949.
- Stefanutti C, Vivenzio A, Di Giacomo S, Ferraro PM. Cytokine profile in serum of homozygous familial hypercholesterolemia is changed by LDL-apheresis *Cytokine* 2011; 55:245-250.
- Parasassi T, Brunelli R, Bracci-Laudiero L, Greco G, Gustafsson AC, Krasnowska EK, Lundeberg J, Lundeberg T, Pittaluga E, Romano MC, Serafino A. Differentiation of normal and cancer cells induced by sulphhydryl reduction: biochemical and molecular mechanisms. *Cell Death Differ* 2005;12(10):1285-95.
- Fu ML, Herlitz H, Wallukat G, et al: Functional autoimmune epitope on alpha 1-adrenergic receptors in patients with malignant hypertension. *Lancet* 1994;344:1660-3.
- Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jupner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, Dudenhausen JW, Haller H, Luft FC. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest* 1999;103:945-952.
- Xia Y, Wen H, Bobst S, Day MC, Kellems RE. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human trophoblast cells. *J Soc Gynecol Investig* 2003;10:82-93.
- Bobst SM, Day MC, Gilstrap LC 3rd, Xia Y, Kellems RE. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human mesangial cells and induce interleukin-6 and plasminogen activator inhibitor-1 secretion. *Am J Hypertens* 2005;18:330-336.
- Xia Y, Wen H, Bobst S, Day MC, Kellems RE. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human trophoblast cells. *J Soc Gynecol Investig* 2003;10:82-93.
- Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005;308:1592-1594.
- Dechend R, Viedt C, Muller DN, Ugele B, Brandes RP, Wallukat G, Park JK, Janke J, Barta P, Theuer J, Fiebeler A, Homuth V, Dietz R, Haller H, Kreuzer J, Luft FC. AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase. *Circulation* 2003;107: 1632-1639.
- Thway TM, Shlykov SG, Day MC, Sanborn BM, Gilstrap LC, 3rd, Xia Y, Kellems RE. Antibodies from preeclamptic patients stimulate increased intracellular Ca²⁺ mobilization through angiotensin receptor activation. *Circulation* 2004;110:1612-1619.
- Dechend R, Homuth V, Wallukat G, Kreuzer J, Park JK, Theuer J, Juepner A, Gulba DC, Mackman N, Haller H, Luft FC. AT(1) receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients cause vascular cells to express tissue factor. *Circulation* 2000;101:2382-2387.
- Dorffell Y, Wallukat G, Bochnig N, Homuth V, Herberg M, Dorffell W, Pruss A, Chaoui R, Scholze J. Agonistic AT(1) receptor autoantibodies and monocyte stimulation in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 2003;16:827-833.
- Dechend R, Muller DN, Wallukat G, et al. AT1 receptor agonistic antibodies, hypertension, and preeclampsia. *Seminars in Nephrology* 2004;24:571-579.
- Gant NF, Daley GI, Chand S, Whalley PJ, MacDonald PC. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. *J Clin Invest* 1973 Nov;52(11):2682-2689.
- Liao YH, Wei YM, Wang M, Wang ZH, Yuan HT, Cheng LX. Autoantibodies against AT1-receptor and 1-adrenergic receptor in patients with hypertension. *Hypertens Res* 2002;25(4):641-646.
- Pearce SH, Merriman TR. Genetic progress towards the molecular basis of autoimmunity. *Trends Mol Med* 2006;12:90-98.
- Barak Y. The immune system and happiness. *Autoimmun Rev* 2006 Oct;5(8):523-7.
- Brunelli R, Masselli G, Parasassi T, De Spirito M, Papi M, Perrone G, Pittaluga E, Gualdi G, Polletтини E, Pittalis A, Anceschi MM. Intervillous circulation in intra-uterine growth restriction. Correlation to fetal well being. *Placenta* 2010;31(12):1051-6.
- Perrone G, Anceschi MM, Capri O, Galoppi P, Pizzulo S, Buccheri M, Pascone R, Nofroni I, Brunelli R. Maternal C-Reactive Protein at Hospital admission is a simple predictor of funisitis in preterm premature rupture of membranes. *Gynecol Obstet Invest* 2012;74(2):95-9.