

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

SINALIZAÇÃO DA Akt/PKB EM PLACENTA, MÚSCULO ESQUELÉTICO E TECIDO
ADIPOSO DE MULHERES COM PRÊ-ECLÂMPSIA

RAFAEL BUENO ORCY

Orientador Prof. Dr. Edison Capp

Co-orientador Prof^a. Dr^a. Helena von Eye Corleta

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia, UFRGS, como requisito para obtenção
do grau de Doutor.

Porto Alegre, outubro de 2007

AGRADECIMENTOS

Agradeço, inicialmente, ao Prof. Dr. Edison Capp, orientador desta tese por oportunizar-me, nesses sete anos de convívio, contínuo crescimento pessoal e intelectual. Também, por me proporcionar nesse doutorado a excelente e inesquecível experiência de viver e trabalhar na Alemanha junto a uma equipe de pesquisadores altamente capacitados. Por sua competência e responsabilidade em liderar com justiça e bom senso nosso grupo de pesquisa. E por muitas vezes orientar-me não só nessa tese, mas nos caminhos a serem tomados para minha vida.

Agradeço a Profa. Dra Helena von Eye Corleta co-orientadora dessa tese, pelo apoio fundamental para conclusão dessa. Pelas discussões e comentários que certamente contribuíram e enriqueceram muito minha formação. Pela amizade e por estar sempre disposta a ajudar-me.

Agradeço ao Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva por “adotar-me” como orientado, por acompanhar-me desde o início de minha caminhada pós-graduação, pela confiança creditada em minha pessoa, pelos ensinamentos, amizade e incentivo, fundamentais durante o desenvolvimento dessa tese.

Agradeço ao Dr. Wolfgang Schechinger por me receber com muita amizade na Alemanha, por seus ensinamentos e companheirismo. Por tornar os 11 meses em que estive em seu convívio um período muito agradável e produtivo.

À eficiente equipe composta por Mateus Reche, Pedro Piccinini, Renata Pedrini e Sabrina Schoroeder pela eficiente coleta de amostras e dados incluídos nessa tese.

Agradeço aos pesquisadores do laboratório chefiado pelo Prof. Dr. Harald Klein, Christine, Sandra, Brian, Christoph e Eva pelo agradável convívio.

Gostaria de agradecer aos colegas de laboratório: Profa. Dra. Débora Martinho Morsch, Profa. Dra. Maria Beatriz Kohek, Profa. Dra. Adriane Pozzobon, Gisele, Lolita, Simone, Sheila, Vanderlei, Idelma e Miriam pela amizade e ótimo ambiente de trabalho que proporcionam.

Aos professores do PPG- fisiologia, Profa. Dra. Maria Flávia Ribeiro, Prof. Dr. Paulo Ivo Homem Bitencourt Júnior, Profa. Dra. Adriane Belló-Klein, Profa. Dra. Roselis Silveira Martins da Silva pelos ensinamentos e apoio.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski, por estar sempre disposto a ensinar, debater e ajudar sempre que necessitei apoio. Por sua competência e conhecimento em criticar e ajudar-me a construir desde os experimentos iniciais até a redação final dessa tese.

Aos meus irmãos e família pela compreensão de minha ausência durante esse longo período e por seu apoio incondicional. Agradeço especialmente a minha madrinha Marineide Bueno, de quem sinto muita falta, por me guiar ao caminho de minha profissão.

Agradeço a minha amada noiva Fernanda Eloy Narvaez pela dedicação, compreensão e apoio em todos os momentos. Por me acompanhar em minha jornada ao exterior e torna - lá suportável, e acima de tudo por fazer-me feliz. Agradeço a família Eloy Narvaez por me acolherem como seu integrante, por sua dedicação e amor.

Agradeço à minha amada mãe, Nereida Bueno, pessoa responsável por quem sou hoje, quem me apoiou desde os primeiros passos até aqui. Pelo investimento, confiança e muitas vezes sacrifício.

Este trabalho teve apoio:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERG

Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior- CAPES

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO..... | 7 |
| ABSTRACT | 9 |
| LISTA DE FIGURAS | 11 |
| LISTA DE TABELAS | 13 |
| LISTA DE GRÁFICOS..... | 14 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 15 |
| 1 INTRODUÇÃO | 20 |
| 1.1 PRÉ-ECLÂMPسيا..... | 20 |
| 1.1.1 Características | 20 |
| 1.1.2 Diagnóstico | 21 |
| 1.1.3 Fatores de Risco | 23 |
| 1.1.4 Fisiopatologia da Pré-Eclâmpسيا..... | 25 |
| 2 PROTEÍNA QUINASE B/Akt | 31 |
| 2.1 CARACTERIZAÇÃO E HISTÓRICO DA AKT/PKB..... | 31 |
| 2.2 FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DA AKT/PKB | 33 |
| 2.3 SINALIZAÇÃO DA VIA <i>UPSTREAM</i> DA AKT/PKB..... | 35 |
| 2.3.1 Ativação da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K)..... | 35 |
| 2.3.2 Inibidores da ativação da via PI3K-Akt/PKB..... | 37 |
| 2.3.3 Fosforilação do sítio Thr308 da Akt/PKB..... | 38 |
| 2.3.4 Fosforilação do sítio Ser473 da Akt/PKB | 40 |
| 2.4 SINALIZACAO DA VIA <i>DOWNSTREAM</i> DA Akt/PKB..... | 43 |
| 2.4.1 Regulação do metabolismo e captação de glicose estimulada por pela Akt/PKB..... | 45 |
| 2.4.2 Regulação da Akt/PKB na sobrevivência e proliferação celular..... | 46 |
| 2.4.3 Regulação do crescimento celular estimulado pela Akt/PKB | 49 |

| | |
|--|-----|
| 2.4.4 Regulação da angiogênese estimulada pela Akt/PKB | 50 |
| 3 OBJETIVOS | 52 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 52 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 52 |
| 4 MÉTODO..... | 53 |
| 4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO | 53 |
| 4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRAS | 53 |
| 4.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS | 53 |
| 4.5 TESTE DOS ANTICORPOS PARA AKT/PKB FOSFORILADA..... | 54 |
| 4.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA | 55 |
| 4.7 WESTERN BLOTS | 56 |
| 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 57 |
| 5 RESULTADOS | 58 |
| 5.1 CARACTERÍSTICAS DAS PACIENTES..... | 58 |
| 5.2 TESTE DOS ANTICORPOS PARA AKT/PKB FOSFORILADA..... | 61 |
| 5.3 EXPRESSÃO PROTÉICA EM PLACENTAS | 62 |
| 5.5 EXPRESSÃO PROTÉICA EM MÚSCULOS ESQUELÉTICOS | 74 |
| 5.4 EXPRESSÃO PROTÉICA NO TECIDO ADIPOSEO | 80 |
| 6 DISCUSSÃO | 82 |
| 7 CONCLUSÕES | 94 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 95 |
| 9 ANEXO 1 - ficha de coleta de dados | 103 |
| 10 ANEXO 2 - Consentimento informado..... | 104 |
| 11 ANEXO 3 -Tabela de dados clínicos e antropométricos das pacientes com pré-eclampsia e normais. | 105 |
| 12 ANEXO 4 – Artigo submetido..... | 106 |

RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é causa importante de mortalidade fetal e materna em todo mundo e existem evidências que a resistência à insulina esteja implicada em sua fisiopatologia. A via Akt/PKB é estimulada pela insulina e exerce várias funções vitais como crescimento, sobrevivência e metabolismo celular. **Objetivo:** investigar a expressão basal da Akt/PKB, proteínas que regulam sua atividade e de seus substratos em placenta, músculo esquelético e adipócitos de parturientes normais e com pré-eclâmpsia. **Método:** amostras de 17 pacientes normais e 17 pacientes com PE foram coletadas, preparadas e analisadas por *Western blot* para quantificação da expressão de proteínas envolvidas na cascata de sinalização da Akt/PKB. **Resultados:** em placentas a expressão basal da P85 foi 1,12 (0,83 – 1,62 mediana e percentis 25 - 75), para normais e 1,29 (0,89 – 1,96) para PE com $p = 0,42$; a expressão da Akt/PKB total foi 1,85 (1,07 - 3,12) para normais e 1,53 (1,27-3,08) com $p = 1,00$. A atividade dos substratos da Akt/PKB fosforilados em serina e treonina foi semelhante entre placentas de parturientes normais e PE, e a expressão da HSP90 também se mostrou semelhante entre os dois grupos. No músculo esquelético a expressão da P85 foi de 1,41 (1,20 - 6,29) para normais e 1,63 (1,32-1,90) para PE com $p = 0,91$. A expressão de Akt/PKB total foi de 0,96 (0,84 - 1,31) para normais e 1,55 (0,87 - 1,86), $p = 0,41$. A atividade dos substratos da Akt/PKB fosforilados em serina e treonina foi semelhante nesse tecido entre normais e PE, e a expressão da HSP90 também se mostrou semelhante entre os dois grupos no músculo esquelético. No tecido adiposo a expressão de Akt/PKB total foi 1,10 (0,53 -

1,73) em normais e 1,66 (0,83 - 2,00) em PE com $p = 0,37$ e a expressão do IR β ; 1,58 (0,56 - 3,23) para normais e 2,00 (0,91 - 6,65) para PE com $p = 0,53$.

Conclusões: Não houve diferença na via da Akt/PKB, em estado basal, em placenta e músculo esquelético de pacientes com PE e normais. Contudo, não podemos descartar defeitos nessa via de sinalização como fisiopatologia da PE, pois ainda é necessária a análise dessa via estimulada.

ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is important cause of fetal and maternal mortality around the world and there are evidences that insulin resistance has been implicated in the pathophysiology of preeclampsia. Akt/PKB via is stimulated by insulin and perform several vital functions as growth, survival and cellular metabolism. **Objective:** to investigate the basal expression of Akt/PKB, proteins that regulate Akt/PKB activity and Akt/PKB substrate in the placenta, skeletal muscle and adipocytes of normal and preeclampsia parturient. **Method:** samples were collected from 17 normal patients and 17 PE patients, prepared and analyzed by Western blot to quantify the proteins expression involved in signaling cascade of Akt/PKB. **Results:** the basal expression of P85 in normal placentas was 1.12 (0.83 – 1.62 median and percentiles 25 - 75), and for PE 1.29 (0.89 – 1.96) with $p = 0.42$; total Akt/PKB expression for normal was 1.85 (1.07 – 3.12) and 1.53 (1.27-3.08) with $p = 1.00$. The Akt/PKB phospho(ser/thr) substrates activity was not different in placentas of the normal and PE groups and the HSP90 also showed no difference between the groups. In the skeletal muscle the expression of P85 of normal placentas was 1.41 (1.20 – 6.29) and for PE 1.63 (1.32-1.90) with $p = 0.91$. Total Akt/PKB expression for normal was 0.96 (0.84 – 1.31) and 1.55 (0.87 – 1.86), $p = 0.41$. The Akt/PKB phospho(ser/thr) substrates activity was not different in skeletal muscle of the normal and PE groups and the HSP90 also showed no difference between the groups. Total Akt/PKB expression in the adipose tissue of normal placentas was 1.10 (0.53 – 1.73) and for PE 1.66 (0.83 – 2.00) with $p = 0.37$ and the expression of IR β of normal placentas was 1.58 (0.56 – 3.23) and for PE 2.00 (0.91 – 6.65) with $p = 0.53$. **Conclusions:** there was no difference in

Akt/PKB via, in basal state, in placentas and skeletal muscle of normal and PE patients. However, we cannot discard defects in this signaling via as pathophysiology of PE, because it is still necessary to analyze this via during stimulation.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Mecanismo deficitário de placentação na PE..... | 27 |
| Figura 2. Estrutura das isoformas da Akt/PKB humana. | 33 |
| Figura 3. Akt/PKB <i>knockout</i> em camundongos. | 34 |
| Figura 4. PI3K classe IA..... | 36 |
| Figura 5. PI3K classe IB..... | 37 |
| Figura 6. Fosforilação da Akt/PKB no resíduo treonina 308..... | 39 |
| Figura 7. Fosforilação do resíduo serina 473 (S473). | 42 |
| Figura 8. Substratos da Akt/PKB..... | 44 |
| Figura 9. Ações dos substratos sobre as funções celulares. | 45 |
| Figura 10. Via <i>downstream</i> da Akt/PKB. | 50 |
| Figura 11. Teste dos anticorpos para Akt/PKB fosforilada..... | 61 |
| Figura 12. Expressão da beta subunidade do receptor de insulina IR β em placentas. | 63 |
| Figura 13. Expressão substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) em placentas..... | 64 |
| Figura 14. Expressão da P85 em placentas..... | 65 |
| Figura 15. Expressão da Akt/PKB em placentas..... | 66 |
| Figura 16. Expressão dos Substratos da Akt/PKB fosforilados em serina e treonina em placentas..... | 68 |
| Figura 17. Expressão da GSK3 β em placentas. | 70 |
| Figura 18. Expressão da HSP-90 em placentas..... | 71 |
| Figura 19. Expressão da FKHD em placentas. | 72 |
| Figura 20. Expressão do Pras40 em placentas..... | 73 |
| Figura 21. Expressão da IR β em músculo esquelético. | 75 |
| Figura 22. Expressão da p85 em músculo esquelético..... | 76 |

| | |
|--|----|
| Figura 23. Expressão da Akt/PKB em músculo esquelético..... | 77 |
| Figura 24. Expressão da HSP-90 em músculo esquelético..... | 78 |
| Figura 25. Expressão dos substratos da Akt/PKB fosforilados em serina e treonina em músculo esquelético..... | 79 |
| Figura 26. Expressão do IR β em tecido adiposo..... | 80 |
| Figura 27. Expressão da Akt/PKB em tecido adiposo..... | 81 |
| Figura 28. Via <i>upstream</i> da Akt/PKB analisada..... | 92 |
| Figura 29. Via <i>downstream</i> da Akt/PKB analisada..... | 93 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Anticorpos utilizados para realização dos <i>western blots</i> dos tecidos coletados de pacientes normais e com pré-eclâmpsia..... | 57 |
|--|----|

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1. Tempo de gestação em dias..... | 58 |
| Gráfico 2. Glicemia de jejum. | 59 |
| Gráfico 3. Pressão arterial sistólica e diastólica das pacientes normais e com PE. ... | 60 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------|---|
| AGC | <i>c-AMP-dependent protein kinase A, G and C</i> |
| Akt/PKB | <i>Akt/proteína quinase B (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog)</i> |
| AS160 | <i>Akt substract 160kDa</i> |
| ASK1 | <i>Apoptosis Signal-regulating Kinase 1</i> |
| ATM | <i>Ataxia Telangiectasia Mutant</i> |
| BAD | <i>pro-Apoptotic Bcl-2 related protein</i> |
| Bax | Proteína x associada ao bcl-2 |
| Bcl-2 | <i>B-cell lymphoma 2</i> |
| Bid | <i>Bh3-interacting domain death agonist</i> |
| Casp9 | Caspase 9 |
| Chk1 | <i>Checkpoint Homolog (S pombe)</i> |
| CTMP | <i>Carboxyi-Terminal Modulator Protein</i> |
| DCV | Doença Cardiovascular |
| DM | Diabetes Mellitus |
| DM2 | Diabetes Melitus tipo 2 |
| DNA-PK | <i>DNA Protein Kinase</i> |
| EGTA | <i>Ethylene Glycol Tetraacatic Acid</i> |
| eNOS | <i>endothelial Nitric Oxide Syntase</i> |
| FOX0 | <i>Forkhead bOX-containing protein, O sub-family</i> |
| FOX01 | <i>Forkhead bOX 01</i> |
| FOX03A | <i>Forkhead bOX 03A</i> |
| FOX04 | <i>Forkhead bOX 04</i> |
| Ft1 | <i>Fused toes protein 1</i> |
| GF | Fator de crescimento |

| | |
|-------------------|---|
| GFR- | Receptor de Fator de Crescimento |
| GLUT4 | Transportadores de glicose do tipo 4 |
| GPPG/HCPA | Grupo de pesquisa e pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre |
| Grb10 | <i>Growth Factor Receptor-Bound Protein 10</i> |
| GSK3 β | <i>Glycogen Synthase Kinase 3-beta</i> |
| GSK3 α | <i>Glycogen Synthase Kinase 3-alfa</i> |
| HAS | Hipertensão Arterial Sistêmica |
| HCl | Ácido Clorídrico |
| HDL | <i>High Density Lipoprotein</i> |
| HELLP | <i>Hemolysis Elevated Liver Enzymes Low Platelets</i> |
| HEPES | <i>(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)</i> |
| HG | Hipertensão Gestacional |
| HM | <i>Hydrophobic Motif</i> |
| HSP | <i>Heat Shock Protein</i> |
| HSP90 | <i>Heat Shock Protein 90kDa</i> |
| IKK | I κ B quinase |
| ILK1 | <i>Integrin-Linked Kinase 1</i> |
| IMC | Índice de Massa Corporal |
| IR- | Receptor de Insulina |
| IRS | Substrato do Receptor de Insulina |
| IRS-1 | Substrato 1 do Receptor de Insulina |
| IR β | Subunidade β do Receptor de Insulina |
| KCl | Cloreto de potássio |
| kDa | kiloDaltons |
| kg/m ² | Quilograma por metro quadrado |

| | |
|-----------|--|
| LDL | <i>Low Density Protein</i> |
| LKB1 | <i>serine/threonine Kinase 1L</i> |
| M | Molar |
| MAPKAP-K2 | <i>Mitogen Activated Protein Kinase Activated Protein Kinase 2</i> |
| Mdm2 | Murine double minute 2 |
| Mg | Miligrama |
| Min | Minuto |
| MKKK4 | <i>Similar to the MAP kinase kinase kinases</i> |
| mL | Mililitro |
| MLK3 | <i>Mixed Lineage Kinase 3</i> |
| Mm | Milímetro |
| mmHg | milímetros de mercúrio |
| mmol/L | milimol por litro |
| mTOR | <i>mammalian Target Of Rapamycin</i> |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NaF | Fluoreto de sódio |
| Nf-kB | <i>transcription factor Nuclear factor-kB</i> |
| Nm | Nanômetro |
| NO | Óxido Nítrico |
| p21CIP1 | <i>Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1A</i> |
| p27KIP1 | <i>Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27(kip1)</i> |
| PAD | Pressão Arterial Diastólica |
| PAS | Pressão Arterial Sistólica |
| PBS | Tampão Salina Fosfato |
| PCOS | Síndrome dos Ovários Policísticos |
| PDK1 | <i>3-Phosphoinositide- Dependent Protein Kinase</i> |

| | |
|-----------------|---|
| PE | Pré-eclâmpsia |
| PH | <i>Pleckstrin Homology</i> |
| pH | Potencial de hidrogênio |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3 Quinase |
| PIP2 | fosfadidilinositol-bi-fosfato |
| PIP3 | fosfatidil inositol-tri-fosfato |
| PKA | <i>Protein Kinase A</i> |
| PKB | <i>Protein Kinase B</i> |
| PKC | <i>Protein Kinase C</i> |
| PKC β II | <i>Protein kinase C βII</i> |
| PIGF | Placental Growth Factor |
| PRAS40 | <i>Proline-Rich Akt Substract of 40 kDa</i> |
| Ptdins | Fosfatidilinositol |
| PtdIns(3,4,5)P3 | Igual a PIP3 |
| PtdIns(4,5)P2 | Igual a PIP2 |
| PTEN | <i>Tumor Suppressor Phosphatase And Tensin Homology Deleted On Chromosome Ten</i> |
| Rac | <i>Related to the A and C Kinases</i> |
| RAF1 | <i>v-Raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i> |
| RTKs | Receptores Tirosina Quinase |
| S | Igual a Ser (serina) |
| SAPK | <i>Stress-Activated Protein Kinase</i> |
| Ser | Serina |
| sFlt-1 | <i>Fms- Like Tyrosine Kinase – 1</i> |
| SHBG | <i>Sex Hormone Binding Globulin</i> |
| SHIP | <i>SH2-domain-containing inositol polyphospatase 5-phosphatase</i> |

| | |
|--------|---|
| SREBPs | <i>Sterol Regulatory Element-Binding Proteins</i> |
| T | Igual a Thr (Treonina) |
| Tcl1 | <i>T cell leukaemia 1</i> |
| Thr | Treonina |
| TORC2 | <i>Target Of Rapamycin Complex 2</i> |
| Trb3 | <i>Mammalian homologue tribblets</i> |
| TSC1 | <i>Tuberous Sclerosis Complex 1</i> |
| TSC2 | <i>Tuberous Sclerosis Complex 2</i> |
| v/v | Volume por volume |
| VEGF | <i>Vascular Endotelial Growth Factor</i> |
| WNK1 | <i>WNK lysine deficient protein kinase 1</i> |
| µg | Micrograma |
| µM | Micromolar |
| µg/mL | micrograma por microlitro |
| µL | Microlitro |
| µmol/L | micromol por litro |

1 INTRODUÇÃO

1.1 PRÉ-ECLÂMPسيا

1.1.1 Características

A pré-eclâmpsia (PE) é uma das doenças da gestação mais graves e prevalentes, principalmente nos países menos desenvolvidos. Ocasiona a restrição do crescimento fetal com conseqüente prematuridade e, em casos mais graves, morbimortalidade materna (Kossenjans *et al.* 2000). Sua causa é desconhecida, porém os mecanismos dessa disfunção são bem caracterizados por hipertensão materna (vasoconstrição do leito vascular materno e conseqüente aumento da resistência vascular) e proteinúria (Walker 2000; Roberts e Cooper 2001). Por ocorrer unicamente na mulher, torna-se de difícil estudo e modelos animais são incapazes de reproduzir seus efeitos. Outra dificuldade atribuída para elucidação da PE está no período de desenvolvimento, provavelmente sua fisiopatologia já se inicia no primeiro trimestre da gestação (invasão trofoblástica), entretanto o quadro clínico é característico no terceiro trimestre (Mohaupt 2007).

