

Università degli Studi di Napoli Federico II

**Dottorato di Ricerca**  
**in**  
**Fisiopatologia Clinica e Medicina Sperimentale**  
**Indirizzo Scienze Cardiovascolari**  
**XXV CICLO**



**Tesi di Dottorato**

**Livelli di GRK2 nelle arterie ombelicali di  
gravidanze complicate da ipertensione  
gestazionale e preeclampsia**

Tutor:  
Prof. Bruno Trimarco

Candidato:  
Dott. Alfonso Campanile

***Anno Accademico 2012/2013***

# **INDICE**

## *INTRODUZIONE*

*Pag. 3-5*

- La patologia ipertensiva in gravidanza e la sindrome preeclamptica
- Ruolo di GRK2 nell'ipertensione arteriosa essenziale
- Ipotesi e obiettivi dello studio

## *METODI*

*Pag. 6-8*

- Disegno dello studio e caratteristiche della popolazione analizzata
- Isolamento delle arterie ombelicali e valutazione di GRK2 mediante western blot
- Valutazione funzionale mediante  $\beta$  binding recettoriale
- Analisi statistica

## *RISULTATI*

*Pag. 9-10*

- Caratteristiche cliniche della popolazione analizzata
- Livelli di GRK2 e densità dei recettori  $\beta$  adrenergici
- Correlazione tra i livelli di GRK2 e i valori di pressione arteriosa ed analisi dei parametri dell'outcome materno-fetale

## *DISCUSSIONE*

*Pag. 11-13*

## *BIBLIOGRAFIA*

*Pag. 14-19*

## *LEGENDE*

*Pag. 20-21*

## *FIGURE*

*Pag. 22-27*

## *TABELLE*

*Pag. 28-29*

# INTRODUZIONE

## 1) La patologia ipertensiva in gravidanza e la sindrome preeclamptica

L'ipertensione arteriosa rappresenta il disordine medico più frequente in gravidanza con una prevalenza del 7-13% [1]. La definizione di ipertensione in gravidanza si basa sulla presenza di valori assoluti di pressione arteriosa (PA)  $\geq 140/90$  mmHg con una distinzione in forma lieve quando la PA risulta pari a 140-159/90-109 mmHg e forma severa quando i valori risultano  $\geq 160/110$  mmHg [2]. La patologia ipertensiva in gravidanza non costituisce una singola entità ma comprende lo stato ipertensivo pre-esistente alla gravidanza (PA  $\geq 140/90$  mmHg prima della gravidanza o entro la ventesima settimana di gestazione), l'ipertensione gestazionale (IG: PA  $\geq 140/90$  mmHg dopo la ventesima settimana di gestazione con o senza proteinuria), l'ipertensione pre-esistente con associata ipertensione gestazionale e proteinuria (quando la patologia ipertensiva preesistente si complica dopo la ventesima settimana di gestazione per incremento dei valori pressori e comparsa di proteinuria pari o superiore ai 3 g/die) e lo stato ipertensivo pre-natale non classificabile (quando la prima misurazione in assoluto della PA è eseguita dopo la ventesima settimana di gestazione) [2].

Quando l'ipertensione gestazionale è associata anche ad una proteinuria significativa ( $\geq 300$  mg/24 ore o rilievo di uno stick urinario 2+ o superiore), viene definita preeclampsia (PE) [2].

Nei paesi sviluppati la PE si manifesta nel 2-5% delle gravidanze circa e rappresenta una causa maggiore di morbilità e mortalità materna e perinatale [3, 4]. Alcuni dei fattori di rischio per la PE includono la nulliparità, le

gestazioni multiple, una storia di precedenti gravidanze complicate da preeclampsia, l'obesità, l'insulino-resistenza, il diabete mellito, l'età materna > 40 anni, l'ipertensione arteriosa pre-esistente [5].

Le caratteristiche cliniche della patologia possono manifestarsi sia sul versante materno (ipertensione e proteinuria con o senza ulteriori anomalie multiorgano) che sul versante fetale con un ritardo di crescita intrauterino (IUGR) [6]. Quest'ultimo in realtà può presentarsi anche non associato ad ipertensione gestazionale e preeclampsia ed essere quindi una complicanza della gravidanza in pazienti normotese.

Il meccanismo fisiopatologico alla base della sindrome preeclamptica non è chiaro. Senza alcun dubbio la placenta è l'organo centrale nella patogenesi della malattia dal momento che la sua rimozione ne determina la scomparsa [7]. Un'ipotesi molto accreditata in questi ultimi anni è quella che prevede un'anomalia nel processo di invasione delle cellule citotrofoblastiche nelle arterie spirali (Figura 1) [5]. Durante la normale placentazione le cellule citotrofoblastiche invadono la parete uterina materna prendendo parte alla formazione dello strato muscolare liscio ed endoteliale delle arterie della decidua materna contribuendo in questo modo alla determinazione di un letto vascolare a bassa resistenza [5]. Nella preeclampsia l'invasione delle cellule citotrofoblastiche è incompleta con conseguente formazione di un letto vascolare ad alta resistenza [5]. Tale condizione predisporrebbe la placenta ad un insulto ischemico cronico con conseguente rilascio di mediatori chimici che a loro volta sarebbero responsabili di disfunzione endoteliale e ridotta biodisponibilità di ossido nitrico (Figura 2) [8, 9]. Il danno multiorgano caratteristico della preeclampsia sarebbe appunto legato all'alterazione della funzione endoteliale [9-13].

## 2) Ruolo di GRK2 nell'ipertensione arteriosa essenziale

La chinasi 2 del recettore accoppiato a proteina G (GRK2 o  $\beta$ ARK1) rappresenta un'importante modulatore delle funzioni cellulari. Inizialmente caratterizzata per la sua azione a livello cardiaco, dove è coinvolta nella desensibilizzazione e down-regulation del recettore  $\beta$ -adrenergico ( $\beta$ -AR) cardiaco [14], successivamente sono emerse nuove ed importanti azioni di tale proteina anche in sedi extra cardiache [15, 16]. Tale chinasi risulterebbe infatti coinvolta nella patologia ipertensiva come dimostrato dal suo ruolo nel signaling cellulare responsabile della produzione di ossido nitrico (NO), principale agente vasodilatatore di origine endoteliale [17] e dalla sua azione desensibilizzante sul recettore  $\beta_2$ -adrenergico che, a sua volta, è responsabile di vasodilatazione [18]. I livelli di GRK2 risulterebbero aumentati nella patologia ipertensiva sia in condizioni sperimentali che nell'uomo [19, 20] e una sua inibizione non selettiva con eparina è stata associata ad una migliore risposta vaso-dilatatoria beta adrenergica all'isoproterenolo in vivo, verosimilmente per una riduzione del processo di desensibilizzazione recettoriale [21].