Vários estudos mostram que síndrome de resistência à insulina está associada e pode contribuir com a fisiopatologia da pré-eclâmpsia, sendo este mecanismo apontado como possível desencadeador dessa doença e também da hipertensão gestacional (Seely e Solomon 2003; Scioscia *et al.* 2006). Porém, estes achados são pouco determinantes e permanecem dúvidas quanto ao desencadeamento da PE, se a resistência à insulina está envolvida na fisiopatologia

da pré-eclâmpsia ou se é uma consequência dessa (Wolf *et al.* 2002; Sibai *et al.* 2005).

O diagnóstico de pré-eclâmpsia tornou-se mais acurado após o ano de 2000 quando houve concordância entre grupos de especialistas na área para estabelecer seus critérios diagnósticos, antes disso, chegar a conclusões firmes sobre essa patologia era pouco provável (Sibai *et al.* 2005).

1.1.2 Diagnóstico

A pré-eclâmpsia é uma doença própria da gestação, ocorrendo principalmente em nulíparas, após a 20ª semana de gestação e, mais freqüentemente, próximo ao termo. O diagnóstico é realizado pelo aumento de níveis tensionais ($> 140/90$ mmHg) medidos duas vezes, separadas por 4 a 6 horas, proteinúria ($> 0,3$ g/24 h) e algumas das seguintes alterações: hemoconcentração, hipoalbuminemia, alteração de provas de função hepática, das provas de coagulação e aumento dos níveis de uratos (≥ 6 mg/dl) (2000).

Os distúrbios hipertensivos durante a gestação incluem: episódio inédito de hipertensão em mulheres previamente normotensas, podendo evoluir para hipertensão gestacional (HG) ou PE (com proteinúria e/ou outros sinais). Os episódios inéditos de hipertensão na PE, normalmente, desenvolvem-se após a segunda metade da gestação, sendo que desaparecem seis semanas depois do parto, porém essas mulheres têm uma maior predisposição para hipertensão em fases mais tardias da vida. O diagnóstico diferencial entre HG ou PE é feito através

do grau de proteinúria (PE quando acima de 0,3 g/24h), quando inexitem outras manifestações da doença, permanecendo incerto se a PE e a HG são doenças diferentes ou graus diferentes da mesma doença (Seely e Solomon 2003).

A síndrome metabólica (síndrome X) e a síndrome HELLP (*Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, Low Platelets*) estão associadas com o desenvolvimento de PE. A síndrome metabólica (síndrome X) é reconhecida por presença de obesidade, hipertrigliceridemia, hiperglicemia, resistência à insulina e hipertensão. A síndrome HELLP mostra aumento na mortalidade materna, risco para choque hipovolêmico, morte do neonato e riscos de complicação no parto (números de plaquetas < 50000) (O'Brien *et al.* 2003).

A proteinúria em 24h é o meio mais seguro para o diagnóstico de proteinúria significativa na gestação (> 0,3 g/24 h), entretanto quando é necessário fazer o diagnóstico mais rapidamente pode ser aceito o teste da relação proteinúria/creatinúria em amostra de urina, que, se maior ou igual a 0,5 confirma o diagnóstico (Ramos *et al.* 1999). A presença de proteínas em amostra de urina com resultado de $\geq 1+$ (uma cruz), em fitas para mensuração de proteínas, em duas mensurações separadas por 4-6h pode ser usada, porém esse método não é um consenso e não é usado como critério para os grupos norte-americanos (Sibai *et al.* 2005).

Apesar dos esforços para melhorar a acurácia do diagnóstico, existem muitas variáveis e alterações de definição que tornam esse um problema para determinação epidemiológica, pois, episódios hipertensivos durante a gestação são

freqüentes: dados de um estudo mostram que 40 % das gestantes apresentam um episódio de alteração da pressão arterial acima de 140/90mmHg (Walker 2000). Além disso, para um diagnóstico preciso é necessário que se leve em consideração os métodos para mensuração da pressão arterial com um adequado posicionamento do paciente, aparelhos calibrados e cuidados especiais em pacientes obesos onde existe dificuldade para essa mensuração.

1.1.3 Fatores de Risco

Incidência exata de PE é desconhecida, mas os achados relatam aproximadamente 3 - 5% (Roberts e Cooper 2001). A prevalência da pré-eclâmpsia também é variável: 10 a 20 % (Clausen *et al.* 2001). Essa doença é duas vezes mais comum em nulíparas do que em múltiparas, entretanto, a troca do pai aumenta o risco de PE para múltiparas, sugerindo correlações imunológicas (Trupin *et al.* 1996; Walker 2000). Estudos norte-americanos e escandinavos demonstram que a exposição prolongada ao esperma paterno é um fator protetor para PE, além disso, um aborto ou uma gestação normal prévia diminui o risco para próxima gestação, mas se houver troca de parceiro o risco aumenta. Esse fato pode explicar também a alta incidência em mulheres jovens com menos de 20 anos (Lie *et al.* 1998; Esplin *et al.* 2001; Sibai *et al.* 2005). A freqüência de PE em mulheres com episódio prévio de PE é em torno de 15 - 25 % (Caritis *et al.* 1998; 2000).

A ocorrência de PE em mulheres negras é aproximadamente duas vezes maior do que nas brancas, dados sobre a idade materna não são unânimes e a

obesidade apresenta-se como um fator preditor (Sibai *et al.* 2005). Em contra partida Knuist e colaboradores em 1998 (Knuist *et al.* 1998), relataram em um estudo prospectivo de coorte em diferentes etnias que em mulheres negras a elevada idade materna é um significativo fator de risco significativo para PE, e ainda, que a pressão arterial diastólica elevada tem uma correlação positiva melhor do que a pressão arterial sistólica, sendo uma boa preditora de PE nas mulheres brancas. Devido essas diferenças o autor sugere uma análise separada das mulheres negras (Knuist *et al.* 1998).

O índice de massa corporal (IMC) materna e resistência à insulina são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de PE e disfunções endoteliais. Sendo que para cada 5 a 7 kg/m² de aumento no IMC o risco para PE duplica, mesmo sem a interferência de fatores como diabetes tipo 2 e hipertensão gestacional (O'Brien *et al.* 2003).

Fatores genéticos podem estar relacionados, porém estudos de base genética não foram conclusivos. Mesmo assim, se aceita uma provável associação de fatores genéticos e ambientais (Walker 2000; Roberts e Cooper 2001). Fatores como hipertensão, diabetes, aumento da resistência para insulina, níveis elevados de testosterona e aumento da concentração sanguínea de homocisteína são fatores de risco para PE e comuns para doença endotelial - aterosclerose - e *diabetes mellitus* tardia. Além disso, dislipidemia com aumento de triglicerídeos, LDL e diminuição de HDL mostram-se presentes nessas patologias com evidências para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, em fases mais tardias da vida, para mulheres que desenvolveram PE (Sibai *et al.* 2005).

O tabagismo está relacionado com problemas durante a gestação e o parto: aborto espontâneo, doenças respiratórias, prematuridade, natimortalidade. Curiosamente, o fumo tem sido relacionado como protetor para pré-eclâmpsia, sendo que o risco para doença diminui 33 % em fumantes, algumas hipóteses têm sido sugeridas para explicar esse fato - as ações do monóxido de carbono podem aumentar a invasão do trofoblasto e o remodelamento das arteríolas espirais, diminuir o processo inflamatório e estresse oxidativo local (Bainbridge *et al.* 2005).

1.1.4 Fisiopatologia da Pré-Eclâmpsia

A pré-eclâmpsia está relacionada com inserção inadequada da placenta, por falha de invasão do trofoblasto, mal formação e implantação inadequada das arteríolas espirais desenvolvendo insuficiência placentária (figura 1), o que pode interferir no desenvolvimento fetal. Porém nem todas as mulheres com insuficiência placentária desenvolvem PE, isso está relacionado ao grau de resposta inflamatória materna e as variações na formação dos leitos capilares (Caritis *et al.* 1998; Walker 2000; Roberts e Cooper 2001). As alterações moleculares que afetam a angiogênese não são bem esclarecidas, alterações nos níveis de agentes pró-angiogênicos e anti-angiogênicos parecem estar relacionados. Mulheres com baixos níveis plasmáticos de PIGF (*placental growth factor*), um fator pró-angiogênico, no primeiro trimestre de gravidez têm risco seis vezes maior de pré-eclâmpsia no terceiro trimestre comparadas com aquelas com concentrações maiores de PIGF. Este maior acometimento também está relacionado a uma diminuição dos níveis

séricos do SHBG (*sex hormone binding globulin*), neste período, sendo este relacionado com resistência à insulina (Wolf *et al.* 2002) e aumentos nos níveis de sFlt-1 (*fms- like tyrosine kinase- 1*) um antagonista do VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e PlGF (Maynard *et al.* 2003; Thadhani *et al.* 2004).

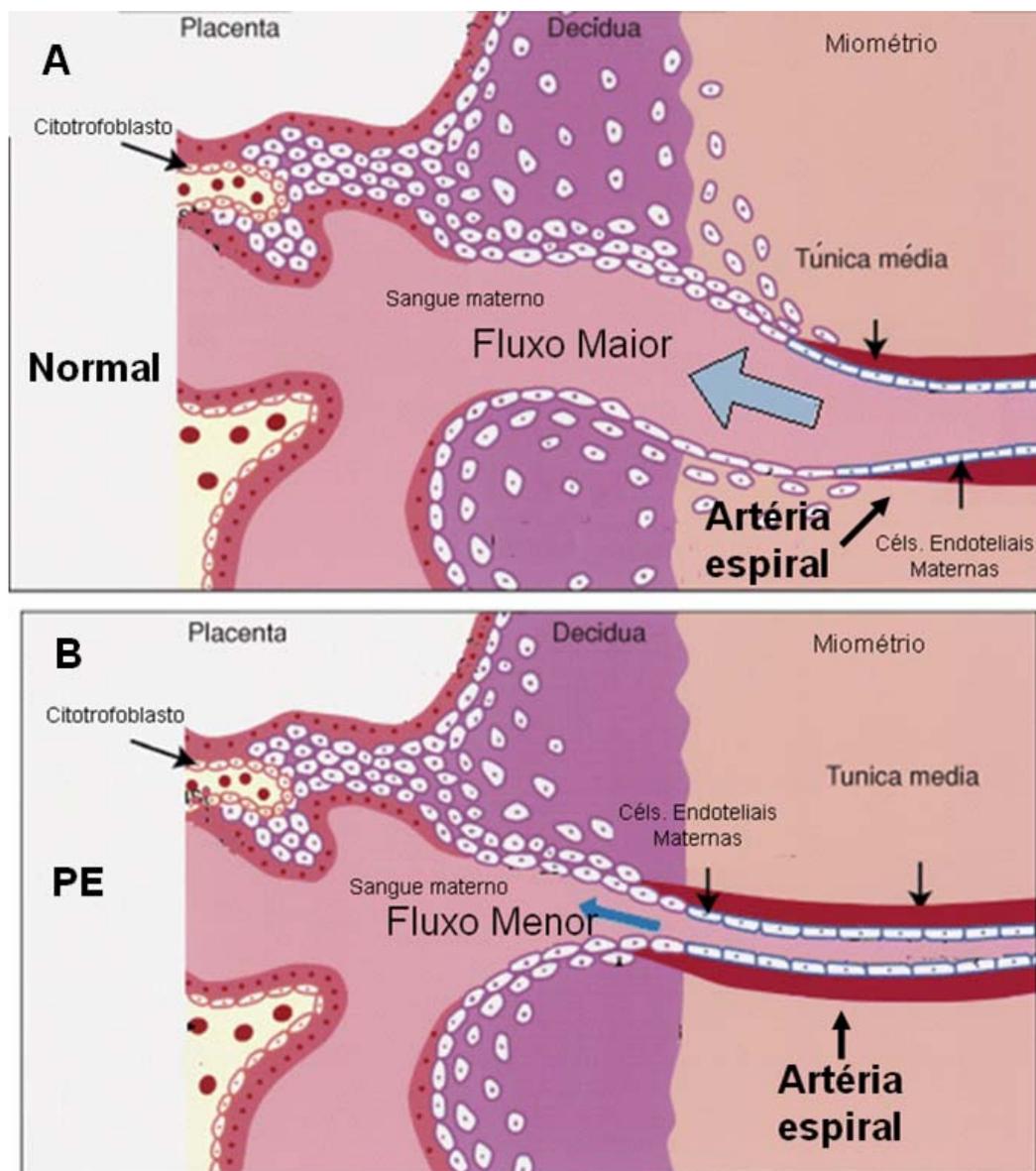


Figura 1: Mecanismo deficitário de placentação na PE.

A - Artéria espiral miometrial de placenta normal.

B- Artéria espiral miometrial irrigando de placenta com PE. Nota-se um estreitamento da artéria na placenta com PE o que diminui o fluxo sanguíneo - figura modificada de Karumanchi, 2005 (Karumanchi *et al.* 2005).

Resistência à insulina e conseqüente hiperinsulinemia são características normais da gestação, sendo mais acentuadas no terceiro trimestre de gravidez. Este fato ocorre provavelmente por aumento dos níveis hormonais de lactogênio placentário, progesterona, cortisol e estradiol (Seely e Solomon 2003).

Kaaja e colaboradores (Kaaja *et al.* 1995) avaliando pacientes com PE, verificaram um perfil tipo “síndrome de resistência à Insulina” com hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, hiperuricemia e baixo HDL-colesterol, todos fatores de risco para doença cardiovascular (DCV). Enquanto o HDL-colesterol estava 18 % mais baixo que no grupo-controle, os triglicédeos estavam 65 % mais alto que no grupo-controle.

Defeitos na sinalização da insulina levam a resistência à insulina, com conseqüente hiperinsulinemia (Pessin e Saltiel 2000). Dunaif e colaboradores (Dunaif *et al.* 1995) evidenciaram, em cultura de fibroblastos de mulheres com síndrome dos ovários policísticos, aumentos na fosforilação de resíduos de serina da subunidade β do receptor de insulina. Esse aumento na fosforilação de serina dos receptores, ou dos seus substratos, levam a diminuição na fosforilação dos resíduos de tirosina diminuindo a ação da insulina, sendo um possível mecanismo dessa síndrome.

Laivuori e colaboradores (Laivuori *et al.* 1996) estudando um grupo de pacientes com pré-eclâmpsia na 1ª gestação e avaliando-as 17 anos após, encontraram correlação positiva entre a magnitude da hiperinsulinemia (e talvez resistência à insulina), trigliceridemia e aumento de níveis tensionais. Os dados deste trabalho também sugerem uma associação positiva, entre índice de

resistência à insulina em jejum e níveis pressóricos na gestante primigesta com PE. Este estudo concluiu que talvez a hiperinsulinemia leve, que pode ser causa ou consequência da PE, possa fazer parte da etiopatogenia dessa doença e também contribuir para o aumento do risco para doença cardiovascular no futuro, havendo maior probabilidade de desenvolver doenças como diabetes mellitus (DM), hipertensão arterial sistêmica (HAS) e coronariopatia isquêmica.

Hiperinsulinemia causa inibição da produção de SHBG pelo fígado, sendo esse parâmetro utilizado como marcador de hiperinsulinemia e resistência à insulina. Os níveis dessa glicoproteína são mais elevados no soro, no primeiro e segundo trimestre de gravidez em mulheres que não desenvolvem PE comparadas com normais (Wolf *et al.* 2002).

O estresse oxidativo parece ter um papel na patogênese da PE e diabetes gestacional, estando relacionado com o aumento da formação de espécies reativas ao oxigênio e ou a diminuição da habilidade anti-oxidativa (Kossenjans *et al.* 2000). Diminuição dos agentes anti-oxidantes como a superóxido dismutase, catalase, glutathione e vitamina E ou aumento dos níveis de peróxido de lipídeo, agente pró-oxidativo, estão caracterizados na PE (Kato *et al.* 1997; Morikawa *et al.* 1997). A administração de antioxidantes com vitamina E e C podem diminuir os níveis de peróxido de lipídeo na perfusão de placenta de mulheres com PE (Poranen *et al.* 1998), porém o aumento da formação de ascorbato por administração de vitamina C pode aumentar o estresse oxidativo (Hubel *et al.* 1997).

Recentemente foi descrito por Scioscia (Scioscia *et al.* 2006) resistência à insulina em placentas de mulheres com PE. Nesse estudo Scioscia demonstrou uma diminuição do estímulo insulínico, com menor grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em mulheres com PE do que em mulheres normais. Por outro lado, o grau de fosforilação de serina do IRS-2 de placentas mulheres com PE após o estímulo insulínico era maior, o que inibe a ativação desse substrato.

2 PROTEÍNA QUINASE B/AKT (Akt/PKB)

2.1 CARACTERIZAÇÃO E HISTÓRICO DA AKT/PKB

As pesquisas sobre a Akt iniciaram com as descobertas de Staal e colaboradores que descreveram o vírus Akt8 (Staal *et al.* 1977), um vírus mutante de leucemia em camundongos, encontrado em alta incidência em linfomas espontâneos com alta capacidade de formar focos malignos em linhagens celulares. Staal e colaboradores isolaram esse retrovírus de células pulmonares infectadas com Akt8 em camundongos e demonstraram que elas expressavam uma seqüência oncogênica a qual eles denominaram *Akt* (Staal *et al.* 1977). Esse grupo ainda demonstrou a capacidade oncogênica do vírus Akt8 em linfomas do timo e confirmaram o potencial oncogênico do gene da Akt.

Somente em 1991, três grupos científicos independentes identificaram os genes correspondentes para Akt/PKB, Jones e cols. (Jones *et al.* 1991), Bellacosa e cols. (Bellacosa *et al.* 1991), e Cooffer e Woodget (Coffer e Woodgett 1991), descreveram o clone de Akt1 ou isoforma PKB α . Esses autores descreveram uma forte semelhança entre a seqüência da Akt e das proteínas da família quinase C e A (PKC e PKA). Por esse motivo Jones e Cols. denominaram de *Rac* (*related to the A and C kinases*), Cooffer e Woodget denominaram de PKB (*protein Kinase B*) e o grupo de Bellacosa de *Akt*, sendo hoje possível encontrarmos na literatura as três denominações, mas o termo Akt/PKB tornou-se um consenso nos últimos anos.

Nesse mesmo ano, foi descrita a segunda isoforma da Akt/PKB (Jones *et al.* 1991), sendo que hoje temos descritas três isoformas nos mamíferos: Akt1/PKB α , Akt2/PKB β e Akt3/PKB γ . As três isoformas, produtos de três diferentes genes, conservam uma estrutura semelhante que contém três domínios funcionais (figura 2) um domínio N-terminal PH (*pleckstrin homology*), um domínio central quinase e um domínio regulatório C-terminal que contém um motivo hidrofóbico (*HM-hydrophobic motif*). Essa arquitetura é bem conservada entre as espécies, de insetos até os seres humanos. Sendo os domínios central e HM altamente conservado entre os membros AGC, que têm como integrantes as proteínas quinase C e vários mediadores de resposta à insulina e outros hormônios de crescimento. O domínio PH é essencial para ligação dessas proteínas em lipídios como fosfoinositol-trifosfato (PIP3) um fosfolípido de membrana plasmática (Brazil e Hemmings 2001; Brazil *et al.* 2002; Fayard *et al.* 2005).

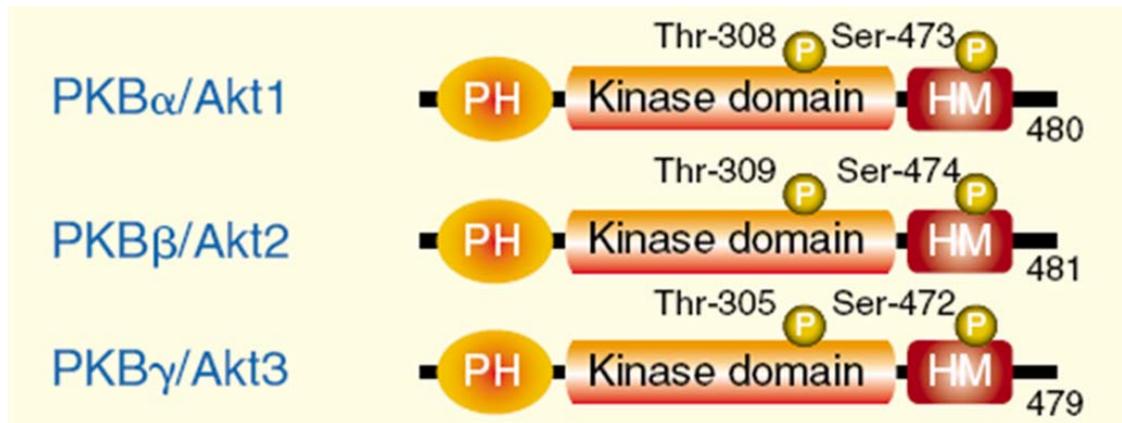


Figura 2. Estrutura das isoformas da Akt/PKB humana.

As três isoformas da Akt/PKB, Akt1/PKB α , Akt2/PKB β , Akt3/PKB γ contendo um N-terminal domínio PH (*Pleckstrin Homology*), um domínio central quinase (*Kinase domain*) e um domínio regulatório C-terminal contendo um motivo hidrofóbico (HM-*hydrophobic motif*), (Thr = treonina e Ser = serina). Adaptada de Fayard, 2005 (Fayard *et al.* 2005).

2.2 FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DA AKT/PKB

Experimentos com manipulação genética em camundongos demonstraram a importância e o papel fisiológico das isoformas da Akt/PKB e demonstraram as funções *in vivo* da Akt/PKB. A seguir serão descritos brevemente alguns achados em revisões recentes da literatura (Yang *et al.* 2004; Fayard *et al.* 2005). O aumento da expressão da Akt/PKB causa hipertrofia e aumento da contratilidade cardíaca, aumenta a incidência de linfomas no timo, aumenta dramaticamente o desenvolvimento das glândulas mamárias durante a gravidez, causa hipertrofia, hiperplasia e hiperinsulinemia em células β pancreáticas, e também leva a neoplasia de próstata. Em modelos *knockout* para Akt1/PKB α foram descritas falhas no

desenvolvimento placentário e defeitos e diminuição do crescimento embrionário, com alta taxa de morte pós-natal. Modelos *knockout* para Akt2/PKB β apresentam resistência à insulina severa, gerando um perfil de diabetes tipo 2, perda de tecido adiposo com a idade e retardo no crescimento. Para *knockout* Akt3/PKB γ foi descrito diminuição do desenvolvimento cerebral (Yang *et al.* 2004; Fayard *et al.* 2005) (figura 3).

| Akt/PKB KNOCKOUT EM CAMUNDONGOS | | |
|--|--|--|
| Isoforma | Sobrevivência | Fenótipo |
| Akt1/PKBα | Viável, porém com alta taxa da mortalidade pós-natal | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Retardo no crescimento ✓ Alterações no desenvolvimento placentário |
| Akt2/PKBβ | Viável | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Hiperglicemia, hiperinsulinemia, resistência à insulina ✓ Retardo no crescimento ✓ Perda do tecido adiposo com a idade |
| Akt3/PKBγ | Viável | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Cérebro de tamanho reduzido |
| Akt1/PKBα<Akt2/PKBβ | Morte pós-natal | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Desenvolvimento anormal da pele, ossos e músculos ✓ Defeitos na adipogênese |

Figura 3. Akt/PKB *knockout* em camundongos.

Alterações no fenótipo e demonstração da viabilidade de camundongos *knockout* para as três isoformas da Akt/PKB adaptada de Fayard 2005 (Fayard *et al.* 2005) e Yang 2004 (Yang *et al.* 2004).

2.3 SINALIZAÇÃO DA VIA *UPSTREAM* DA AKT/PKB

2.3.1 Ativação da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K)

O papel da Akt/PKB ficou evidente quando se demonstrou sua participação na via *downstream* da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) que é ativada por autofosforilação de receptores tirosina quinase (Carpenter *et al.* 1990) por ligação de fatores de crescimento (Auger *et al.* 1989), como insulina; por estimulação de proteína G acoplada e ativação de sinalização de integrinas (Foster *et al.* 2003).

As fosfatidilinositol 3 quinases (PI3Ks) são enzimas membros de uma família única e bem conservada de quinases intracelulares que fosforilam o grupo 3'-hidroxila de fosfatidilinositol e fosfoinosítídeos. Essa reação leva à ativação de várias vias de sinalização que regulam o metabolismo, sobrevivência, crescimento e diferenciação celular, e ainda o tráfico de vesículas intracelulares. As PI3Ks são classificadas em três classes (I, II e III), todas encontradas em mamíferos, sendo que a classe I é dividida em duas subclasses A e B. As diferentes classes têm funções distintas na sinalização celular. As PI3K classe IA (figura 4) são ativadas por receptores tirosina quinase (RTKs) pois possuem uma subunidade p85 regulatória essencial para essa interação, enquanto a classe IB (figura 5) que são ativadas por receptores acoplados à proteína G não possuem essa subunidade. As diferentes classes de PI3K ainda diferem quanto a capacidade de fosforilar os lipídeos de membrana, sendo capacidade de fosforilar fosfatidilinositol-bi-fosfato (PIP₂) e produzir fosfatidil inositol-tri-fosfato (PIP₃) uma capacidade até então descrita somente para PI3K classe I (Engelman *et al.* 2006).

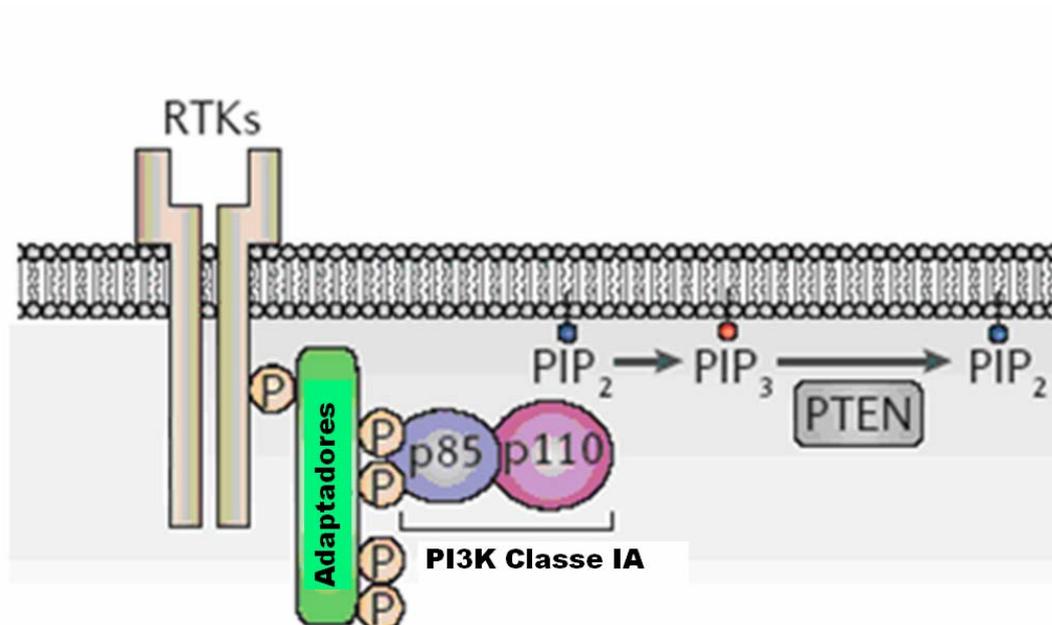


Figura 4. PI3K classe IA.

Composta pelas subunidades p85 e p110 é ativada por receptores tirosina quinase (RTKs), através de adaptadores como os IRS (substratos do receptor de insulina) e fosforila os bi-fosfoinosítídeos de membrana PIP₂ e transforma-os em PIP₃. Sendo que essa reação pode ser revertida por PTEN (*tumor suppressor phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten*). Modificada de Engelman, 2006.

A importância da PI3K IA para os mamíferos foi demonstrada quando se desenvolveram experimentos de deleção de genes em camundongos, mostrando que a falta da sinalização da PI3K é um importante fator que contribui para *Diabetes Melitus* tipo 2 (DM2), enquanto que aumentos nessa via levam, freqüentemente, a formações de focos malignos (Engelman *et al.* 2006).

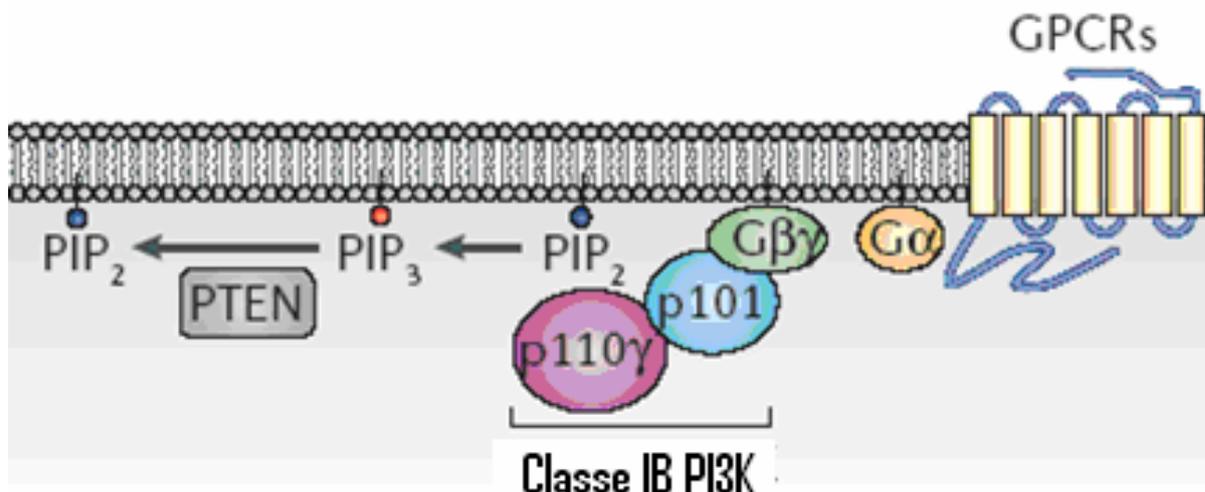


Figura 5. PI3K classe IB.

Essa PI3K não contém a subunidade regulatória p85 não sendo regulada por RTKs. Sua ativação ocorre por interação dos receptores acoplados a proteína G com as proteínas G do tipo α ($G\alpha$) e $\beta\gamma$ ($G\beta\gamma$). Compostas das subunidades p110 γ e da subunidade regulatória p101. Sua ativação proporciona fosforilação dos bisfosfoinosítídeos de membrana PIP₂ e transformando-os em PIP₃. Sendo que essa reação pode ser revertida por PTEN (*tumor suppressor phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten*). Modificada de Engelman, 2006

2.3.2 Inibidores da ativação da via PI3K-Akt/PKB

A ligação de um fator de crescimento, como insulina, ao seu receptor específico irá desencadear a autofosforilação deste e ativação da PI3K, essa ativação pode ser bloqueada diretamente pelas substâncias *wortmannin* (Arcaro e Wyman 1993) e *LY294002*, esses reagentes foram de grande importância para delinear os eventos *downstream* da sinalização da PI3K. Uma vez ativada, a PI3K classe IA que é composta por duas subunidades (p85 e a p110) irá fosforilar os fosfoinosítídeos de membrana (PtdIns ou PIP), transformando PIP₂ em PIP₃ (figura

6). Indiretamente, o PTEN (*tumor suppressor phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten*) (Stambolic *et al.* 1998) e a SHIP (*SH2-domain-containing inositol polyphosphatase 5-phosphatase*) inibem a via da Akt/PKB por conversão (desfosforilação) de PIP3 em PIP2 (Fayard *et al.* 2005; Engelman *et al.* 2006).

2.3.3 Fosforilação do sítio Thr308 da Akt/PKB

Os domínios *Pleckstrin Homology* da Akt/PKB são atraídos do citoplasma para a membrana por PIP3 (Stephens *et al.*) que recruta também a enzima PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase*). Essa enzima é a responsável pela fosforilação da Akt/PKB no sítio Thr308 situado no domínio catalítico (Alessi *et al.* 1997) (figura 6). Para que a ativação da Akt/PKB ocorra é necessária a fosforilação de dois sítios, Thr 308 e Ser473 (Plas e Thompson 2005; Song *et al.* 2005) (na AKT1/PKB α , para as outras isoformas (ver figura 2)).

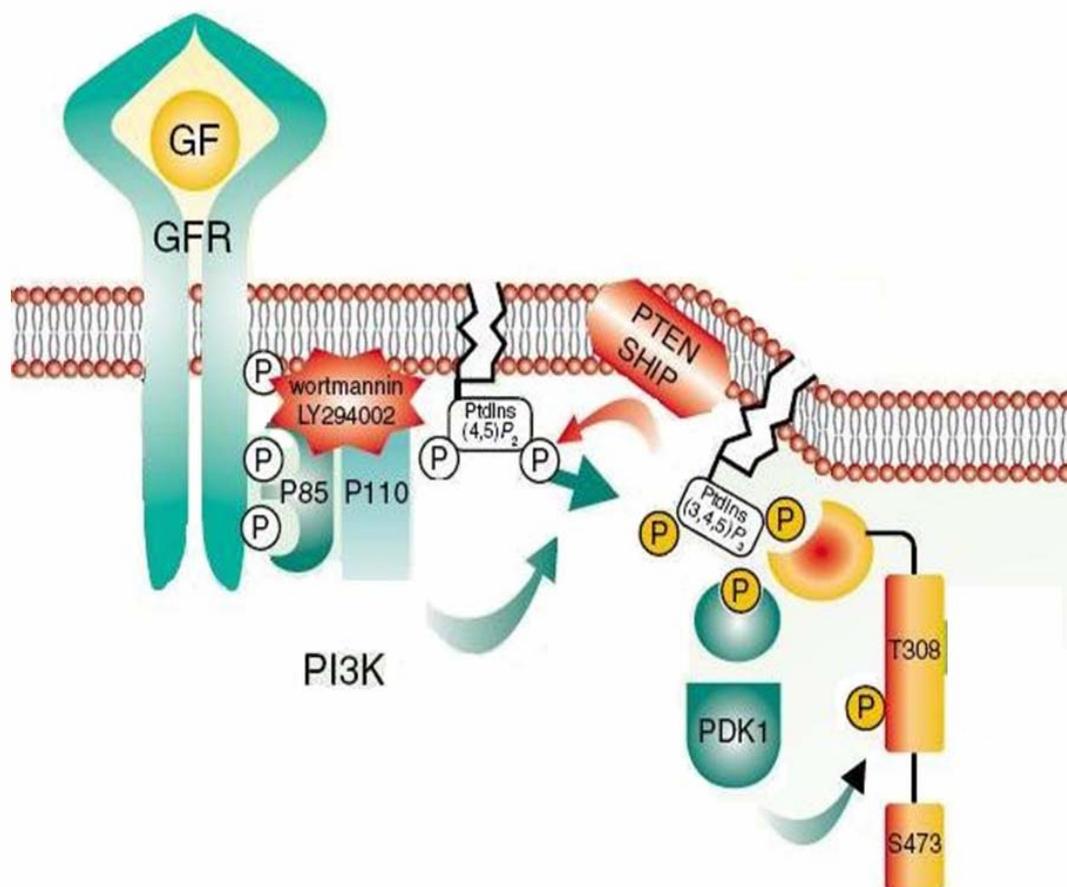


Figura 6. Fosforilação da Akt/PKB no resíduo treonina 308.

A fosforilação do resíduo treonina 308 (T308) ocorre por ligação do domínio PH da Akt/PKB aos fosfoinosítídeos de membrana e por aumento da atividade da PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase). Essa fosforilação aumenta a atividade da Akt/PKB em 100 vezes. GF (Fator de crescimento), GFR (Receptor de Fator de Crescimento), PI3K (fosfatidilinositol 3 quinase), p85 (subunidade da PI3K), p110 (subunidade de PI3K), PtdIns (fosfatidilinositol), PTEN (*tumor suppressor phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten*) e SHIP (Inositol-5-fosfatase contendo domínios SH2) inibidores da fosforilação da Akt/PKB. Modificada de Fayard 2005.

2.3.4 Fosforilação do sítio Ser473 da Akt/PKB

A fosforilação do sítio Ser473 (no domínio regulatório) mantém-se controversa, e a identificação dessa quinase, que já foi chamada de PDK2, ou do mecanismo pelo qual ocorre a fosforilação do sítio Ser473 já sustentou muitas especulações (Brazil e Hemmings 2001; Fayard *et al.* 2005). Como mecanismos de autofosforilação da Akt/PKB (Toker e Newton 2000), ou PDK1 (Balendran *et al.* 1999), ou *integrin-linked kinase 1* (ILK1) (Persad *et al.* 2001), ou *Mitogen activated protein kinase activated protein kinase 2* (MAPKAPK2) (Alessi *et al.* 1996) ou *Protein Kinase C β II* (PKC β II) (Kawakami *et al.* 2004) ou *DNA Protein Kinase* (DNA-PK) (Feng *et al.* 2004) ou *Ataxia Telangiectasia Mutant* (ATM) (Viniestra *et al.* 2005), ou mais recentemente *rapamycin-insensitive mTOR complex TORC2* (Sarbasov *et al.* 2005)) foram indicados como a quinase responsável pela fosforilação do sítio Ser473. Possivelmente as condições fisiológicas celulares podem estar influenciando um contexto favorável para um desses agentes (figura 7). Sabe-se que a fosforilação desse sítio é fundamental para a ativação da Akt/PKB pois ela irá mudar sua conformação para um estado mais estável (Yang *et al.* 2002). Uma vez ativada a Akt/PKB pode se translocar da membrana plasmática para o citoplasma ou para o núcleo celular (Andjelkovic *et al.* 1999).