## 3) Ipotesi e obiettivi dello studio

Una relazione tra i livelli di GRK2 e l'alterazione delle risposte vasodilatatorie è stata riscontrata nella patologia ipertensiva umana. In questo studio abbiamo ipotizzato che tale associazione possa essere presente anche nel tessuto placentare di donne affette da ipertensione gestazionale e preeclampsia. Per vagliare tale ipotesi abbiamo analizzato i livelli di GRK2 nelle arterie ombelicali di donne con gravidanza complicata da patologia ipertensiva.

## **METODI**

### 1) Disegno dello studio e caratteristiche della popolazione analizzata

In questo studio sono state arruolate, in modo consecutivo, durante un periodo di osservazione di due anni (a partire da Gennaio 2008), 23 gravide normotese senza storia di precedente patologia ipertensiva e 21 donne con gravidanza complicata da ipertensione (13 affette da PE e 8 da IG) ricoverate presso l'Unità delle Gravidanze a Rischio del Dipartimento di Ginecologia ed Ostetricia dell'Università Federico II di Napoli. Tutte le pazienti hanno fornito il loro consenso informato prima dell'arruolamento e lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università Federico II.

La popolazione oggetto dello studio comprendeva inoltre 5 donne con IUGR non associato ad aumento dei valori pressori. La definizione della patologia ipertensiva in gravidanza è stata attuata, come sopra indicato, secondo le linee guida internazionali [2]. La condizione di IUGR è stata definita in base ai seguenti criteri: misurazione ultrasonografica della circonferenza addominale fetale inferiore al 10-mo percentile e indice di pulsatilità dell'arteria ombelicale (PI) superiore al 95-esimo percentile [22]. Come indice di outcome nella popolazione affetta da PE abbiamo impiegato l'età gestazionale al momento del parto definendo un gruppo con PE precoce ed uno con PE tardiva rispettivamente per un parto avvenuto prima o dopo la 34-esima settimana [23, 24].

## 2) Isolamento delle arterie ombelicali e valutazione di GRK2 mediante western blot

Segmenti di arteria ombelicale di 2-3 cm sono stati raccolti dopo parto cesareo elettivo o in emergenza mediante incisione della gelatina di Wharton. I campioni così ottenuti sono stati congelati a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al giorno del dosaggio proteico. Per ottenere l'estratto proteico totale i campioni sono stati successivamente scongelati e lisati in un buffer (RIPA-SDS) contenente 50 mmol/L di Tris-HCL (pH 7.5), 150 mmol/L di NaCL 1%, NP-40, deossicolato 0.25% e sodio ortovanadato 9.4 mg/50 ml [25]. I campioni sono quindi stati analizzati con la tecnica del Western Blot. Le proteine sono state cioè separate mediante elettroforesi su SDS/PAGE e trasferite su nitrocellulosa. L'espressione di GRK2 è stata determinata con l'impiego di uno specifico anticorpo primario (Santa Cruz Biotechnology, 1/1000) e di un anticorpo secondario anti-mouse coniugato con un sistema di detezione basato sulla perossidasi di rafano (Santa Cruz Biotechnology, 1/2000) mediante chemiluminescenza standard (PIERCE). L'analisi densitometrica è stata eseguita mediante software dedicato (Image Quant Molecular Diagnostic). I livelli della proteina sono stati corretti sull'espressione dell'actina (Unità Densitometriche Arbitrarie, ADU).

## 3) Valutazione funzionale mediante $\beta$ binding recettoriale

Poiché livelli aumentati di GRK2 si associano a desensibilizzazione e down-regulation dei recettori  $\beta$ -adrenergici ( $\beta$ -ARs) abbiamo valutato la densità di tali recettori a livello delle arterie ombelicali. Frazioni di membrana ottenute come descritto precedentemente [26] sono state impiegate per studi di legame con radioligandi dei  $\beta$ -ARs utilizzando il ligando antagonista non selettivo dei  $\beta$ -ARs [ $^{125}\text{I}$ ]-Cyanopindololo ( $^{125}\text{I}$ -CYP). Il legame massimale è

stato misurato impiegando una quantità di  $^{125}\text{I-CYP}$  che saturava i recettori su  $25\mu\text{g}$  di proteine isolate. Il legame è stato realizzato per 1 ora a  $37^\circ\text{C}$ , come precedentemente descritto [26]. L'aggiunta di  $10\mu\text{M}$  di Alprenololo definiva il legame non specifico. L'analisi è stata eseguita per 7 pazienti con gravidanza complicata e 11 pazienti con gravidanza non complicata.

#### 4) Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita con il software SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). I valori sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard (ES). Il test Chi-quadro è stato eseguito per le variabili categoriche mentre il test ANOVA è stato impiegato per le variabili continue. Per quest'ultime sono stati anche eseguiti il test di correlazione (Pearson) e di regressione lineare. Tutte le analisi sono state eseguite con un modello a due code impiegando un valore di  $P < 0,05$  per definire la significatività statistica. I parametri di outcome materno-fetali considerati sono: età gestazionale al momento del parto, proteinuria, peso del neonato alla nascita e indice di pulsatilità dell'arteria ombelicale.



# RISULTATI

## 1) Caratteristiche cliniche della popolazione analizzata

Le caratteristiche cliniche della popolazione analizzata sono evidenziate in Tabella 1 e 2. Tutte le donne erano di razza bianca. 11 hanno sviluppato PE (7 delle quali con IUGR associato), 7 IG (4 delle quali con IUGR associato) e 3 avevano una condizione ipertensiva preesistente. Il gruppo di donne con gravidanza fisiologica era del tutto confrontabile per dati anamnestici e parametri antropomorfici al gruppo di donne con gravidanza complicata. Tutte le pazienti non erano in travaglio al momento dell'arruolamento e tutte hanno partorito con taglio cesareo in elezione o in urgenza.

## 2) Livelli di GRK2 e densità dei recettori $\beta$ adrenergici

I livelli di GRK2 erano più alti nel gruppo di donne ipertese quando confrontati sia con il gruppo di normotese ( $0.83 \pm 0.14$  vs  $0.48 \pm 0.06$ , unità densitometriche;  $p < 0.05$ ) che con il gruppo IUGR ( $0.83 \pm 0.14$  vs  $0.39 \pm 0.16$ , unità densitometriche;  $p < 0.05$ , Figura 3). I livelli di GRK2 nelle donne con IUGR non risultavano differenti rispetto al gruppo di donne normotese.

Da un punto di vista funzionale abbiamo osservato una maggiore down-regulation dei  $\beta$ -ARs nelle gravide ipertese ( $n=7$ ) rispetto alle normotese ( $n=11$ ) ( $7.73 \pm 1.36$  verso  $20.96 \pm 7.57$  pmol/ $\mu$ g,  $p < 0.05$ ; Figura 4).