2.3.5 Proteínas que se ligam e regulam a Akt/PKB

Tem se descrito muitas proteínas que interagem com a Akt/PKB, muitas não alteram sua atividade de quinase. Outras porém, demonstram habilidade de se ligar e alterar o estado de fosforilação dos sítios Thr308 e Ser473. Elas podem estar

inibindo a como a CTMP (*carboxy-terminal modulator protein*), a Trb3 (Mammalian homologue tribblets) e a Keratin K10 e outras que a regulam positivamente como HSP90, HSP27, Tcl1, Grb10, Ff1 (Fayard *et al.* 2005; Song *et al.* 2005) (figura 7). A proteína CTMP tem capacidade de se ligar na porção carboxi-terminal da Akt/PKB e diminuir a fosforilação de ser473, diminuindo a capacidade tumoral em camundongos (Maira *et al.* 2001). A Trb3 pode se ligar ao domínio quinase da Akt/PKB e inibir essa via, aumento na expressão de Trb3 diminuem de maneira dependente a fosforilação da Akt/PKB (Du *et al.* 2003). A Keratin K10 é uma proteína do citoesqueleto e pode seqüestrar a Akt/PKB inibindo a sua translocação e atividade, inibindo assim a proliferação celular (Paramio *et al.* 2001).

As moléculas da família HSP, as quais são induzidas por choque térmico e agem alterando o estado conformacional e estabilizam ou desestabilizam proteínas sobre estresse extracelular, parecem regular positivamente a Akt/PKB. A HSP27 ativa essa via e inibe a apoptose em neutrófilos (Rane *et al.* 2003). A HSP90 age como uma quinase para sítios de fosforilação em serina/treonina e tirosina, sendo que a inibição da HSP90 leva a degradação da Akt/PKB (Solit *et al.* 2003). A Grb10 (*Growth Factor Receptor-Bound Protein 10*) recruta a Akt/PKB para membrana plasmática em resposta a ativação de receptores de citocinas (Jahn *et al.* 2002). A Tcl1 (*T cell leukaemia 1*) está aumentada em células T e B malignas (Auguin *et al.* 2004). A Ft1 (*Fused toes protein 1*) liga-se a Akt/PKB e aumenta a fosforilação dos sítios de serina e treonina e promove interação com a PDK1 (Remy e Michnick 2004).

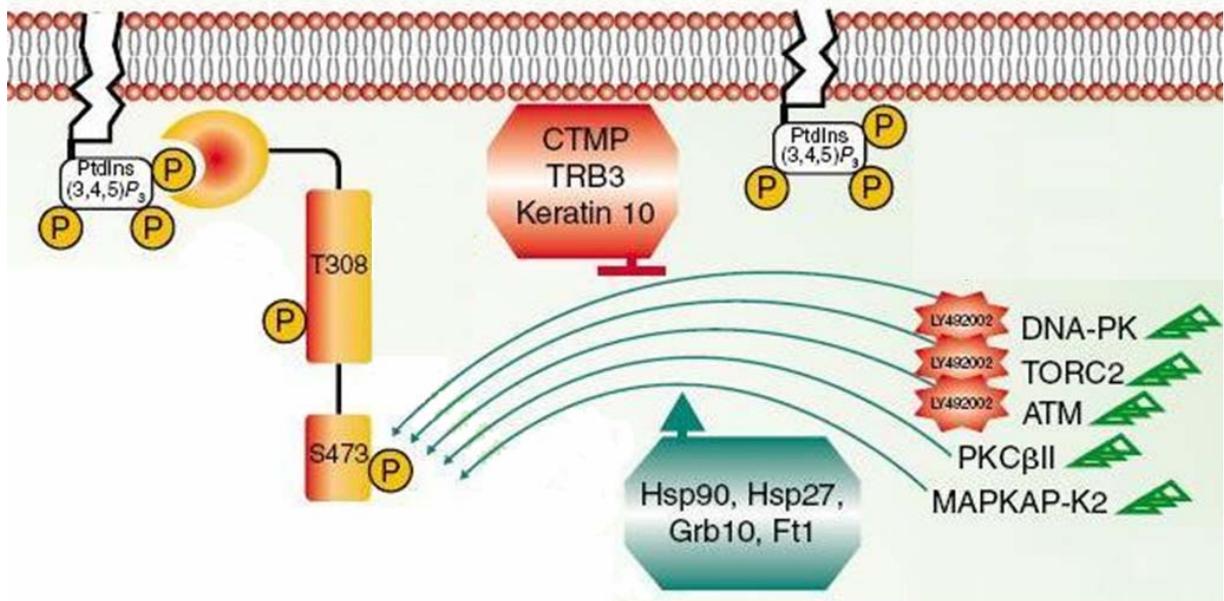


Figura 7. Fosforilação do resíduo serina 473 (S473).

Diversas proteínas quinases têm sido sugeridas como responsáveis pela fosforilação desse sítio, como DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*), TORC2 (*Target of rapamycin complex 2*), e ATM (*ataxia telangiectasia mutant*) que são inibidas por LY492002; PKCβII (*Protein kinase C βII*) e MAPKAP-K2 (*mitogen activated protein kinase activated protein kinase 2*), sendo que essas variações podem estar relacionadas ao estado de estímulo da célula. As proteínas CTMP (*carboxy-terminal modulator protein*), a Trb3 (*Mammalian homologue tribblets*) e a *Keratin K10* inibem o estado ativo da Akt/PKB por inibirem essa fosforilação, já as *heat shock proteins* 90 e 27 (HSP 90 e 27), Grb10 (*Growth Factor Receptor-Bound Protein 10*) e Ft1 (*Fused toes protein 1*) aumentam esse estado de fosforilação. Modificada de Fayard 2005.

2.4 SINALIZACAO DA VIA *DOWNSTREAM* DA AKT/PKB

Uma vez ativada pela fosforilação dos resíduos Thr308 e Ser473 a Akt/PKB pode fosforilar substratos no citoplasma celular ou se translocar para o núcleo (Andjelkovic *et al.* 1999). Um motivo mínimo de reconhecimento para substratos da Akt/PKB foi descrito por Alessi e colaboradores em 1996 (Alessi *et al.* 1996), sendo a seqüência de aminoácidos descrita R-X-R-X-X-S/T-B, onde X representa qualquer aminoácido, B representa resíduos hidrofóbicos, R como arginina na posição -5 e -3, S como serina e T como treonina. Essa seqüência ainda hoje é a maior ferramenta para busca e identificação de substratos da Akt/PKB. Em uma revisão criteriosa, onde se levou em conta alterações no grau de fosforilação em modelos com aumentos e diminuição da expressão da Akt/PKB, bloqueio das vias através de inibidores como *wortmannin* e *LY294002*, fosforilação do sítio R-X-R-X-X-S/T *in vitro*, Manning e Cantley (2007) descreveram 18 substratos, entre os mais de cem encontrados na literatura, bem definidos que traduzem as funções da Akt/PBK (Manning e Cantley 2007) (figura 8).

| Substrato | Sítio(s) Humano(s)^a | Efeito Regulatório^b |
|---------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| FOXO1 | T24, S256, S319 | Inibição |
| FOXO3A | T32, S253, S315 | Inibição |
| FOXO4 | T32, S197, S262 | Inibição |
| TSC2 | S939, T1462 | Inibição |
| GSK3 α/β | S21/S9 | Inibição |
| RAF1 | S259 | Inibição |
| PRAS40 | T246 | Inibição |
| AS160 | S588, T642 | Inibição |
| BAD | S99 | Inibição |
| WNK1 | T60 | ? |
| MDM2 | S166, S186 | Ativação |
| Chk1 | S280 | Inibição |
| eNOS | S1177 | Ativação |
| ASK1 | S83 | Inibição |
| IKK α | T23 | Ativação |
| p21CIP1 | T145 | Inibição |
| p27KIP1 | T157 | Inibição |
| Casp9 | S196 | Inibição |

Figura 8. Substratos da Akt/PKB.

^aNúmero do sítio(s) fosforilado(s) pela Akt/PKB, sendo S = serina e T = treonina.

^bEfeito regulatório causado pela fosforilação do substrato no respectivo sítio. Sendo as funções desse substrato ativada ou inibida. Adaptada de Manning, 2007.

Esses principais substratos da Akt/PKB conferem a ela várias funções celulares como, controle do metabolismo, da sobrevivência, da captação de glicose, na proliferação, no crescimento, e na angiogênese. Redes intrincadas de vias de sinalização conferem a vários substratos da Akt/PKB a participação em mais de uma dessas funções como demonstra a figura 9.

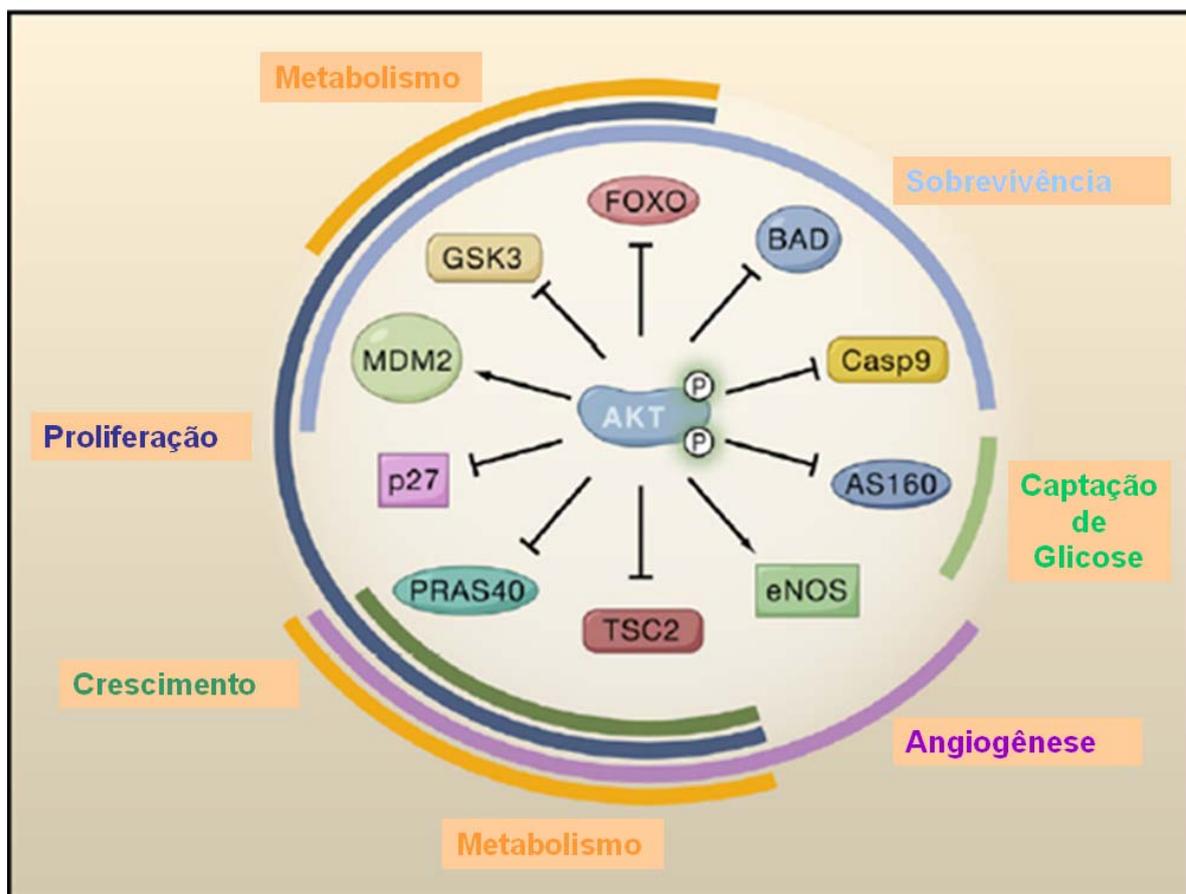


Figura 9. Ações dos substratos sobre as funções celulares.

O diagrama mostra que a fosforilação de um substrato da Akt/PKB pode inibir (seta interrompida) ou estimular (seta) suas funções, sendo que essa fosforilação irá repercutir em uma ou mais funções celulares. Adaptada de Manning e Cantley, 2007.

2.4.1 Regulação do metabolismo e captação de glicose estimulada por pela Akt/PKB

A principal função fisiológica da Akt/PKB é a regulação do metabolismo celular. Quando elevados níveis de insulina estão presentes, a glicogênio sintase quinase (GSK3) é inibida por fosforilação pela Akt/PKB, resultando em estoque de

glicose e síntese de glicogênio, pois a GSK3 inibe a Glicogênio Sintase (GS), sendo assim inibição da GSK3 aumenta a atividade da GS.

Em resposta a insulina a via da Akt/PKB, principalmente a isoforma Akt2, está associada aos transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT4) (Kohn *et al.* 1996) AS160 (*Akt substrate 160 kDa*), também conhecida como TBC1, parece estar envolvida nesse processo, entretanto, os mecanismos precisos não estão bem esclarecidos (Eguez *et al.* 2005). A GSK3 está envolvida ainda na regulação do metabolismo dos lipídeos, pois ela degrada SREBPs (*sterol regulatory element-binding protein*) que são fatores que aumentam a expressão de genes envolvidos na biossíntese de lipídeos. Sendo assim, a Akt/PKB medeia a inibição da GSK3 e promove a estabilidade de SREBPs, aumentando a produção de lipídeos (Manning e Cantley 2007).

2.4.2 Regulação da Akt/PKB na sobrevivência e proliferação celular

A Akt/PKB-PI3K é a principal via que medeia a sobrevivência celular, sendo que desde os primeiros trabalhos publicados até recentemente, relaciona-se essa via com tumores e câncer (Song *et al.* 2005). A Akt/PKB tem efeito direto na via da apoptose celular, ligando-se a BAD (*pro-apoptotic Bcl-2 related protein*) membro da família Bcl-2. A BAD se liga ao Bcl-2 e Bcl-x e inibe o efeito anti-apoptótico dessas proteínas. Porém, quando a Akt/PKB se liga na BAD, ocorre a fosforilação do sítio Ser136 inibindo-a, permitindo assim uma maior atividade anti-apoptótica pelas proteínas Bcl-2 e Bcl-x (Datta *et al.* 1997; del Peso *et al.* 1997). Foi descrita a

capacidade de fosforilação pela Akt/PKB do sítio ser196 da caspase-9 humana, uma proteína que age como iniciadora do efeito apoptótico, sendo que essa fosforilação resulta em inatividade dessa proteína (Cardone *et al.* 1998). A Akt/PKB inativa também proteínas da via de sinalização da SAPK (*stress-activated protein kinase*) que agem em resposta ao estresse celular e a citocinas. As proteínas, ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) fosforilada por Akt/PKB em Ser83, MLK3 (*mixed lineage kinase 3*) em Ser674 e SEK1/MKKK4 (*Similar to the MAP kinase kinase kinases*) em Ser78, são inibidas por essa interação e diminuem o efeito apoptótico dessa via (Kim *et al.* 2001; Johnson e Lapadat 2002; Park *et al.* 2002; Barthwal *et al.* 2003).

A Akt/PKB tem como substratos proteínas que alteram a transcrição pró- e anti-apoptótica. Entre estas proteínas está a família *Forkhead*, conhecida também como FoxO ou FH, que é constituída por fatores de transcrição de genes para proteínas que inibem a sobrevivência celular. As quatro isoformas descritas dessa família são alvo da Akt/PKB e são fosforiladas, inibindo a transcrição de fatores pró-apoptóticos (Burgering e Medema 2003). O Nf- κ B (*transcription factor nuclear factor- κ B*) é um importante regulador da resposta imune e sua desregulação está envolvida em doenças auto-imunes e câncer. Sua ativação depende da fosforilação do complexo I κ B quinase (IKK) que desliga o I κ B, um inibidor que está ligado ao NF- κ B, levando a uma liberação do NF- κ B que se transloca para o núcleo e ativa a transcrição de genes pró-sobrevivência celular (Barkett e Gilmore 1999). O Mdm2 (*murine double minute 2*) é um oncogene induzido por p53. O p53 é um importante regulador da morte celular induzida por estresse. A Akt/PKB fosforila o Mdm2 em

dois resíduos Ser166 e Ser186 resultando em inativação e degradação do p53, e conseqüente inibição de morte celular (Gottlieb *et al.* 2002).

A GSK3 está envolvida em outras vias de sinalização e mostrou ser um fator de proteção contra apoptose em muitas circunstâncias. A diminuição da oferta de fatores de crescimento para células leva a uma redução da habilidade de utilizar nutrientes, resultando em depleção de ATP intracelular, a Akt/PKB pode permitir a continuidade da captação celular de glicose e aminoácidos, prevenindo a indução de fatores apoptóticos que ocorrem nessa situação (Song *et al.* 2005). O MCL-1, um membro antiapoptótico da família Bcl-2, descrito recentemente, é inibido pela GSK3, a ativação da via Akt/PKB inibe a GSK3 e diminui a inibição ao MCL-1 (Maurer *et al.* 2006).

A Akt/PKB fosforila a p27 (no resíduo thr157) e p21 (no resíduo Thr145) e promove a inibição dos seus efeitos no núcleo. Esses efeitos são de inibição ao ciclo-celular. A inibição dessas proteínas inibidoras estimula então o ciclo-celular. A Akt/PKB, pode também, inibir a expressão de p21 através da fosforilação de Mdm2 (*murine double minute 2*) que degrada a p53 que por sua vez é um fator de transcrição para p21 (Mayo e Donner 2001; Zhou *et al.* 2001).

2.4.3 Regulação do crescimento celular estimulado pela Akt/PKB

Muitos trabalhos apontam como função primordial da via de sinalização da Akt/PKB o crescimento celular, relacionado ao aumento do volume celular, descrito comumente em células tumorais (Shaw e Cantley 2006; Manning e Cantley 2007). A principal via apontada como responsável pelo crescimento celular é a via do mTOR (*mammalian target of rapamycin*), essa via regula diretamente a síntese de proteínas, o ciclo-celular e o metabolismo celular (McCormick 1999; Luo *et al.* 2003). O mTOR é composto de dois complexos, mTORC1 ou Raptor que é inibido por *rapamycin*, e mTORC2 ou Rictor, que não é afetado por essa droga. Supressores tumorais TSC1 (*tuberous sclerosis complex 1*) também conhecido como *hamartin*, TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*) conhecido como *tuberin* e LKB1 (*serine/threonine kinase 1*) atenuam a sinalização do mTOR em algumas condições celulares como falta de nutrientes. A Akt/PKB ativa o mTORC1 através da fosforilação e inibição do TSC2, e ainda descrito recentemente, através da fosforilação e inibição PRAS40 (*proline-rich Akt substrate of 40 kDa*) que inibe o mTORC1. Os mecanismos pelo qual o mTORC1 aumenta a síntese protéica, os processos anabólicos e promove aumento do tamanho celular são pouco conhecidos (Plas e Thompson 2005).

2.4.4 Regulação da angiogênese estimulada pela Akt/PKB

A via da Akt/PKB tem importante papel na fisiologia e fisiopatologia da angiogênese. A eNOS (*endothelial nitric oxide syntase*) enzima que promove a liberação de Oxido Nítrico (NO) é ativada diretamente por fosforilação de seu resíduo ser1177 (Dimmeler *et al.* 1999) pela Akt/PKB ativada. A ativação da eNOS libera NO e produz vasodilatação, estimula o remodelamento vascular e a angiogênese (Morbideilli *et al.* 2003).

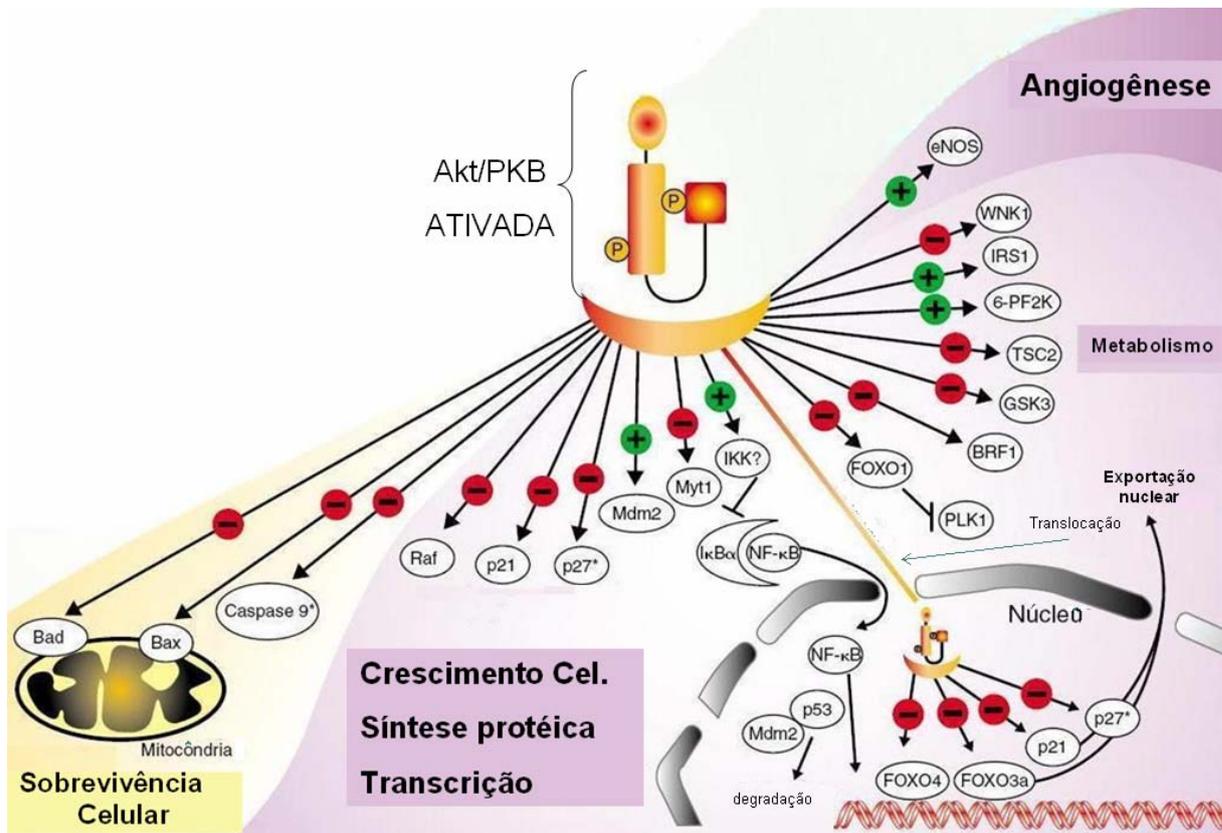


Figura 10. Via *downstream* da Akt/PKB.

A figura mostra vários dos substratos da Akt/PKB sendo inibidos (-) ou ativados (+). Substratos conforme lista de abreviaturas na página 9. Modificada de Fayard, 2005 (Fayard *et al.* 2005).

Como já descrito nessa introdução a Akt/PKB tem como funções primordiais; regulação da sobrevivência, do crescimento, do metabolismo e da apoptose celular, bem como, o a regulação da síntese protéica, transcrição e angiogênese . Essas funções serão reguladas pelos substratos da Akt/PKB que irão atuar no citoplasma ou no núcleo celular (figura 10).

Muitas dessas funções estão relacionadas a possíveis mecanismos fisiopatológicos que podem estar envolvidos na fisiopatologia da pré-eclâmpsia, sendo assim, a avaliação da via da Akt/PKB e a atividade dos seus substratos - em tecidos como a placenta (principal foco de pesquisa em pré-eclâmpsia) e tecidos alvo da insulina com o músculo esquelético e o tecido adiposo - pode elucidar o envolvimento dessa importante proteína sinalizadora na fisiopatologia da pré-eclâmpsia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a expressão basal da Akt/PKB, proteínas que regulam sua atividade e de seus substratos em placenta, músculo esquelético e tecido adiposo de parturientes normais e com pré-eclâmpsia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Investigar a expressão basal das proteínas IR β , IRS-1 e p85 (via *upstream* da Akt/PKB) em placenta, músculo esquelético e tecido adiposo de parturientes normais e com pré-eclâmpsia.
- ✓ Comparar a atividade basal da Akt/PKB total e fosforilada em serina 473 e treonina 308 em placenta, músculo esquelético e tecido adiposo de parturientes normais e com pré-eclâmpsia.
- ✓ Investigar a expressão basal da HSP90 em placenta e músculo esquelético de parturientes normais e com pré-eclâmpsia.
- ✓ Comparar a atividade basal dos substratos da Akt/PKB fosforilados em serina e treonina em placenta e músculo esquelético de parturientes normais e com pré-eclâmpsia.
- ✓ Comparar a atividade basal dos substratos da Akt/PKB: GSK3 β , Pras40 e FKHD/FOXO1 em placenta de parturientes normais e com pré-eclâmpsia.

4 MÉTODO

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo do tipo caso-controle.

4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRAS

Participaram desse trabalho 17 pacientes controle normais e 17 pacientes com pré-eclâmpsia. As amostras de placenta, gordura abdominal e músculo abdominal (reto ou piramidal) foram coletadas durante cesariana no Centro Obstétrico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período de abril de 2004 a abril de 2005.

Informações como idade, utilização de medicação hormonal, história de *diabetes mellitus* na família, antecedentes gineco-obstétricos, glicemia de jejum, pressão arterial, proteinúria, dados do teste de tolerância a glicose e tempo de gestação foram coletadas momentos antes do parto (Anexo 1).

4.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

As indicações de cesariana foram obstétricas, não tendo relação com este estudo. Esse trabalho foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (projeto de pesquisa número 03-371). As pacientes foram informadas sobre objetivos e riscos do projeto e foram incluídas apenas aquelas que concordaram em participar assinando termo de consentimento informado (Anexo 2).

Houve alterações nos objetivos e título desse trabalho após o período de coleta, porém sem comprometimento ético.

4.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Aproximadamente 3 gramas de placentas, foram obtidos imediatamente após o parto, lavadas com PBS (4°C) para retirada do excesso de sangue, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em -80°C. O mesmo procedimento foi executado com as amostras de músculo e gordura, porém esses tecidos foram coletados em menor quantidade (cerca de 1 g), pois a placenta é um tecido descartado após o parto e oportuniza a obtenção de uma maior quantidade de material.

Parte dos tecidos foi enviada, em gelo seco, para o Laboratório de pesquisa em Endocrinologia, no Hospital BG-Kliniken Bergmannsheil - Universitätsklinik Medical Clinic I, em Bochum – Alemanha, onde foram realizados os experimentos.

4.5 TESTE DOS ANTICORPOS PARA AKT/PKB FOSFORILADA

Devido à falta de sinal para os anticorpos que detectam Akt/PKB fosforilada nos resíduos de ser473 e thr308, desenvolvemos um experimento para testar os anticorpos específicos, bem com a sensibilidade da técnica. Para isso utilizamos uma linhagem de células malignas hepáticas (HepG2 human hepatocarcinoma cells), mantidas em meio de cultura e soro bovino fetal em placas de cultura com seis poços. No momento da estimulação com insulina foi trocado o meio de cultura e adicionado 2 mL de solução PBS (salina tampão fosfato) com concentração final insulina de 10^{-7} M em três dos seis poços, sendo que aos outros foi adicionado 2 mL de solução com a mesma concentração de albumina, placas então foram colocadas

a 36°C por três minutos e a estimulação foi parada em gelo. A extração das proteínas das células seguiu o mesmo protocolo dos tecidos, bem como as outras etapas do experimento.

4.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA

Para extração protéica, os tecidos foram homogeneizados em tampão contendo HEPES (50 mmol/L), NaCl (150 mmol/L), EGTA (1 mmol/L), glicerol 10 % (v/v), NaF (100 mmol/L), pirofosfato de sódio (10 mmol/L), ortovanadato de sódio (100 µmol/L), aprotinina (10 µg/mL), Igepal 1% (v/v), com pH = 7,2.

Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas a 13000 x g, coletado o sobrenadante, em seguida 10 µL de amostra foram coletados para quantificação de proteína com kit BCA test PIERCE®. A quantidade de proteína das amostras foi analisada por leitura de espectrometria com comprimento de onda de 470 nm. Todas as amostras foram testadas em duplicata, com 5 µL de amostra e 995 µL de solução do kit BCA test PIERCE®, e comparadas com curva padrão de albumina. A quantidade de proteína carregada nos géis foi de 50 µg.

O número de amostras analisado para expressão de cada proteína nos tecidos variou conforme a disponibilidade de quantidade amostral, considerando que algumas amostras (placenta, ou tecido adiposo ou músculo esquelético) não foram enviadas para Alemanha, ou foram enviados em pequena quantidade sendo suficiente para algumas análises.

4.7 WESTERN BLOTS

As amostras foram desnaturadas com Rotilol- Roth[®] durante 7,5 minutos à 99°C. Foi utilizado Rotiphorese-Roth[®] (7,5-10% de acrilamida para eletroforese) para preparo do gel de eletroforese. As proteínas foram transferidas por sistema semi-seco para membranas de PVDF. As membranas foram bloqueadas por um hora com solução tampão (50 mM de NaCl, 50 mM de Tris-Base, 50 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 0,01 % (v/v) de metilhidroxibenzoato de sódio, 0,05 % (v/v) Triton X-100, 1 % de albumina bovina), em seguida, colocadas sob agitação em primeiro anticorpo em câmara fria (4°C) *overnight*. Anticorpos primários policlonais e monoclonais utilizados são descritos na tabela 1. Após a incubação com o primeiro anticorpo as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos (30 minutos) com a solução tampão descrita acima, e reincubadas com o segundo anticorpo (anti- Rabbit, Goat, ou Mouse da DakoCytomation[®]) por uma hora em temperatura ambiente e novamente, lavadas 3 vezes por 10 minutos (30 minutos). Em seguida, em câmara escura, expostas por aproximadamente 1 minuto a substância quimioluminescente PIERCE ECL WESTERN BLOT-PIERCE[®], colocadas em contato com filmes autoradiográficos (PIERCE[®]) por tempos que variaram de 15 segundos até 20 minutos de exposição. Os resultados da expressão protéica foram analisados pelo programa ImageJ[®] e são apresentados em unidades arbitrárias de intensidade (pixels).

Além da quantificação de proteína com o *kit BCA test* PIERCE[®] foi usada a expressão da α -tubulina para normalização dos resultados de expressão protéica.

Tabela 1. Anticorpos utilizados para realização dos *western blots* dos tecidos coletados de pacientes normais e com pré-eclâmpsia.

| Anticorpo | Atividade Imunológica | Fabricante | Catálogo |
|--------------------------------------|------------------------------|-------------------|-----------------|
| AKT- total | Policlonal | Cell Signaling® | 9272 |
| Fosfo-AKT (treonina 308) | Policlonal | Cell Signaling® | 9275 |
| Fosfo-AKT (serina 473) | monoclonal IgG | Cell Signaling® | 4058 |
| Fosfo-AKT (serina 473) | Policlonal | Cell Signaling® | 9271 |
| Fosfo-AKT (Ser/Thr) substrato | policlonal | Cell Signaling® | 9611 |
| Fosfo-Akt (Thr34) | policlonal IgG | Upstate® | 07-789 |
| GSK-3b (27C10) | monoclonal IgG | Cell Signaling® | 9315 |
| Hsp90 | policlonal | Abcam® | ab13495 |
| IRS-1 | policlonal IgG | Upstate® | 06-248 |
| IR (Ab-3) clone 29B4 | monoclonal IgG1 | Calbiochem® | GR07 |
| PI3 Kinase p85 total | policlonal | Upstate® | 06-195 |
| PRAS40 | monoclonal IgG1 kappa | Biosource® | AHO1031 |
| Fosfo-FOX01/FKHD (Ser319) | policlonal | Cell Signaling® | 2489 |
| Tubulina α | monoclonal | Santa Cruz® | 8035 |

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do *software* SPSS versão 15.0. Foi utilizado o teste de *Mann-Whitney*, para análise de variáveis numéricas não paramétricas, sendo os resultados mostrados em mediana e quartil 25-75% e teste t de *Student* para variáveis numéricas paramétricas com resultados demonstrados em média e desvio padrão. Foram considerados como significativos $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DAS PACIENTES

Os dados clínicos e antropométricos das pacientes estão apresentados em tabela no anexo 3. Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão. A média de idade e IMC não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos, sendo a idade de $27,05 \pm 7,81$ para normais e $26,29 \pm 8,16$ para PE com $p = 0,78$ e o IMC de $28,54 \pm 4,62$ para normais e $29,85 \pm 5,08$ para PE com $p = 0,43$. A idade gestacional foi significativamente menor no grupo PE ($236,82 \pm 21,31$ dias) quando comparado com as normais ($258,94 \pm 18,70$ dias) $p = 0,002$ (gráfico 1).

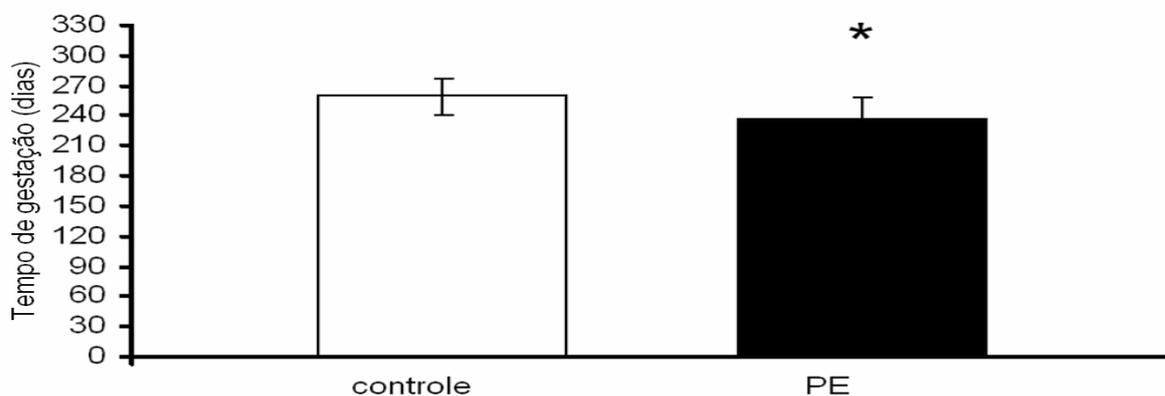


Gráfico 1. Tempo de gestação em dias.

Comparação entre as médias de PE (pré-eclâmpsia) (n=17) e controle (n=17) com diferença significativa, $p = 0,002$.

O teste de tolerância à glicose (mg/dL) nos dois grupos foi semelhante sendo de $103,97 \pm 20,39$ para normais e $90,58 \pm 33,70$ para PE com $p= 0,52$. A Glicemia de jejum (mg/dL) foi menor estatisticamente para o grupo normal com $78,21 \pm 7,24$ para e $91,09 \pm 22,36$ para PE com $p = 0,05$ (gráfico 2).

A análise dos resultados como teste de tolerância para glicose, glicemia de jejum e outros dados coletados avaliaram as pacientes que possuíam estes dados sendo que nem todas as pastas de dados continham todas as informações pacientes pacientes. Desse modo, os resultados mostram a análises com diferentes números de pacientes.

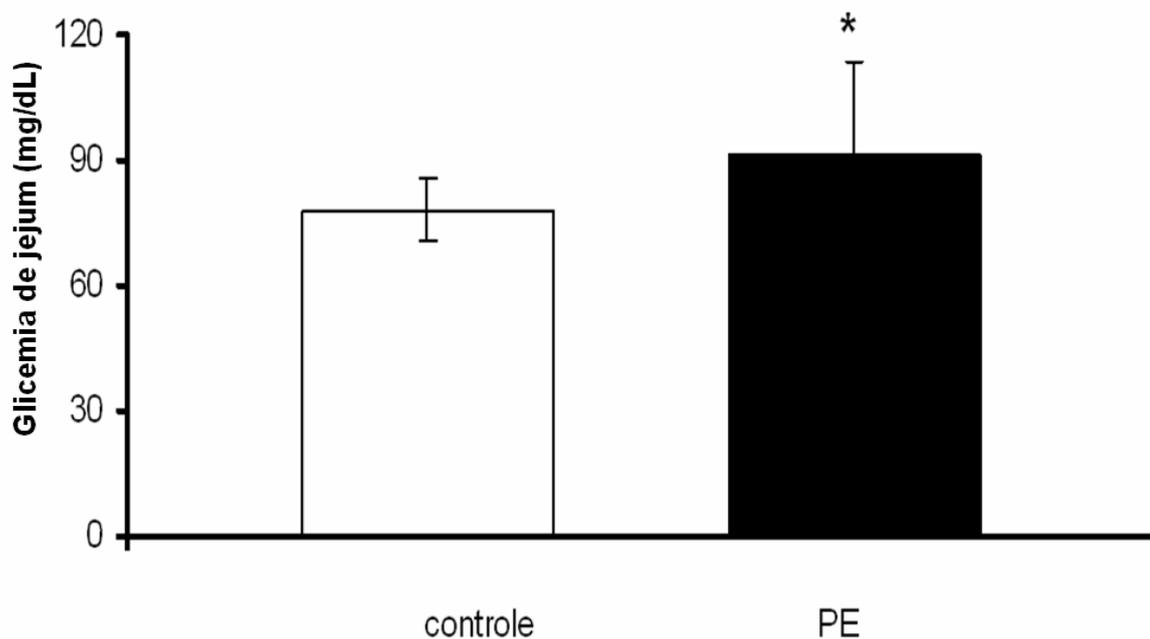


Gráfico 2. Glicemia de jejum.

Comparação entre as médias de PE (pré-eclâmpsia) (n=11) e controle (n=14) com diferença significativa, $p= 0,05$.

As pressões diastólica e sistólica foram significativamente mais elevadas nas pacientes com PE, sendo de $112,30 \pm 15,35$ em normais e $149,23 \pm 25,96$ em PE para pressão sistólica com $p = 0,001$ e $70,76 \pm 9,54$ em normais e $98,46 \pm 14,05$ em PE para pressão diastólica com $p = 0,001$ (gráfico 3).