### 3) Correlazione tra i livelli di GRK2 e i valori di pressione arteriosa ed analisi dei parametri dell'outcome materno-fetale

I livelli di GRK2 sono risultati associati con i valori di pressione arteriosa sistolica, diastolica e media nei test di correlazione di Pearson ( $p < 0.05$ ) e di regressione lineare ( $p < 0.05$ ; Figura 5).

Nessun parametro dell'outcome materno-fetale (proteinuria, età gestazionale al momento del parto, indice di pulsatilità e peso alla nascita) è risultato in correlazione con i livelli di GRK2.

I livelli di GRK2 sono risultati essere però un predittore di PE precoce (età gestazionale al momento del parto  $< 34$ -esima settimana). Infatti in tale gruppo di pazienti ( $N=7$ ) i livelli di GRK2 sono risultati più bassi rispetto al gruppo con PE tardiva ( $N=14$ ;  $0.51 \pm 0.12$  verso  $1.08 \pm 0.20$ , unità densitometriche;  $p < 0.05$ , Figura 6).

## DISCUSSIONE

Questo studio non solo è il primo a mettere in evidenza una differenza dei livelli di GRK2 nelle arterie ombelicali di donne gravide affette da disordini ipertensivi ma è anche il primo ad aver dimostrato l'espressione di tale chinasi nelle arterie ombelicali. Precedentemente era stata descritta la presenza di GRK2 nel miometrio, con livelli di tale chinasi che aumentano durante la gravidanza fisiologica [27-29]. Il nostro studio ha evidenziato per la prima volta un aumento dei livelli di GRK2 nell'ipertensione gestazionale suggerendo un ruolo funzionale di tale proteina nel letto vascolare ombelicale. L'aumento di GRK2 si associa ad una riduzione dei livelli del recettore  $\beta$ -AR ed un simile risultato è stato evidenziato in soggetti affetti da ipertensione essenziale [30] dove peraltro tale modificazione funzionale si associa ad un aumento delle resistenze vascolari. Diversi studi hanno dimostrato che GRK2 è associata ad incremento delle resistenze vascolari, caratteristica chiave della patologia ipertensiva, attraverso eventi di fosforilazione dei recettori accoppiati a proteina G (GPCRs) [19, 21]. Un altro possibile meccanismo con il quale tale chinasi determinerebbe incremento delle resistenze vascolari si basa sull'interazione con la molecola Akt, regolatore chiave della ossido nitrico sintetasi endoteliale (eNOS) e di conseguenza della produzione del potente agente vasodilatatore ossido nitrico (NO). GRK2 sarebbe in grado di inibire la produzione di NO attraverso un'inibizione di Akt come dimostrato nei sinusoidi epatici dove, con tale meccanismo, sarebbe in grado di determinare ipertensione portale [17]. Nel nostro studio abbiamo ipotizzato che GRK2 potesse essere responsabile delle aumentate resistenze vascolari presenti nelle arterie ombelicali di gravidanze complicate da ipertensione. Per testare tale ipotesi abbiamo ricercato una correlazione tra i livelli della chinasi e un parametro che esprime appunto le resistenze placentari, l'indice di pulsatilità. Tale

correlazione non è stata riscontrata nel nostro studio motivo per il quale GRK2 non sembrerebbe un fattore causale degli elevati livelli pressori presenti nelle gravidanze complicate da ipertensione. Abbiamo quindi ipotizzato che GRK2 aumenti in risposta all'aumento dei valori pressori per compensare un'eccessiva tensione vascolare. In questo senso il suo ruolo sul processo di desensibilizzazione e down-regulation del recettore  $\beta$ -AR sarebbe visto come protettivo. A supporto di tale ipotesi ci sono i dati evidenziati nel gruppo di donne preeclampatiche dove coloro che partoriscono prima della 34-esima settimana, espressione di una forma grave di patologia, presentano appunto livelli più bassi di GRK2. Tale ruolo protettivo della chinasi può essere spiegato dalle recenti scoperte sul coinvolgimento di tale proteina sul metabolismo cellulare. Recentemente è stato dimostrato che GRK2 riduce l'up-take di glucosio [31] ed il consumo di ATP, ponendo la cellula in uno stato di basso livello energetico che ne favorirebbe la sopravvivenza in condizioni di stress [32].

La funzione del recettore  $\beta$ -AR è stata studiata in gravidanza ma il suo ruolo nell'arteria ombelicale appare controverso [33-35]. E' stata sostenuta l'ipotesi che la disfunzione adrenergica della PE possa essere legata al signaling del recettore  $\beta$ -AR. Tuttavia un'alterazione del meccanismo di segnale non è mai stata indagata. Aumentati livelli di GRK2 potrebbero favorire meccanismi di segnale indipendenti dal cAMP e dipendenti invece dalla  $\beta$ -arrestina in risposta alla stimolazione  $\beta$ -adrenergica [36]. Le GRKs sono state inoltre riscontrate nel miometrio dove sono coinvolte nel meccanismo di contrazione uterina sia in modelli in vitro che in modelli sperimentali animali [28, 29]. Questi risultati mostrano che durante il parto il miometrio presenta elevati livelli di GRK2 in risposta ad un'intensa stimolazione dei GPCRs come ad esempio il recettore istaminico H1. I nostri risultati sono originali perché analizzano i livelli di GRK2 in una differente sede (arteria ombelicale) dell'unità materno-fetale e perché le nostre donne non erano in travaglio al momento dell'arruolamento per cui è

improbabile che ci siano fattori confondenti sulla nostra analisi. Il ritardo di crescita intrauterino, l'ipertensione gestazionale e la preeclampsia hanno comuni caratteristiche patogenetiche [37]. In questo studio i livelli di GRK2 non risultano modificati nelle gravidanze con IUGR isolato. Questo dato rappresenta un ulteriore contributo all'ipotesi dell'associazione, in senso protettivo, di GRK2 con elevati valori pressori nella PE.

Il limite più importante dello studio è costituito dalla piccola numerosità del campione e dalla sua eterogeneità. Un campione più grande è necessario per valutare la risposta materna all'ipertensione ed allo sviluppo di preeclampsia testando ad esempio i livelli di GRK2 nel sangue materno. È stato infatti dimostrato in precedenti studi una correlazione tra i livelli di GRK2 nei linfociti circolanti nel sangue periferico e i livelli tissutali della chinasi [38].

Un altro limite da sottolineare è che l'analisi dei livelli proteici è stata compiuta sulla componente vascolare fetale più che materna, che rappresenta invece, come dimostrato in diversi studi, il sito dove si realizza la principale anomalia responsabile del ridotto apporto di sangue caratteristico della PE cioè, l'incompleto rimodellamento delle arterie spirali con generazione di un letto vascolare ad alta resistenza [39]. È necessario inoltre meglio definire il ruolo di GRK2 come fattore indicativo della disfunzione endoteliale caratteristica della PE oppure come molecola spia di un meccanismo di protezione fetale in risposta ad un incremento delle resistenze vascolari placentari.