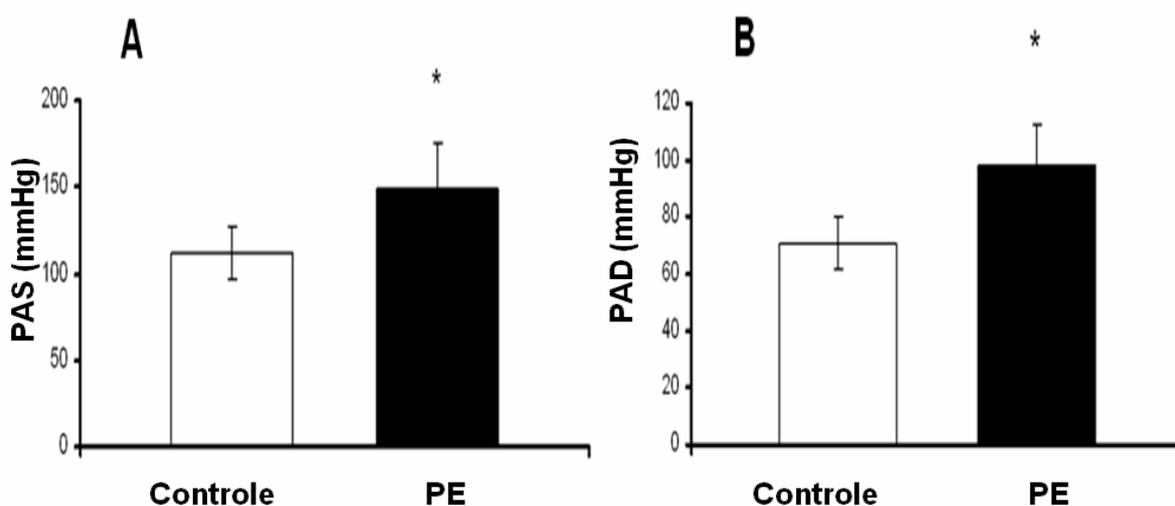


Gráfico 3. Pressão arterial sistólica e diastólica das pacientes normais e com PE.

(A) Comparação entre as médias da PAS (Pressão Arterial Sistólica) de pacientes controle (n=13) e PE (n=13) ($p < 0,001$). **(B)** Comparação entre as médias da PAD (Pressão Arterial Diastólica) em pacientes controle (n=13) e PE (n=13) ($p < 0,001$).

Das 17 pacientes com PE apenas duas não tiveram proteinúria acima de 0,3g/24h, porém tiveram o diagnóstico determinado por hipertensão arterial associada a sinais secundários. Das pacientes normais encontramos apenas uma que obteve proteinúria acima de 0,3g/24h, mas não se enquadrava em PE por obter níveis de pressão arterial normais.

5.2 TESTE DOS ANTICORPOS PARA AKT/PKB FOSFORILADA

A estimulação com insulina em cultura de células de carcinoma hepático humano foi bem sucedida, e mostrou que o sinal de pSerAkt/PKB, Akt fosforilada em serina 473, só está presente nas células estimuladas com insulina (figura 11).

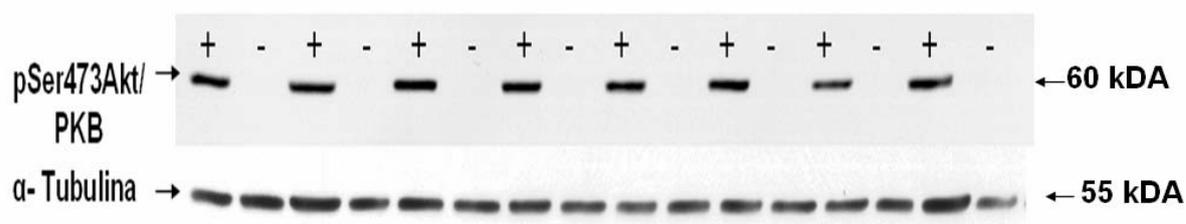


Figura 11. Teste dos anticorpos para Akt/PKB fosforilada.

Western blot de oito diferentes placas de cultura de células de carcinoma hepático, com anticorpo anti-fosfo Akt/PKB ser473, com evidente estimulação da fosforilação por insulina (+) e falta de sinal nas amostras não estimuladas (-). Foi usada como controle para normalização a proteína α -tubulina (55kDa).

5.3 EXPRESSÃO PROTÉICA EM PLACENTAS

Os resultados para expressão protéica em placentas são apresentados em mediana (percentil 25 % - 75 %) normalizados pela expressão da proteína constitutiva α -tubulina (55 kDa).

Em placentas a expressão da beta subunidade do receptor de insulina (IR β) foi de 4,78 (2,87 – 6,70) e 6,74 (4,47- 8,75), $p = 0,2$ para placentas pacientes normais, e com PE, respectivamente (figura 12). Para o IRS-1 foi de 0,47 (0,19- 1,05) e 0,33 (0,12- 0,57) para placentas pacientes normais (n=16) e com PE (n=11), respectivamente com $p = 0,36$ (figura 13).

Para a expressão de P85, subunidade regulatória da PI3- Kinase, as medianas foram de 1,12 (0,83- 1,62) para o grupo de pacientes normais, e 1,29 (0,89- 1,96) para PE com $p = 0,42$ (figura 14).

Para a Akt/PKB total foram de 1,85 (1,07- 3,12) para grupo normal (n=18) e 1,53 (1,27- 3,08) para PE com $p = 1,00$ (figura 15).

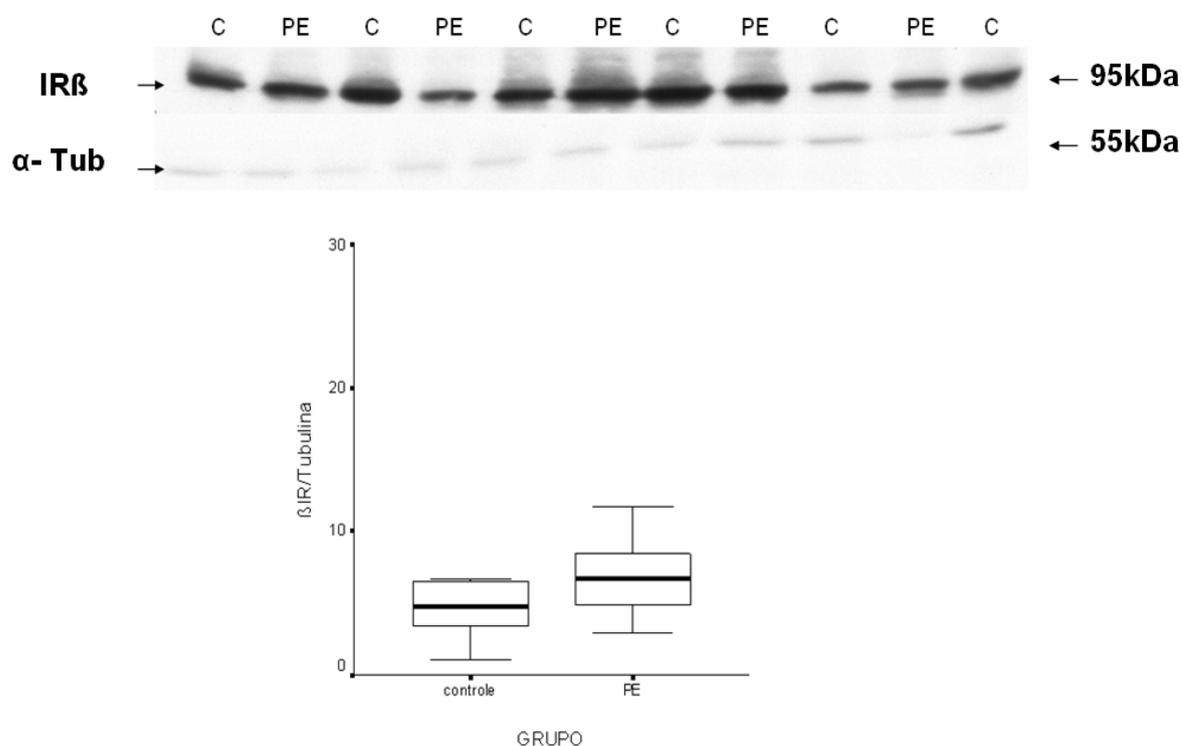


Figura 12. Expressão da beta subunidade do receptor de insulina IR β em placentas. Western blot representativo com anticorpo da beta subunidade do receptor de insulina - anti-IR β (95kDa) e anticorpo anti-alfa-tubulina (55kDa) para amostras de placenta de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) (n=11) e controles normais (C) (n=11). Não há diferença estatística significativa, com $p = 0,2$.

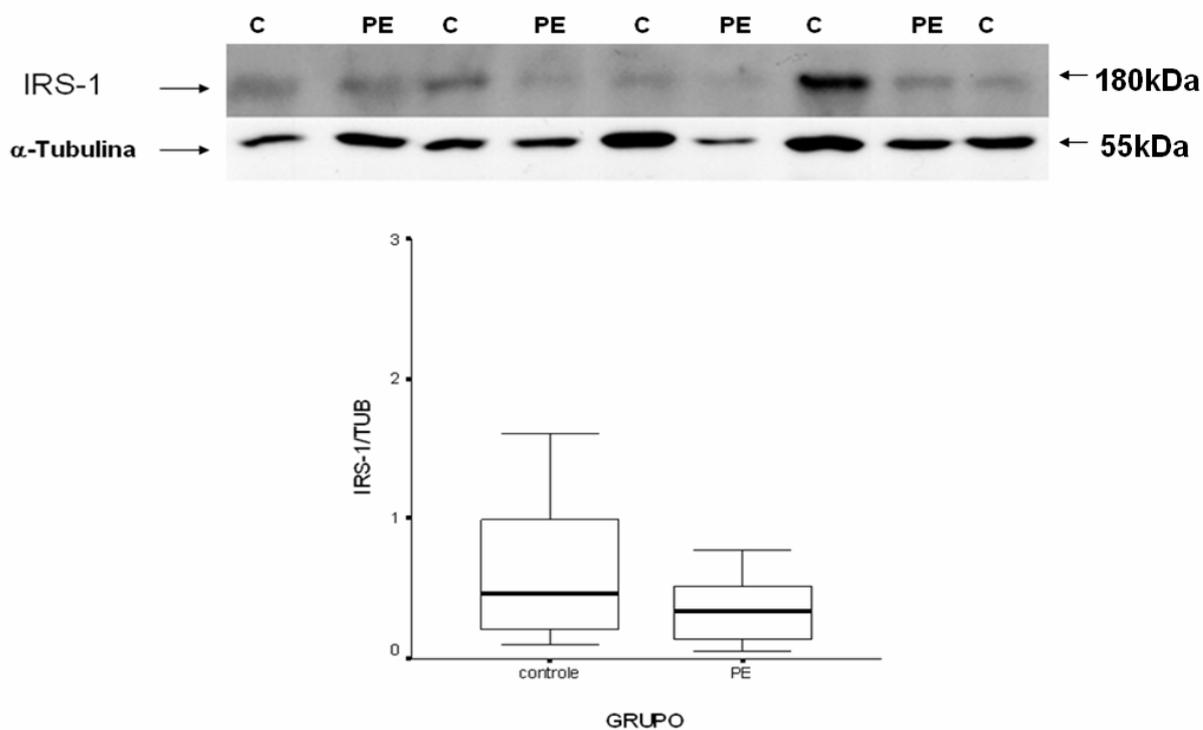


Figura 13. Expressão substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) em placentas. Western blot representativo com anticorpo anti-IRS-1 e anticorpo anti-alfa-tubulina (55kDa) para amostras de placenta de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) (n=11) e controles normais (C) (n=16). Não existe diferença estatística significativa, com $p = 0,36$.

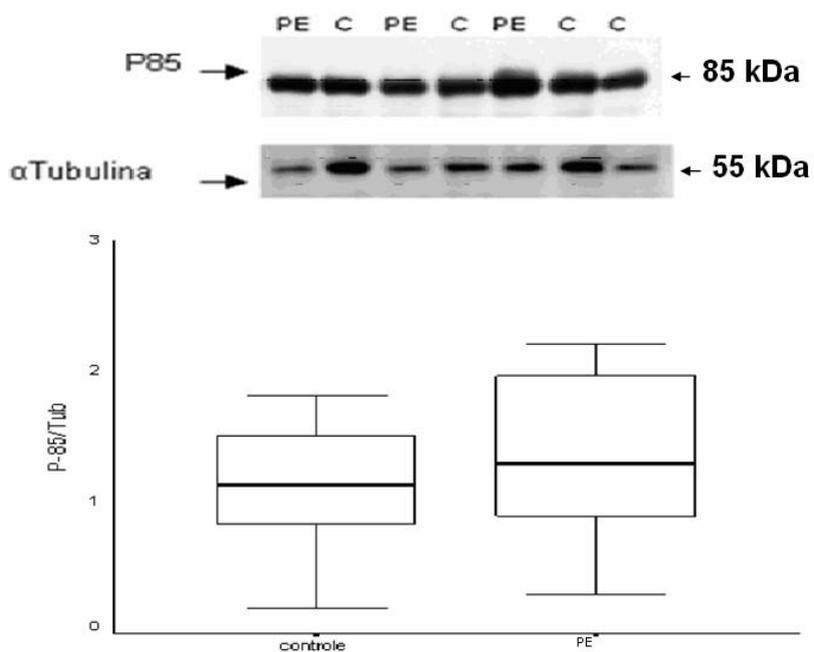


Figura 14. Expressão da P85 em placentas.

Western blot representativo com anticorpo anti-subunidade p85 e anticorpo anti-alfa-tubulina (55kDa) para amostras de placenta de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) (n=16) e controles normais (C) (n=16). Não há diferença estatística significativa, com $p = 0,42$.

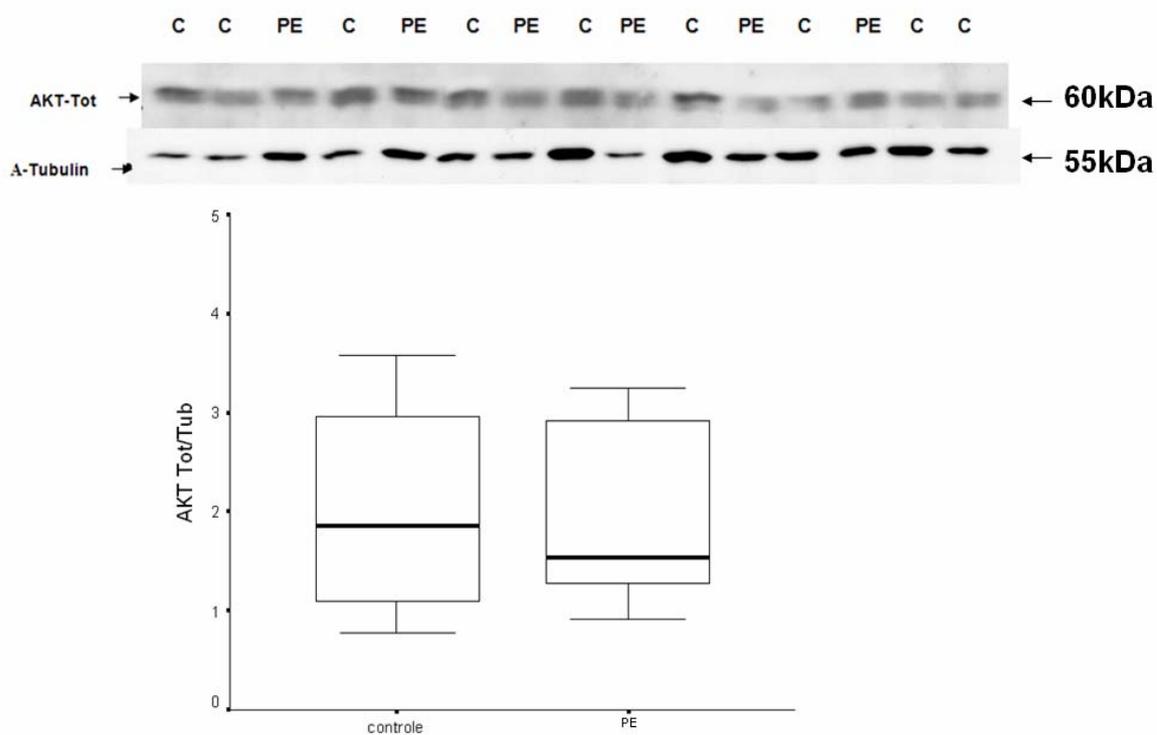


Figura 15. Expressão da Akt/PKB em placentas.

Western blot representativo com anticorpo anti-Akt/PKB total e anticorpo anti-alfa-tubulina (55kDa) para amostras de placenta de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) (n=12) e controles normais (C) (n=17). Não há diferença estatística significativa, com $p = 1,00$.

Os substratos que se ligam na Akt/PKB e fosforilam em treonina e serina distribuindo os efeitos dessa via foram analisados, cinco bandas bem definidas foram visualizadas nas posições 30, 45-50 (banda dupla), 100, 160 kDa (Figura 16).

A comparação entre as medianas não mostrou diferença na fosforilação desses substratos. Para expressão do substrato de aproximadamente 30kDa para o grupo controle foi de 1,25 (0,39- 1,89) n= 16 e para o grupo PE (pré-eclâmpsia) 1,67 (0,90- 4,09) com p= 0,25. Para 50kDa as medianas foram de 3,59 (1,58- 6,59) n= 17, para o grupo controle e 3,41 (1,63- 5,94) n= 12 com p= 0,81. Para 100kDa as medianas foram de 0,89 (0,17- 2,20) n= 17 para controles e 0,51 (0,35- 1,34) n= 11 para PE com p= 0,58. Para 160kDa as medianas foram de 0,44 (0,24- 1,02) n= 8 para as controles e 0,46 (0,28- 0,63) n= 9 com p=0,81.

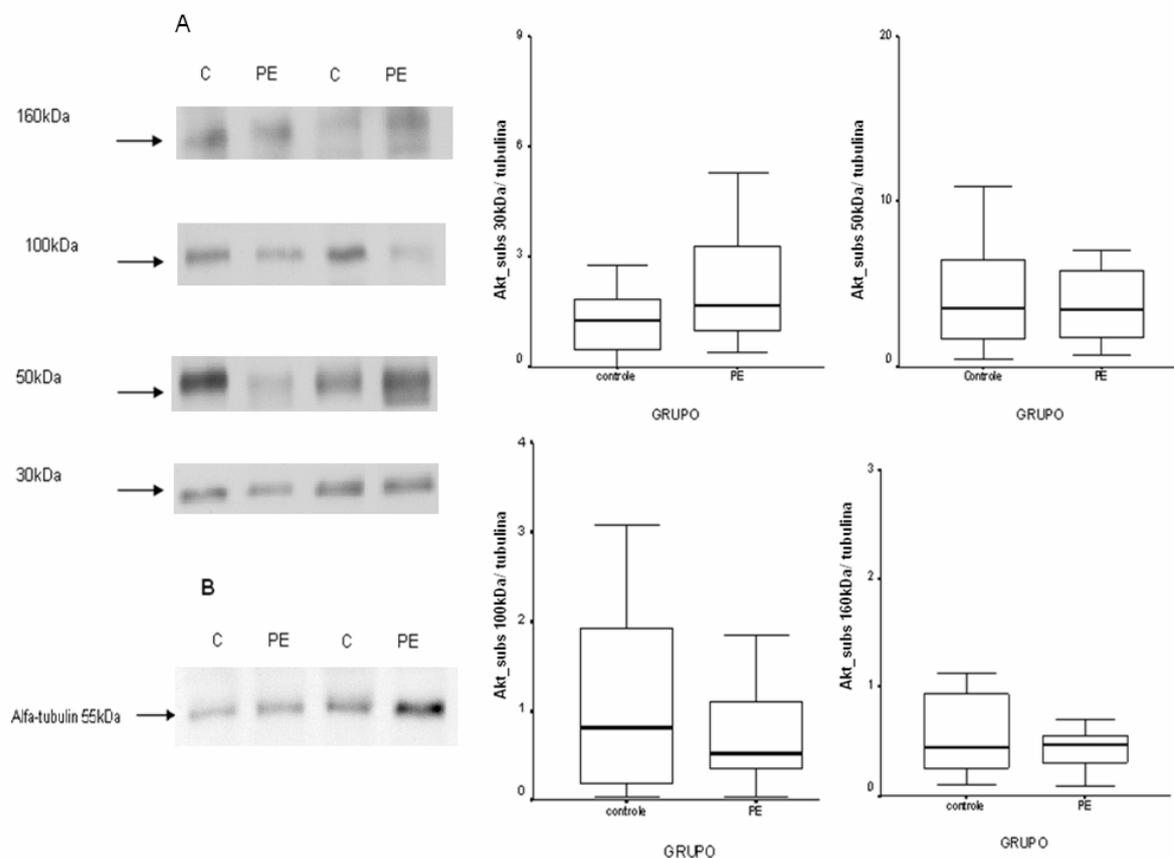


Figura 16. Expressão dos Substratos da Akt/PKB fosforilados em serina e treonina em placentas.