GRK2 inoltre non è stata studiata sui linfociti materni del sangue periferico. Tale analisi consentirebbe uno studio dei livelli proteici nelle diverse fasi della gravidanza fornendo uno strumento per scopi diagnostici e/o terapeutici.

## BIBLIOGRAFIA

1. **Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy.** American journal of obstetrics and gynecology 2000, 183(1):S1-S22.
2. Regitz-Zagrosek V, Blomstrom Lundqvist C, Borghi C, Cifkova R, Ferreira R, Foidart JM, Gibbs JS, Gohlke-Baerwolf C, Gorenek B, Iung B et al: **ESC Guidelines on the management of cardiovascular diseases during pregnancy: the Task Force on the Management of Cardiovascular Diseases during Pregnancy of the European Society of Cardiology (ESC).** European heart journal, 32(24):3147-3197.
3. **WHO. Make every mother and child count. World Health Report 2005.** WHO: Geneva 2005.
4. **Why Mothers Die 2000-2002. The confidential enquiries into maternal deaths in the United Kingdom.** RCOG: London. 2004.
5. Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA: **Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease.** Circulation, 123(24):2856-2869.
6. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M: **Pre-eclampsia.** Lancet 2005, 365(9461):785-799.
7. Matsuo K, Kooshesh S, Dinc M, Sun CC, Kimura T, Baschat AA: **Late postpartum eclampsia: report of two cases managed by uterine curettage and review of the literature.** American journal of perinatology 2007, 24(4):257-266.
8. Khalil RA, Granger JP: **Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models.** American journal of physiology 2002, 283(1):R29-45.
9. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH et al: **Circulating**

**angiogenic factors and the risk of preeclampsia.** N Engl J Med 2004, 350(7):672-683.

10. Bolte AC, van Geijn HP, Dekker GA: **Pathophysiology of preeclampsia and the role of serotonin.** Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2001, 95(1):12-21.

11. Carty DM, Delles C, Dominiczak AF: **Novel biomarkers for predicting preeclampsia.** Trends Cardiovasc Med 2008, 18(5):186-194.

12. George EM, Granger JP: **Endothelin: key mediator of hypertension in preeclampsia.** American journal of hypertension, 24(9):964-969.

13. Bolin M, Wiberg-Itzel E, Wikstrom AK, Goop M, Larsson A, Olovsson M, Akerud H: **Angiopoietin-1/angiopoietin-2 ratio for prediction of preeclampsia.** American journal of hypertension 2009, 22(8):891-895.

14. Penela P, Murga C, Ribas C, Tutor AS, Peregrin S, Mayor F, Jr.: **Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease.** Cardiovasc Res 2006, 69(1):46-56.

15. Campanile A, Iaccarino G: **G-protein-coupled receptor kinases in cardiovascular conditions: focus on G-protein-coupled receptor kinase 2, a gain in translational medicine.** Biomarkers in medicine 2009, 3(5):525-540.

16. Ciccarelli M, Cipolletta E, Iaccarino G: **GRK2 at the control shaft of cellular metabolism.** Current pharmaceutical design, 18(2):121-127.

17. Liu S, Premont RT, Kontos CD, Zhu S, Rockey DC: **A crucial role for GRK2 in regulation of endothelial cell nitric oxide synthase function in portal hypertension.** Nature medicine 2005, 11(9):952-958.

18. Iaccarino G, Cipolletta E, Fiorillo A, Anecchiarico M, Ciccarelli M, Cimini V, Koch WJ, Trimarco B: **Beta(2)-adrenergic receptor gene delivery to the endothelium corrects impaired adrenergic vasorelaxation in hypertension.** Circulation 2002, 106(3):349-355.

19. Eckhart AD, Ozaki T, Tevaearai H, Rockman HA, Koch WJ: **Vascular-targeted overexpression of G protein-coupled receptor kinase-2 in transgenic mice attenuates beta-adrenergic receptor signaling and increases resting blood pressure.** *Molecular pharmacology* 2002, 61(4):749-758.
20. Gros R, Benovic JL, Tan CM, Feldman RD: **G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension.** *The Journal of clinical investigation* 1997, 99(9):2087-2093.
21. Izzo R, Cipolletta E, Ciccarelli M, Campanile A, Santulli G, Palumbo G, Vasta A, Formisano S, Trimarco B, Iaccarino G: **Enhanced GRK2 expression and desensitization of betaAR vasodilatation in hypertensive patients.** *Clin Transl Sci* 2008, 1(3):215-220.
22. Melchiorre K, Leslie K, Prefumo F, Bhide A, Thilaganathan B: **First-trimester uterine artery Doppler indices in the prediction of small-for-gestational age pregnancy and intrauterine growth restriction.** *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009, 33(5):524-529.
23. Napolitano R, Santo S, D'Souza R, Bhide A, Thilaganathan B: **Sensitivity of higher, lower and mean second-trimester uterine artery Doppler resistance indices in screening for pre-eclampsia.** *Ultrasound Obstet Gynecol*, 36(5):573-576.
24. Napolitano R, Rajakulasingam R, Memmo A, Bhide A, Thilaganathan B: **Uterine artery Doppler screening for pre-eclampsia: comparison of the lower, mean and higher first-trimester pulsatility indices.** *Ultrasound Obstet Gynecol*, 37(5):534-537.
25. Iaccarino G, Ciccarelli M, Sorriento D, Cipolletta E, Cerullo V, Iovino GL, Paudice A, Elia A, Santulli G, Campanile A et al: **AKT participates in endothelial dysfunction in hypertension.** *Circulation* 2004, 109(21):2587-2593.



26. Iaccarino G, Barbato E, Cipolletta E, Esposito A, Fiorillo A, Koch WJ, Trimarco B: **Cardiac betaARK1 upregulation induced by chronic salt deprivation in rats.** Hypertension 2001, 38(2):255-260.
27. Brenninkmeijer CB, Price SA, Lopez Bernal A, Phaneuf S: **Expression of G-protein-coupled receptor kinases in pregnant term and non-pregnant human myometrium.** The Journal of endocrinology 1999, 162(3):401-408.
28. Simon V, Mhaouty-Kodja S, Legrand C, Cohen-Tannoudji J: **Concomitant increase of G protein-coupled receptor kinase activity and uncoupling of beta-adrenergic receptors in rat myometrium at parturition.** Endocrinology 2001, 142(5):1899-1905.
29. Willets JM, Taylor AH, Shaw H, Konje JC, Challiss RA: **Selective regulation of H1 histamine receptor signaling by G protein-coupled receptor kinase 2 in uterine smooth muscle cells.** Molecular endocrinology (Baltimore, Md 2008, 22(8):1893-1907.
30. Cohn HI, Xi Y, Pesant S, Harris DM, Hyslop T, Falkner B, Eckhart AD: **G protein-coupled receptor kinase 2 expression and activity are associated with blood pressure in black Americans.** Hypertension 2009, 54(1):71-76.
31. Cipolletta E, Campanile A, Santulli G, Sanzari E, Leosco D, Campiglia P, Trimarco B, Iaccarino G: **The G protein coupled receptor kinase 2 plays an essential role in beta-adrenergic receptor-induced insulin resistance.** Cardiovascular research 2009, 84(3):407-415.
32. Fusco A, Santulli G, Sorriento D, Cipolletta E, Garbi C, Dorn GW, 2nd, Trimarco B, Feliciello A, Iaccarino G: **Mitochondrial localization unveils a novel role for GRK2 in organelle biogenesis.** Cellular signalling, 24(2):468-475.
33. Aune B, Vartun A, Oian P, Sager G: **Evidence of dysfunctional beta2-adrenoceptor signal system in pre-eclampsia.** Bjog 2000, 107(1):116-121.

34. Rouget C, Barthez O, Goirand F, Leroy MJ, Breuiller-Fouche M, Rakotoniaina Z, Guerard P, Morcillo EJ, Advenier C, Sagot P et al: **Stimulation of the ADRB3 adrenergic receptor induces relaxation of human placental arteries: influence of preeclampsia.** *Biology of reproduction* 2006, 74(1):209-216.
35. Hynes PG, Friel AM, Smith TJ, Morrison JJ: **Beta-adrenoceptor subtype expression in human placenta and umbilical arteries in normal and preeclamptic pregnancies.** *Hypertens Pregnancy* 2008, 27(2):169-181.
36. Lefkowitz RJ: **Seven transmembrane receptors: something old, something new.** *Acta physiologica (Oxford, England)* 2007, 190(1):9-19.
37. Villar J, Carroli G, Wojdyla D, Abalos E, Giordano D, Ba'aqeel H, Farnot U, Bergsjö P, Bakketeig L, Lumbiganon P et al: **Preeclampsia, gestational hypertension and intrauterine growth restriction, related or independent conditions?** *American journal of obstetrics and gynecology* 2006, 194(4):921-931.
38. Iaccarino G, Barbato E, Cipolletta E, De Amicis V, Margulies KB, Leosco D, Trimarco B, Koch WJ: **Elevated myocardial and lymphocyte GRK2 expression and activity in human heart failure.** *European heart journal* 2005, 26(17):1752-1758.
39. Staff AC, Dechend R, Pijnenborg R: **Learning from the placenta: acute atherosclerosis and vascular remodeling in preeclampsia-novel aspects for atherosclerosis and future cardiovascular health.** *Hypertension*, 56(6):1026-1034.

## LEGENDE

*FIGURA 1, da [5]: processo di placentazione durante gravidanza fisiologica e nella preeclampsia.*

Durante la normale placentazione (in alto) le cellule citotrofoblastiche di derivazione fetale invadono le arterie spirali materne trasformando queste ultime in vasi a bassa resistenza ed alta capacit anza per garantire un adeguato apporto di nutrienti al feto. Durante tale fenomeno le cellule citotrofoblastiche perdono il fenotipo epiteliale per acquisire un fenotipo endoteliale in un processo definito pseudovasculogenesi.

Nella preeclampsia (in basso) le cellule citotrofoblastiche invadono le arterie spirali in modo parziale determinando cos  la persistenza di un letto vascolare ad elevata resistenza.

*FIGURA 2, da [8]: modificazioni vascolari durante una gravidanza normale ed in corso di preeclampsia.*

Durante una gravidanza fisiologica (a sinistra) si verifica un aumento dell'attivit  della ossido nitrico sintetasi (NOS) e della cicloossigenasi (COX) con conseguente aumento del rilascio di ossido nitrico (NO) e prostaciline (PGI<sub>2</sub>). Entrambe le molecole determinano vasodilatazione per rilassamento della muscolatura liscia.

Nella preeclampsia (a destra) si verifica la secrezione di citochine che inibiscono la produzione dei fattori endoteliali ad azione vasodilatatoria con conseguente riduzione del rilassamento della muscolatura liscia. Tali citochine inoltre stimolano la produzione di sostanze ad azione vaso costringitiva come l'endotelina (ET-1) ed il trombossano (TXA<sub>2</sub>) determinando quindi come risultato finale un incremento delle resistenze vascolari e della pressione arteriosa.

*FIGURA 3:* analisi densitometrica dei western blot eseguiti su arterie ombelicali di differenti gruppi di pazienti.

I livelli di GRK2 sono stati corretti con quelli di actina ed espressi come unità densitometriche. I livelli di GRK2 per ciascun gruppo sono espressi come media  $\pm$  ES. (\* $p < 0.05$  verso le normotese).

CDU: unità densitometriche corrette; IUGR: ritardo di crescita intrauterino, GRK2: chinasi 2 del recettore accoppiato a proteina G, ES: errore standard.

*FIGURA 4:* analisi della densità dei recettori  $\beta$ -ARs.

I dati sono espressi come media  $\pm$  ES. (\* $p < 0.05$ ).  $\beta$ -ARs: recettori  $\beta$  adrenergici.

*FIGURA 5:* analisi di regressione lineare dei parametri di pressione arteriosa con i livelli di GRK2.

(a) Analisi di regressione lineare tra pressione arteriosa sistolica e i livelli di GRK2 ( $r_2 = 0.12$ ,  $p < 0.05$ ); (b) analisi di regressione lineare tra pressione arteriosa diastolica e i livelli di GRK2 ( $r_2 = 0.11$ ,  $p < 0.05$ ); (c) analisi di regressione lineare tra pressione arteriosa media e i livelli di GRK2 ( $r_2 = 0.12$ ,  $p < 0.05$ ).

GRK2: chinasi 2 del recettore accoppiato a proteina G.

*FIGURA 6:* livelli di GRK2 in donne affette da PE precoce e PE o IG tardiva. I livelli di GRK2 sono espressi come media  $\pm$  ES delle unità densitometriche. (\* $p < 0.05$ ).

CDU: unità densitometriche corrette; PE: preeclampsia, IG: ipertensione gestazionale. La PE precoce è definita in relazione all'età gestazionale del parto (prima della 34-esima settimana).

FIGURA 1.