Western blot representativo com anticorpo anti-substratos da pAkt/PKB (serina/treonina) anticorpo anti-alfa-tubulina (55kDa) para amostras de placenta de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) e controles (C) normais. Quatro bandas bem definidas estavam presentes nas amostras, sendo sua posição no gel de acrilamida de, aproximadamente, 30 (n= 16), 50 (n= 17), 100 (n= 17) e 160 (n= 8) kDa. A comparação entre as medianas não mostrou diferença na fosforilação desses substratos.

A GSK3 β , proteína reconhecida como substrato da Akt/PKB, e HSP90, proteína que regula a Akt/PKB positivamente, foram analisadas com anticorpos específicos, sendo os resultados para GSK3 β de 2,87 (1,77- 5,70) para normais e 2,83 (1,58- 5,01) para PE com $p= 0,88$ (figura 17) e 1,55 (1,06- 2,82) para normais e 1,79 (1,40- 4,07) para PE com $p= 0,56$ na expressão da HSP90 (figura 18).

A expressão da FKHD ou FOX01 (*forkhead Box 01*) fosforilada em serina 319 não demonstrou diferença entre os grupos (figura 19), sendo o resultado da expressão normalizado pela alfa-tubulina em placentas de 0,75 (0,24- 1,12) $n= 16$ e 0,85 (0,25- 1,25) $n= 12$ para pacientes normais e com PE, respectivamente.

A expressão do substrato da Akt/PKB Pras40 em placenta (figura 20) normalizada pela alfa-tubulina foi de 3,27 (1,53- 9,15) $n= 16$ e 2,06 (1,07- 3,45) $n= 12$ para pacientes normais e com PE, respectivamente. Não havendo diferença estatística significativa, com $p = 0,26$.

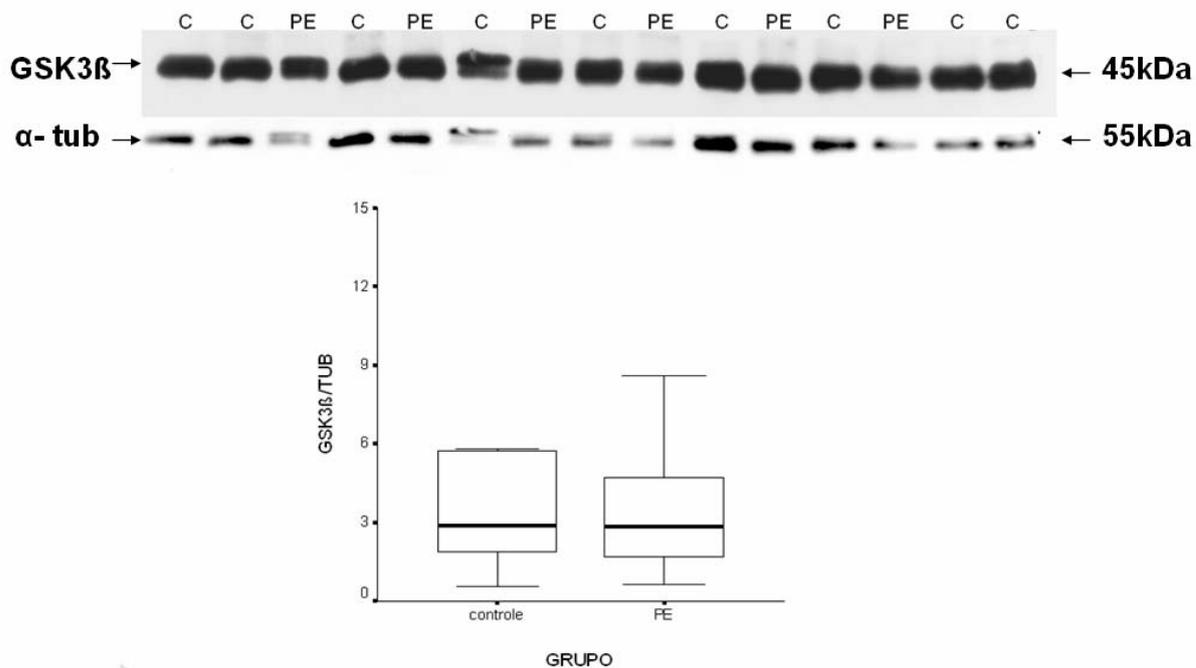


Figura 17. Expressão da GSK3β em placentas.

Western blot representativo com anticorpo anti-GSK3β e anticorpo anti-alfa-tubulina (55kDa) para amostras de placenta de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) (n=12) e controles normais (C) (n=17). Não há diferença estatística significativa, com $p = 0,88$.

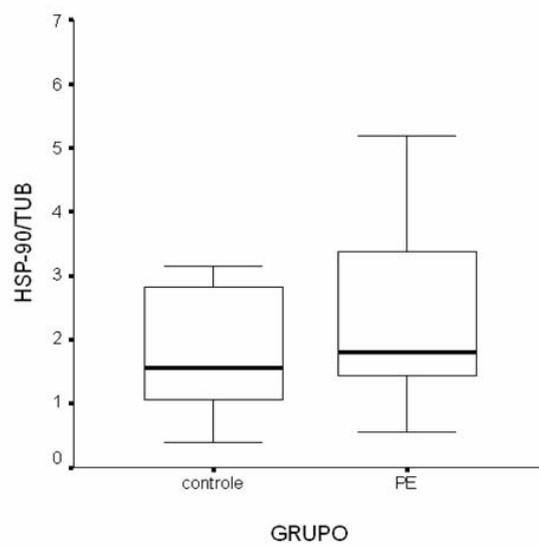
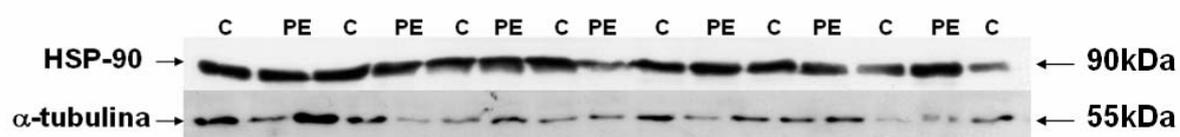


Figura 18. Expressão da HSP-90 em placentas.

Western blot representativo com anticorpo anti-HSP-90 e anticorpo anti-alfa-tubulina (55kDa) para amostras de placenta de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) (n=12) e controles (C) (n=16) normais. Não há diferença estatística significativa, com $p = 0,56$.

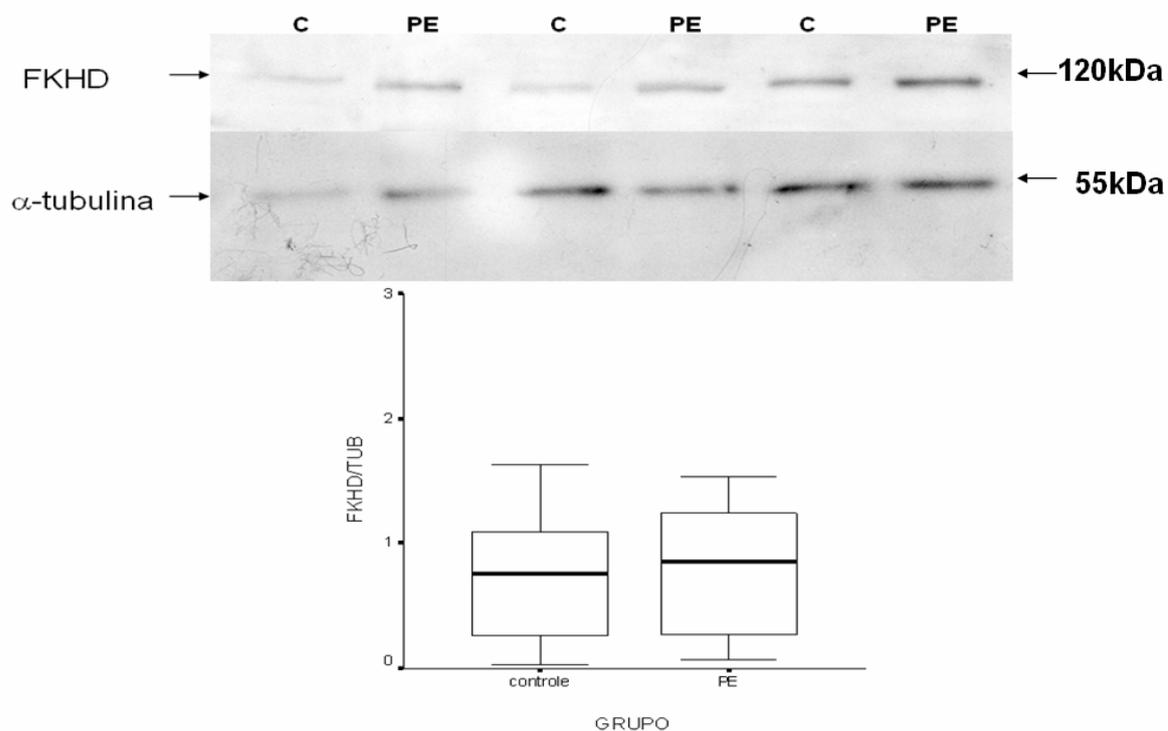


Figura 19. Expressão da FKHD em placentas.

Western blot representativo com anticorpo anti-pSer(319) FKHD ou FOXO1 e anticorpo anti-alfa-tubulina (55 kDa) para amostras de placenta de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) (n=12) e controles (C) (n=16) normais. Não há diferença estatística significativa, com $p = 0,72$.

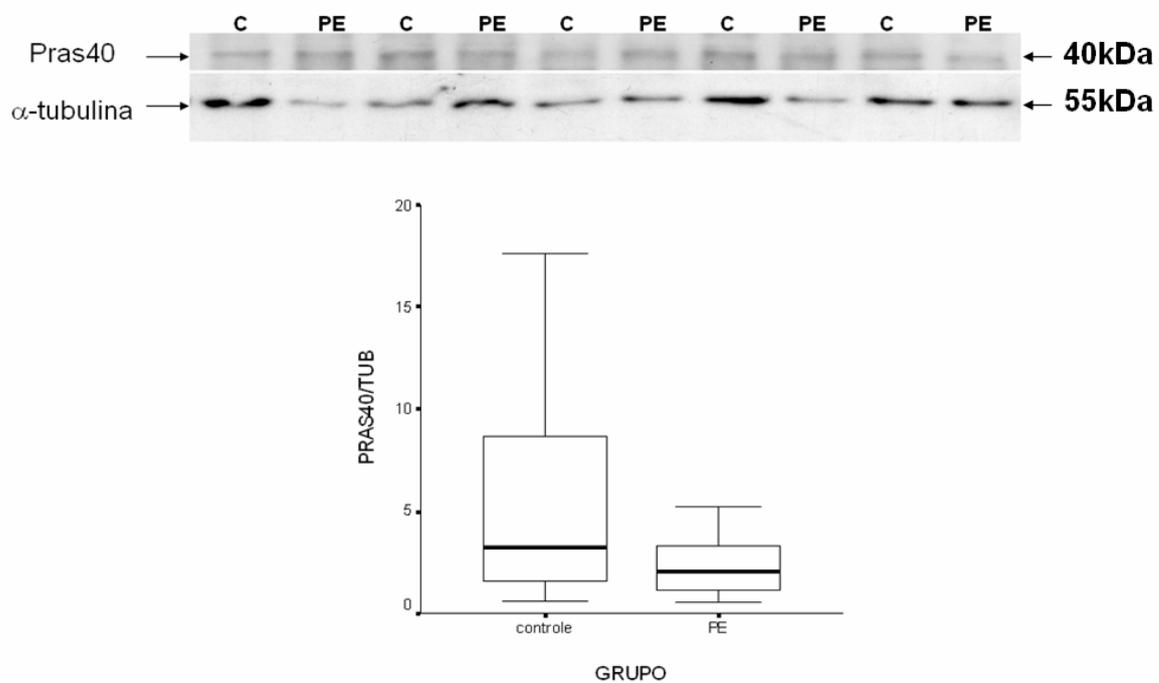


Figura 20. Expressão do Pras40 em placentas.

Western blot representativo com anticorpo anti-Pras40 e anticorpo anti-alfa-tubulina (55kDa) para amostras de placenta de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) (n=12) e controles (C) (n=16) normais. Não há diferença estatística significativa, com $p = 0,26$.

5.5 EXPRESSÃO PROTÉICA EM MÚSCULOS ESQUELÉTICOS

No músculo esquelético obtivemos sinal de expressão basal das proteínas em IR β , p85, Akt/PKB, Akt/PKB substratos fosforilados em serina e treonina, e HSP90, sendo que as outras proteínas foram testadas, porém sem sinalização visível nos *western blots*.

A expressão IR β foi de 1,58 (0,56 - 3,23) para pacientes normais e 2,00 (0,91 - 6,65) para pacientes com PE com $p = 0,56$ (Figura 21) Para P85 1,41 (1,20 - 6,29) para normais e 1,63 (1,32 - 1,90) para PE com $p = 0,91$ (Figura 22). Para a expressão da AKT a mediana em pacientes normais foi de 0,96 (0,84 - 1,31) e para pacientes com PE 1,55 (0,87 - 1,86) com $p = 0,41$ (Figura 23).

A expressão da HSP90 também não se mostrou diferente sendo de 1,41 (0,52- 1,81) para normais e 0,83 (0,65 - 2,38) para PE com $p = 0,53$ (Figura 24). Sendo que para os substratos da Akt/PKB (*phospho-AKT (Ser/Thr) substrate Antibody*) obtivemos duas bandas visíveis e bem definidas em 160 e 45-50kDa sem diferença estatística entre os grupos (Figura 25). A expressão do substrato em 45-50kDa (banda dupla que foi quantificada em conjunto, pois não apresentam diferenças quanto as suas expressões – dados não mostrados) normalizado pela alfa-tubulina em músculo esquelético foi de 1,34 (0,79- 1,49) $n = 11$ e 1,55 (1,14- 2,10) $n = 09$ para pacientes normais e com PE, respectivamente, com $p = 0,41$. A expressão do substrato 160kDa da Akt/PKB normalizado com alfa-tubulina foi de 1,17 (0,87- 1,60) em controles normais ($n=11$) e 1,09 (0,87- 1,72) em PE ($n=09$), sem diferença estatística ($p = 0,82$).

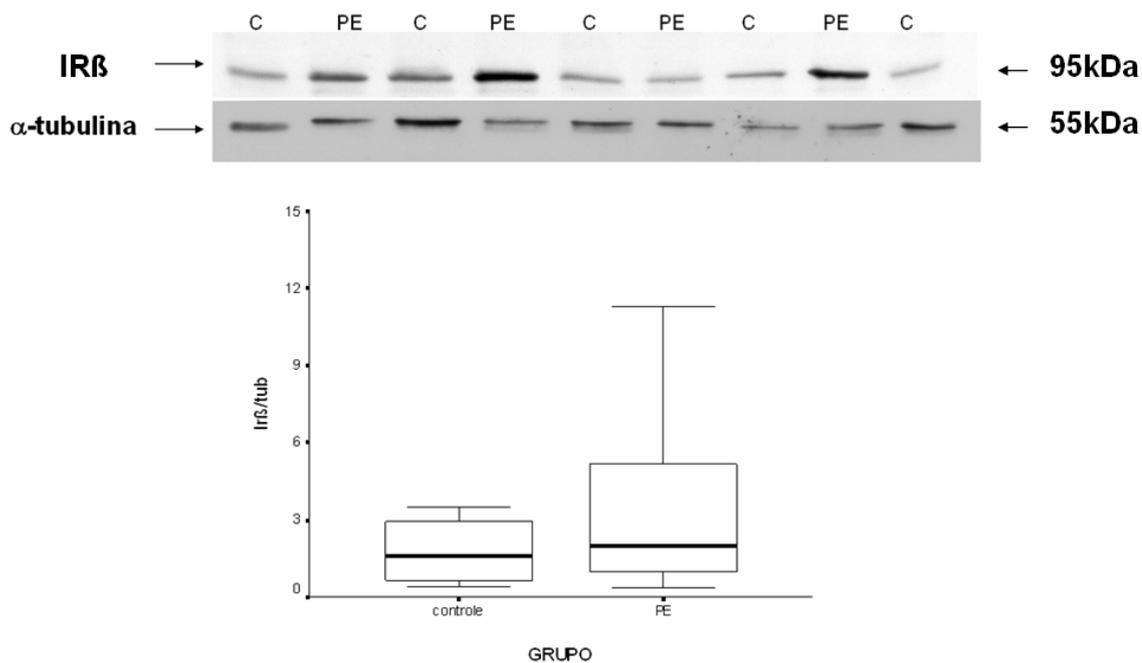


Figura 21. Expressão da IR β em músculo esquelético.

Western blot representativo com anticorpo anti-IR β e anticorpo anti-alfa-tubulina (55 kDa) para amostras de músculo esquelético de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) (n=11) e controles (C) normais (n=11). Não existe diferença estatística significativa, com $p = 0,56$.

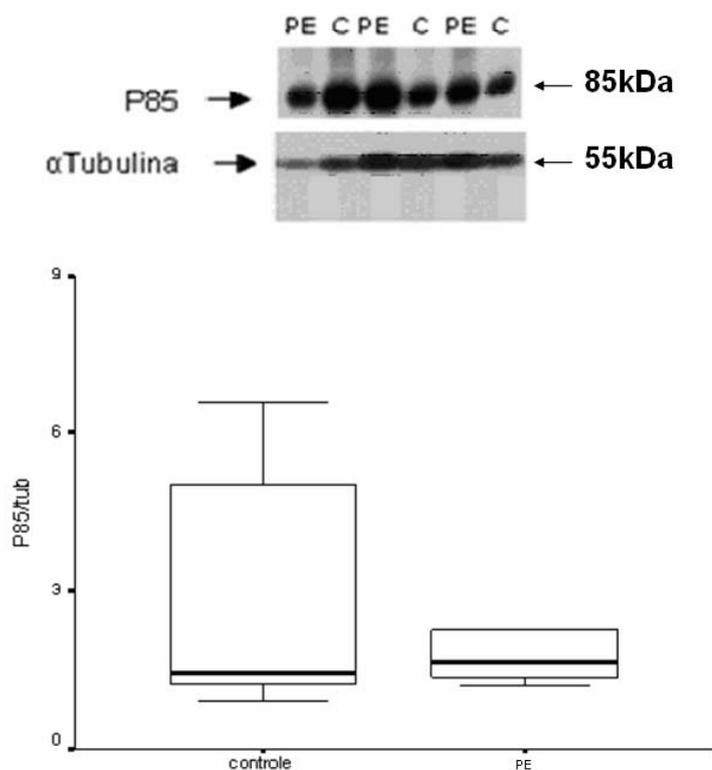


Figura 22. Expressão da p85 em músculo esquelético.