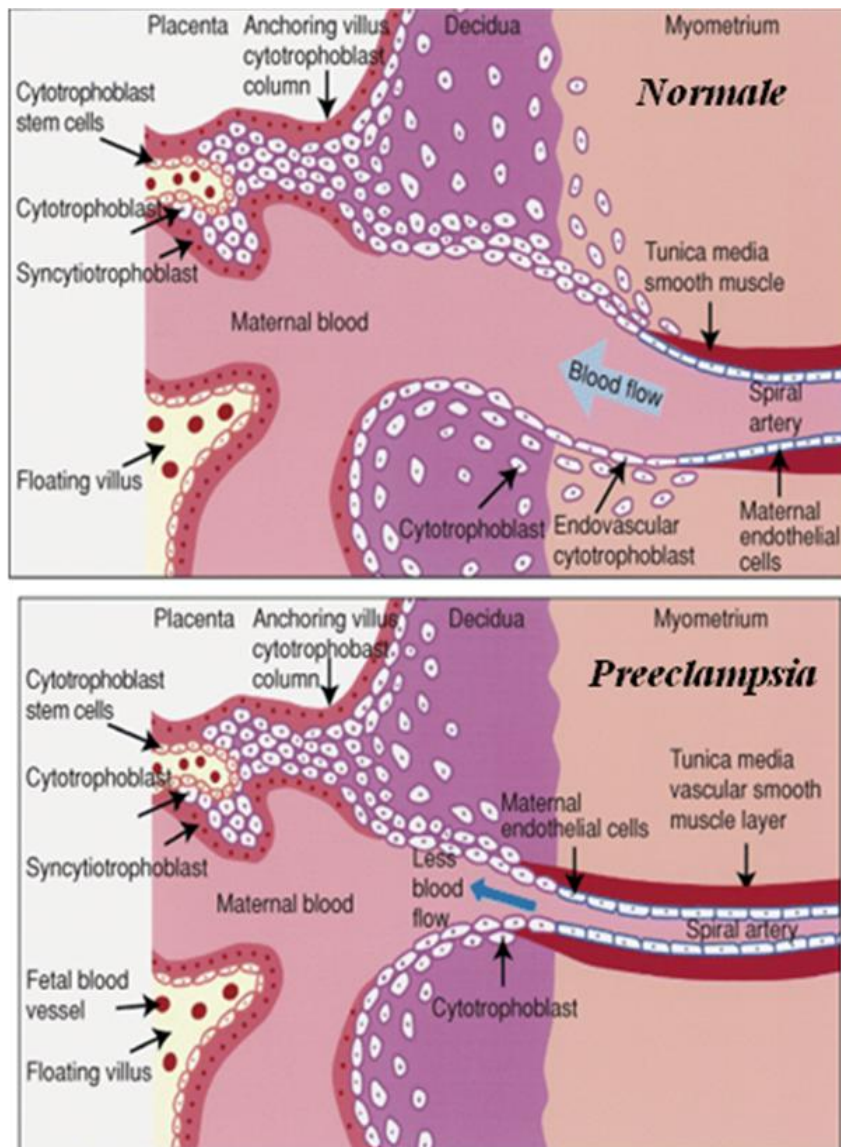


FIGURA 2.

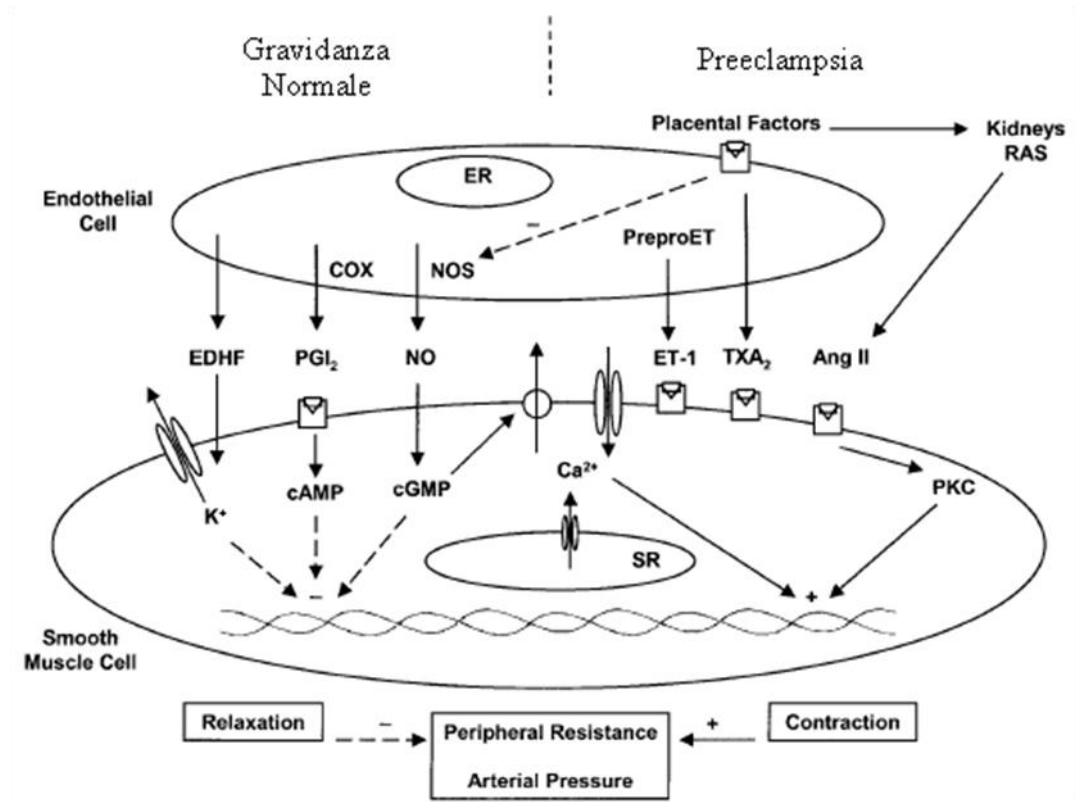


FIGURA 3.

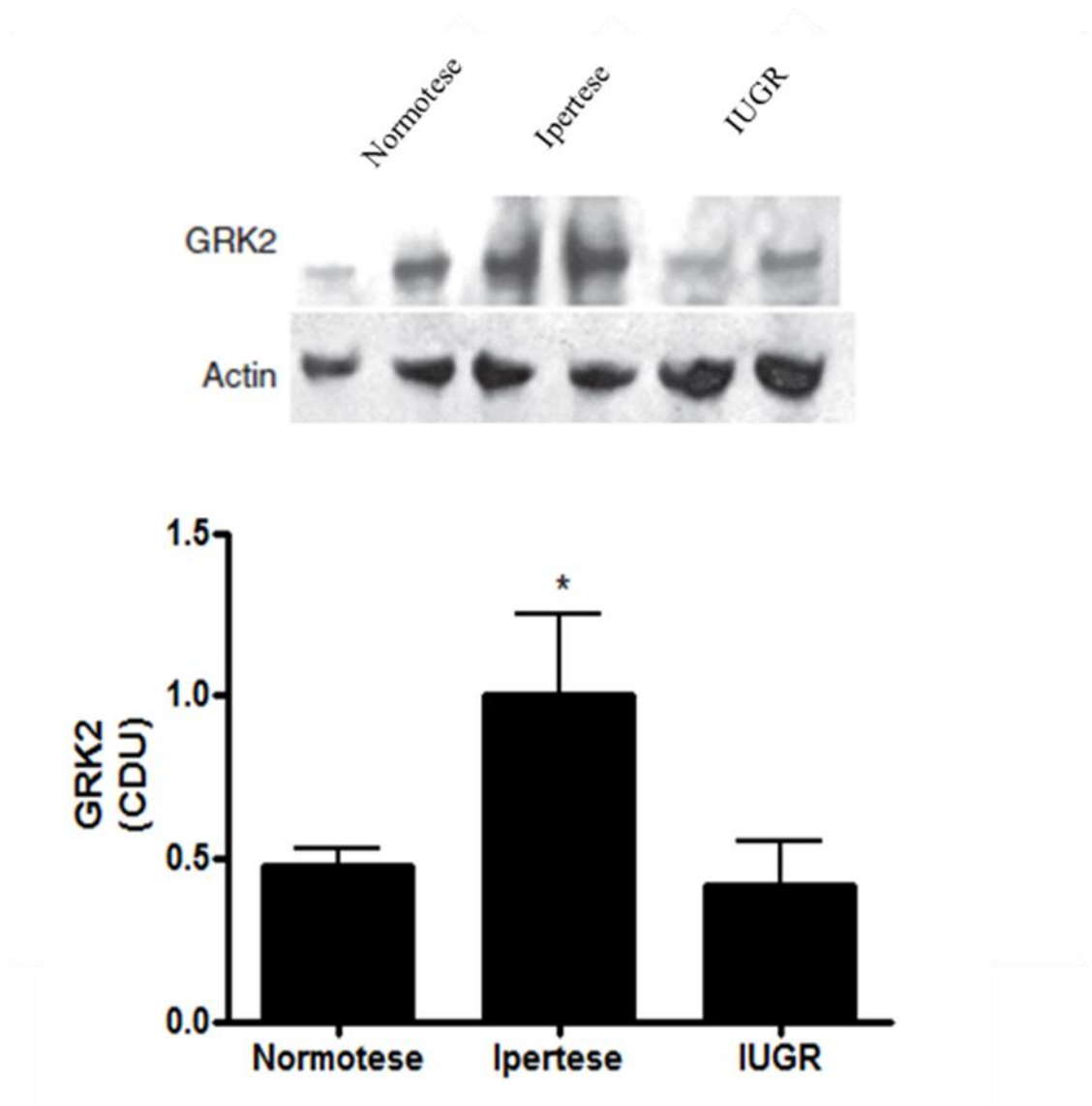


FIGURA 4.

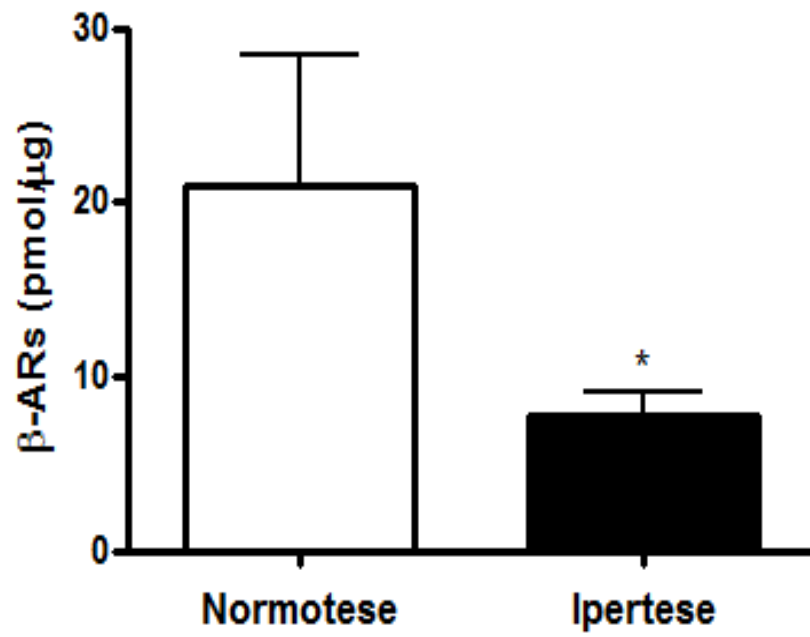




FIGURA 5.

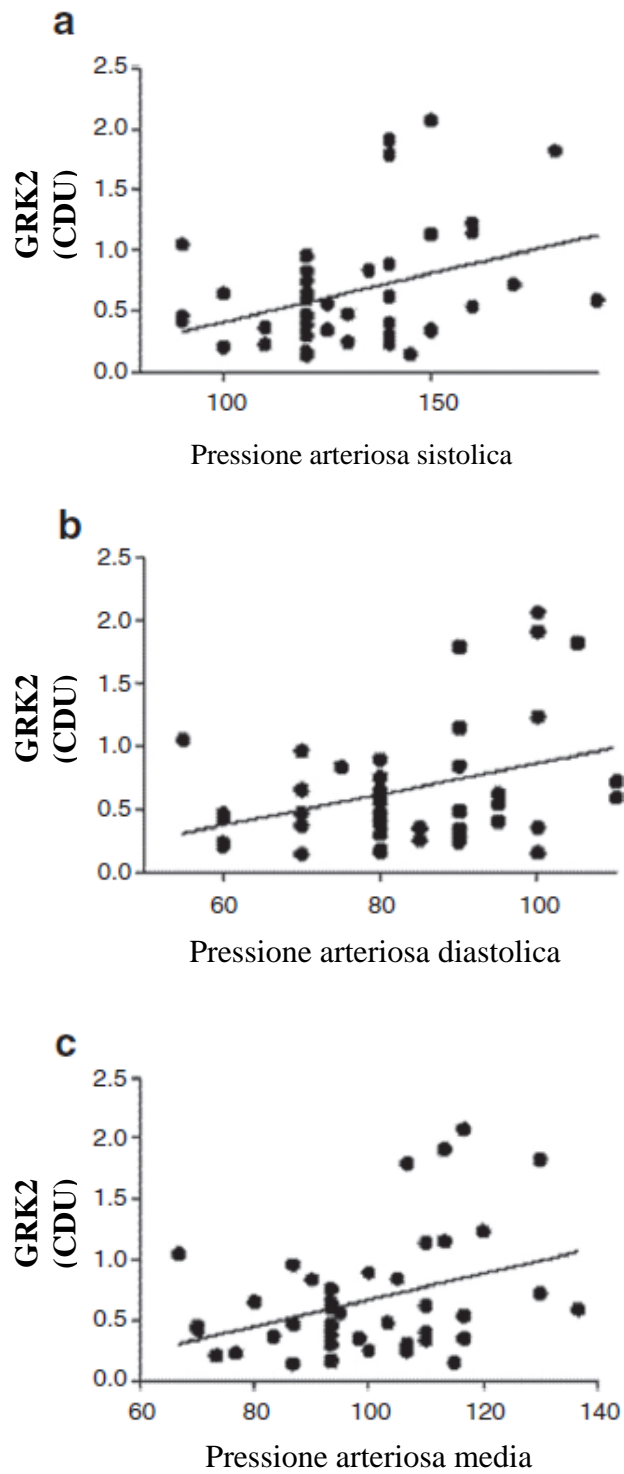
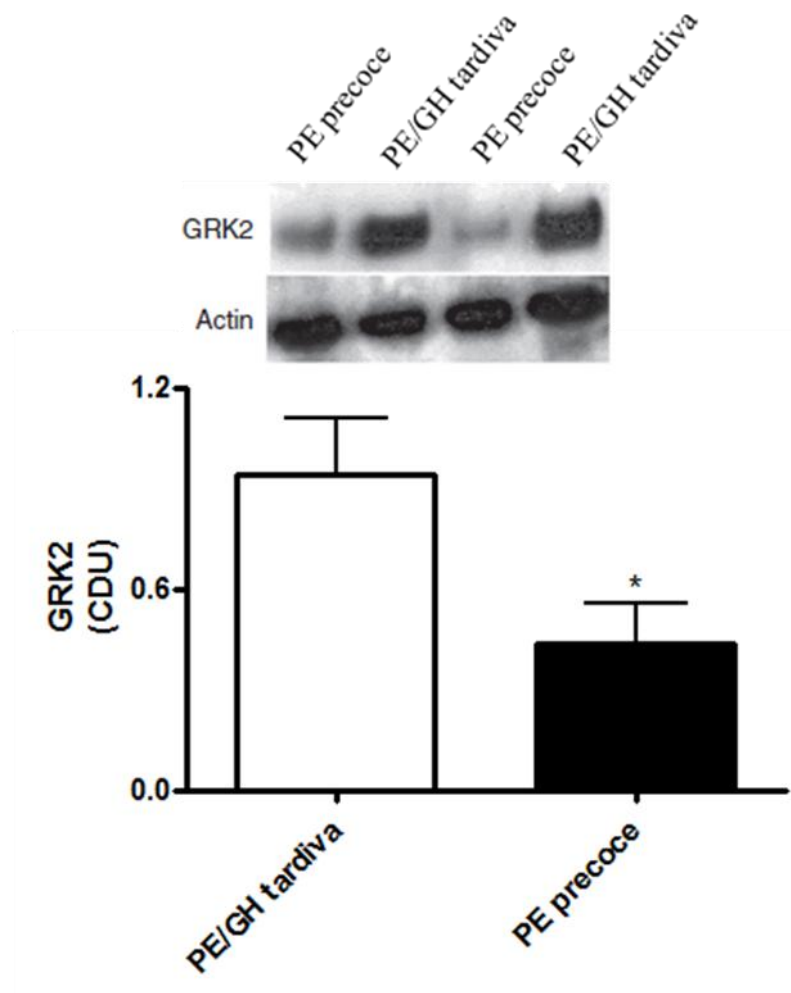


FIGURA 6.



**Tabella 1-Caratteristiche cliniche della popolazione analizzata**

| <i>Caratteristiche<br/>Media (ES)/n %</i>               | <i>PE/IG</i> | <i>PE precoce</i> | <i>PE tardiva/IG</i> | <i>IUGR</i> | <i>Normotese</i> | <i>P</i> |
|---|--------------|-------------------|----------------------|-------------|------------------|----------|
| <i>Donne</i>  | 21           | 7                 | 14                   | 5           | 23               | NS       |
| <i>Età materna (anni)</i>                               | 33 (1)       | 30 (3)            | 32 (3)               | 28 (3)      | 32 (1)           | NS       |
| <i>Peso (Kg)</i>  | 66 (3)       | 68 (7)            | 65 (4)               | 56 (2.7)    | 63 (2)           | NS       |
| <i>Altezza (m)</i>                                      | 1.6 (0)      | 1.6 (0)           | 1.6 (0)              | 1.6 (0)     | 1.6 (0)          | NS       |
| <i>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</i>                           | 26 (6)       | 26 (7)            | 24 (5)               | 21 (1)      | 24 (1)           | NS       |
| <i>Nullipare</i>  | 18 (86)      | 7 (100)           | 11 (79)              | 5 (100)     | 20 (87)          | NS       |
| <i>Fumatrici</i>  | 0 (0)        | 0 (0)             | 0 (0)                | 1 (20)      | 1 (4)            | NS       |
| <i>Condizioni cliniche<br/>preesistenti<sup>a</sup></i> | 4 (19)       | 1 (14)            | 3 (21)               | 0 (0)       | 0 (0)            | NS       |
| <i>Precedenti gravidanze<br/>complicate<sup>b</sup></i> | 2 (9)        | 2 (29)            | 0 (0)                | 0 (0)       | 2 (9)            | NS       |

**IMC:** indice di massa corporea

<sup>a</sup> ipertensione cronica, malattie renali, trombofilia

<sup>b</sup> morte fetale intrauterina, preeclampsia, ipertensione gestazionale, sindrome HELLP, distacco parziale o completo della placenta, parto prematuro

**Tabella 2-Caratteristiche cliniche e parametri dell'outcome materno-fetale**

| <i>Caratteristiche<br/>Media (ES)/n%</i>          | <i>PE/IG</i>   | <i>PE precoce</i> | <i>PE tardiva/IG</i> | <i>IUGR</i> | <i>Normotese</i> |
|---|----------------|-------------------|----------------------|-------------|------------------|
| <i>Donne</i>                                      | 21             | 7                 | 14                   | 5           | 23               |
| <i>Pressione arteriosa sistolica<br/>(mmHg)</i>   | 149 (4)*,**    | 149 (8)*,**       | 149 (4)*,**          | 115 (4)     | 115 (3)          |
| <i>Pressione arteriosa diastolica<br/>(mmHg)</i>  | 94 (2)*,**     | 91 (4)*,**        | 96 (2)*,**           | 72 (8)      | 74 (2)           |
| <i>Proteinuria (mg/24 ore)</i>                    | 1356 (480)*,** | 1771 (1223)*,**   | 1148 (420)*,**       | 160 (40)    | 110 (4)          |
| <i>Età gestazionale al parto<br/>(settimane)</i>  | 34 (1)*        | 31 (1)*           | 36 (1)*              | 33 (4)*     | 39 (0)           |
| <i>Peso del neonato alla nascita<br/>(grammi)</i> | 1833 (199)     | 1104 (147)*       | 2198 (235)*          | 1402 (296)* | 3010 (91)        |
| <i>Complicazioni ostetriche<sup>a</sup></i>       | 1 (0)          | 1 (0)             | 0 (0)                | 0 (20)      | 0 (0)            |

<sup>a</sup> distacco di placenta (n=1)

\*p<0.05 verso gruppo normotese, \*\*p<0.05 verso gruppo IUGR