Western blot representativo com anticorpo anti-p85 e anticorpo anti-alfa-tubulina (55kDa) para amostras de placenta de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) (n=09) e controles (C) normais (n=11). Não há diferença estatística significativa, com $p = 0,91$.

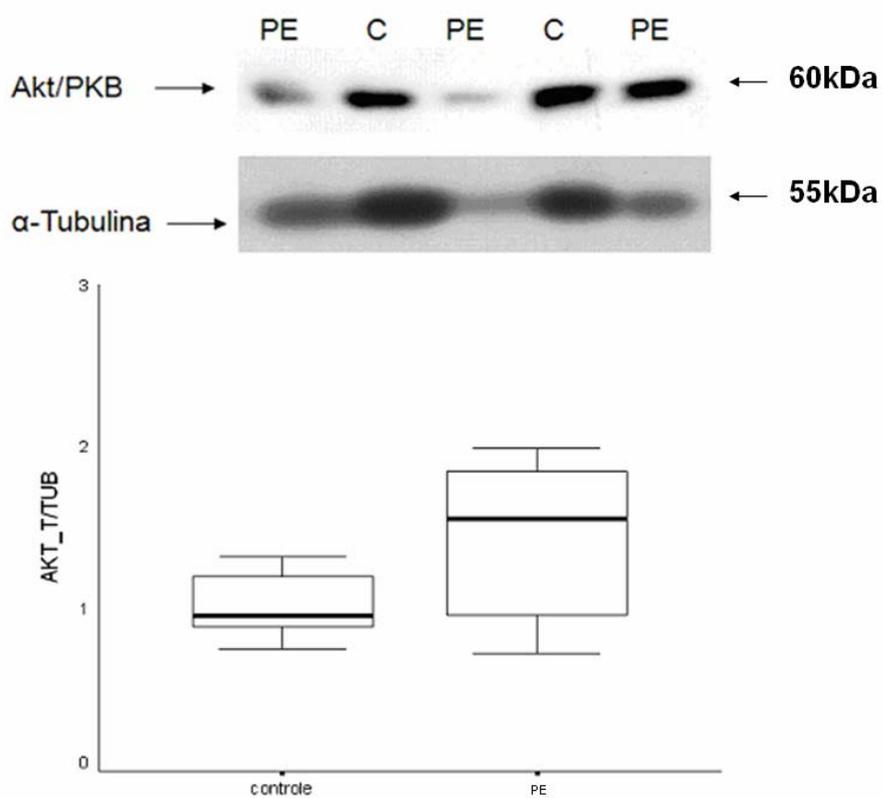


Figura 23. Expressão da Akt/PKB em músculo esquelético.

Western blot representativo com anticorpo anti-Akt/PKB total e anticorpo anti- α tubulina (55 kDa) para amostras de músculo esquelético de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) (n=11) e controles (C) normais (n=09). Não há diferença estatística significativa, com $p = 0,41$.

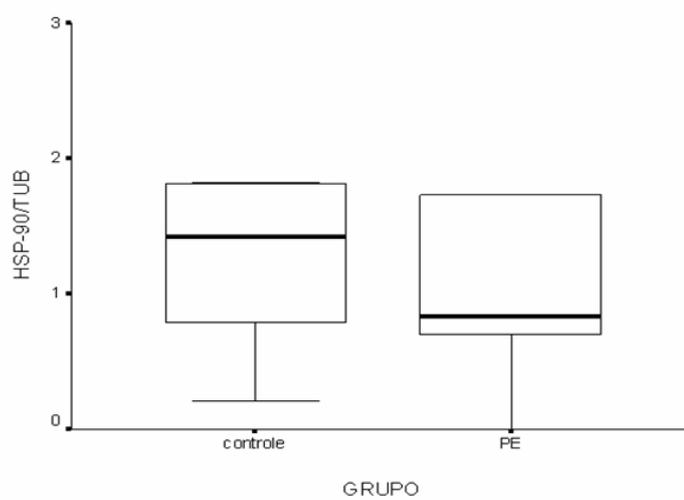
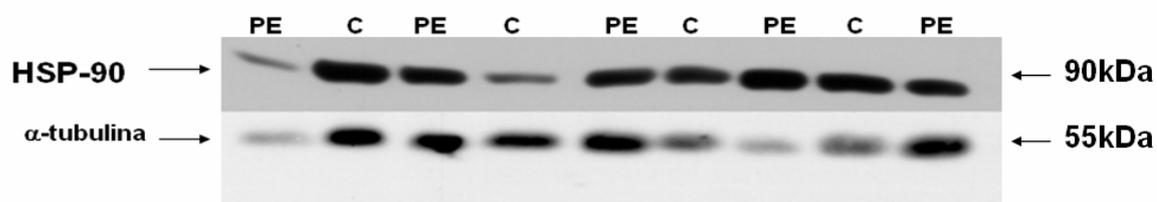


Figura 24. Expressão da HSP-90 em músculo esquelético.

Western blot representativo com anticorpo anti-HSP-90 e anticorpo anti- α tubulina (55 kDa) para amostras de músculo esquelético de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) (n=10) e controles (C) normais (n=08). Não há diferença estatística significativa, com $p = 0,53$.

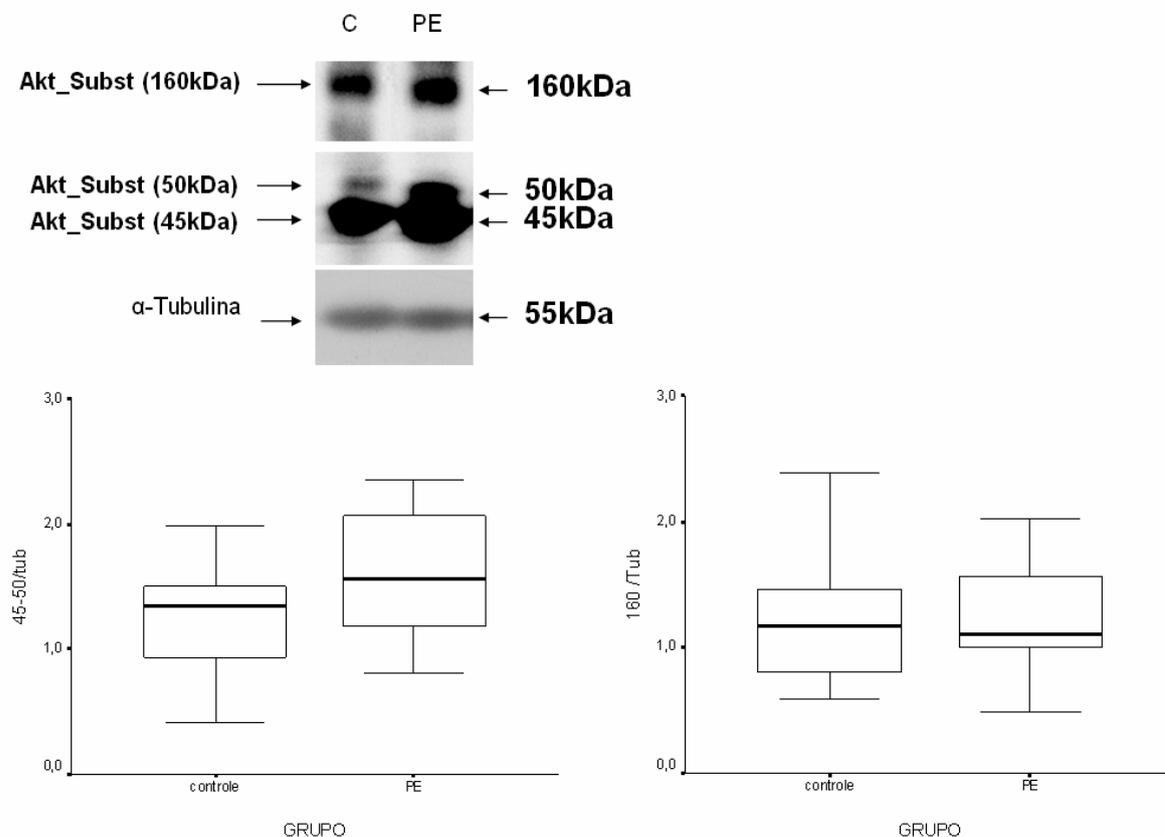


Figura 25. Expressão dos substratos da Akt/PKB fosforilados em serina e treonina em músculo esquelético.

Western blot representativo com anticorpo anti-pAkt/PKB(serina/Treonina) substrato que identificou duas bandas nos experimentos em 160 e 45-50kDa e com anticorpo anti-alfa-tubulina (55kDa) para normalização das amostras de músculo esquelético de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) (n=09) e controles (C) normais (n=11). Não há diferença estatística significativa para expressão desses substratos entre os dois grupos.

5.4 EXPRESSÃO PROTÉICA NO TECIDO ADIPOSEO

No tecido adiposo a expressão de IR β foi de 1,58 (0,56 - 3,23) e 2,00 (0,91 - 6,65) com $p= 0,53$ para pacientes normais ($n = 11$) e com PE ($n = 11$), respectivamente (Figura 26). E a de Akt/PKB 1,10 (0,53 - 1,73) em normais ($n = 9$) e 1,66 (0,83 - 2,00) em pré-eclâmpticas ($n=11$) sendo $p = 0,37$ (Figura 27). Para as outras proteínas não obtivemos sinal nos *blots*.

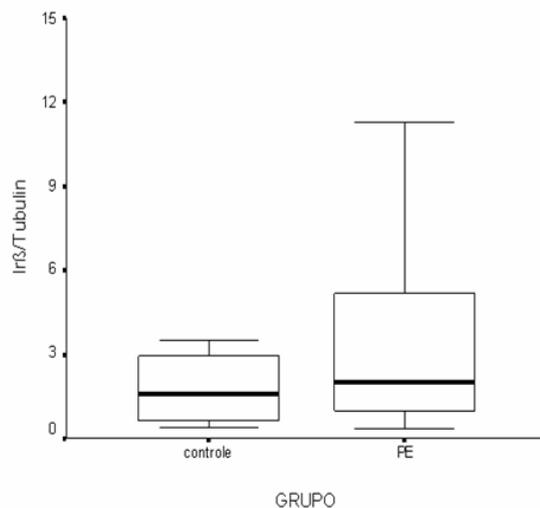
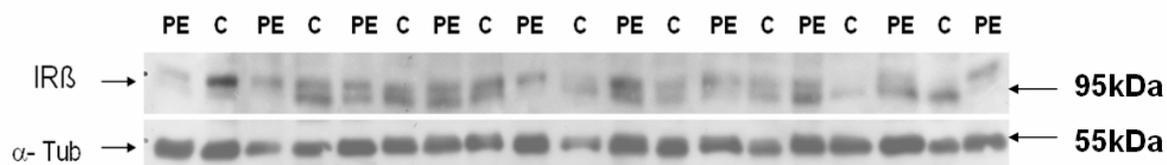


Figura 26. Expressão do IR β em tecido adiposo.

Western blot representativo com anticorpo anti-IR β e anticorpo anti-alfa-tubulina (55kDa) para amostras de tecido adiposo de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) ($n=11$) e controles (C) normais ($n=11$). Não há diferença estatística significativa com $p= 0,56$.

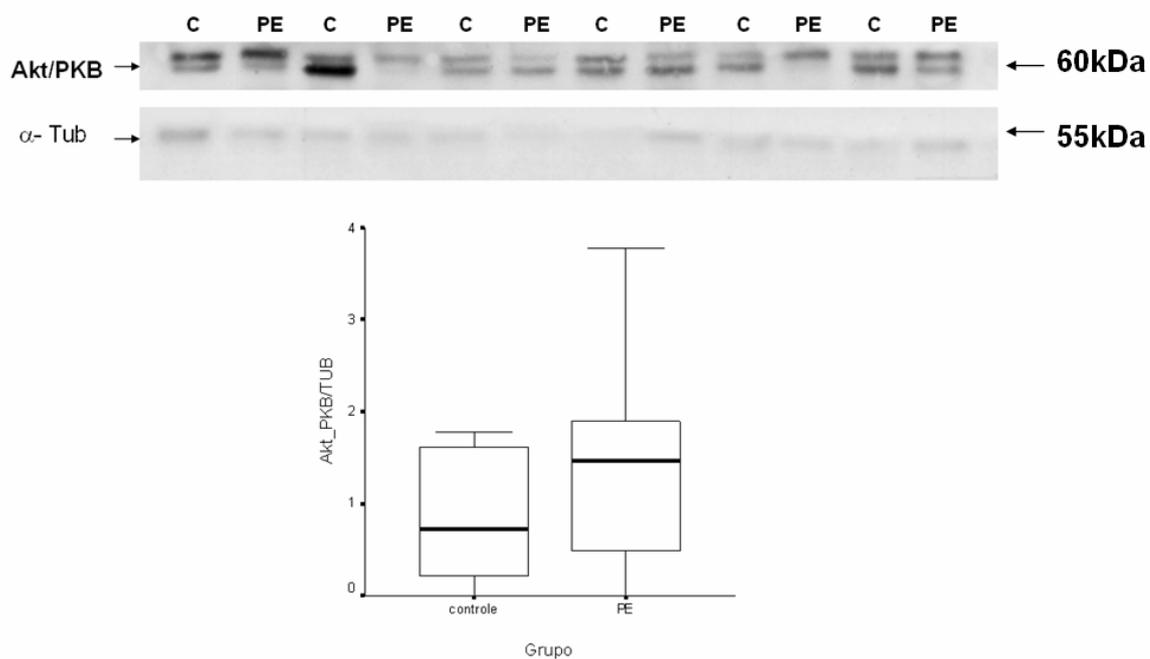


Figura 27. Expressão da Akt/PKB em tecido adiposo.

Western blot representativo com anticorpo anti-Akt/PKB total e anticorpo anti-alfa-tubulina (55 kDa) para amostras de tecido adiposo de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) (n=11) e controles (C) normais (n=09). Não há diferença estatística significativa com $p = 0,37$.

6 DISCUSSÃO

A PE é uma doença de etiologia múltipla e desconhecida (Sibai *et al.* 2005). A obesidade e a resistência à insulina (Scioscia *et al.* 2006) são definidas como fatores de risco para seu desenvolvimento, mas os mecanismos moleculares desse distúrbio não são completamente conhecidos (Kaaja *et al.* 1999).

Não houve diferença entre as pacientes quanto à idade e IMC, sendo que, seis pacientes do grupo controle e sete do grupo PE eram obesas. Esse é um importante fator de risco para a pré-eclâmpsia, pois a cada 5 a 7 kg/m² de aumento no IMC o risco para PE duplica, mesmo sem a interferência de fatores como diabetes tipo 2 e hipertensão gestacional (O'Brien *et al.* 2003). A idade como fator de risco ainda é discutida, pois fatores de risco bem definidos como a primeira gestação influenciam em aumentos de casos de PE em mulheres jovens, o que torna confusa a análise desse fator.

A média do tempo gestacional é menor em pacientes com PE comparadas a normais o que resulta em prematuridade e conseqüências como, o aumento das taxas de morbimortalidade perinatal com aumento do tempo de hospitalização em unidades de tratamento intensivo (Sibai *et al.* 2005; Sibai e Barton 2007). Em nossa amostra o tempo de gestação foi estatisticamente diferente sendo em média aproximadamente de 3 semanas menor nas pacientes com pré-eclâmpsia.

As pressões sistólica e diastólica são importantes para o critério diagnóstico e estão significativamente elevadas na PE, sendo o critério de diagnóstico PAS > 140 mmHg e PAD > 90 mmHg (Sibai *et al.* 2005). As médias de PAS e PAD nas

pacientes com PE em nosso estudo se mostraram superiores a estes níveis, enquadrando as pacientes nesse perfil. A PAD foi significativamente mais elevada no grupo PE, sendo esse achado concordante com a literatura que indica a PAD como uma boa preditora para o diagnóstico de PE (Knuist *et al.* 1998).

As pacientes com PE apresentaram índices significativamente maiores na glicemia de jejum, porém as médias dos dois grupos não ultrapassam os valores normais. Entretanto, a média do grupo PE ficou próxima dos valores para intolerância à glicose. A PE está associada a hiperinsulinemia em jejum e o teste de tolerância à glicose alterado dois meses após o parto (Fuh *et al.* 1995). No teste de tolerância à glicose não encontramos diferença, porém esse dado consistiu de uma amostra de 10 pacientes normais e apenas seis com PE, pois nem todas as pacientes realizaram este exame. A relação de PE com resistência para insulina, glicemia de jejum e tolerância à glicose ainda é tema de discussão, pois vários achados se contradizem (Mammen *et al.* 2005; Salamalekis *et al.* 2005; Scioscia *et al.* 2006).

Os resultados não mostram diferenças significativas entre expressão basal das proteínas analisadas nas vias da Akt/PKB em placentas, músculo esquelético e tecido adiposo de pacientes com PE e normais. As funções da Akt/PKB na resistência à insulina ficaram evidentes quando se demonstrou que sua ativação é promovida pela sinalização da *PI3-Kinase*, a qual é ativada pela auto-fosforilação de receptores tirosina quinase como o receptor de insulina e outros receptores de fatores de crescimento (Alessi *et al.* 1996). Uma vez ativada, a *PI3-Kinase* irá gerar a fosforilação do segundo mensageiro *PtdIns(4,5)P2* formando o *PtdIns(3,4,5)P3* recrutando assim a Akt/PKB para a membrana plasmática e ativando-a por

fosforilação dos sítios Thr308, situado no domínio catalítico, e Ser473 (no domínio regulatório) (Engelman *et al.* 2006).

A placenta parece ser o principal tecido envolvido nas disfunções que ocorrem na PE, sendo este tecido composto de três tipos celulares principais, as células de vilosidades citotrofoblásticas, as células do sinciciotrofoblasto e as células que invadem o endométrio materno, células das extravilosidades do trofoblasto (Mohaupt 2007). As células citotrofoblásticas são as responsáveis pela invasão e formação das artérias espirais. Na PE ocorre uma má formação das artérias espirais e má implantação dessas, e esta parece ser a alteração melhor descrita e aceita na fisiopatologia da PE (Zhou *et al.* 1997), porém os mecanismos patológicos moleculares para essa alteração não são conhecidos. O estudo das vias angiogênicas nesse tecido é de grande importância e essa via se relaciona com a via de sinalização da insulina. A via da Akt/PKB tem importante papel na fisiologia e fisiopatologia da angiogênese. A enzima eNOS (*endothelial nitric oxide syntase*) que promove a liberação de Oxido Nítrico (NO) é ativada diretamente por fosforilação de seu resíduo ser1177 (Dimmeler *et al.* 1999) pela Akt/PKB ativada. A ativação da eNOS libera NO e produz vasodilatação, estimula o remodelamento vascular e a angiogênese (Morbidelli *et al.* 2003). Porém não obtivemos sinal, usando anticorpo para os substratos da Akt/PKB fosforilados em Ser e Thr na posição 140 kDa, mas a análise desse substrato sob estimulação das células placentárias com anticorpo específico deve ser investigada.

Os tecidos adiposo e muscular esquelético são alvos clássicos da insulina, e essa via está diminuída nesses tecidos em doenças como DM2 e obesidade,

causando resistência à insulina (Engelman *et al.* 2006). A PE associa fatores de risco como obesidade, hipertensão crônica e DM2, porém as vias moleculares ainda são pouco claras. Em um estudo, que analisou biópsias de músculo esquelético reto abdominal mostrou não haver diferenças na estrutura de mitocôndrias ou no conteúdo de glicogênio entre pacientes normais e pré-eclâmpticas (Folgero *et al.* 2000). Não encontramos na literatura outros estudos relacionando e comparando músculo esquelético e pré-eclâmpsia.

No tecido adiposo, estudos mostram aumentos no RNAm para resistina, adiponectina e leptina, que são marcadores para resistência à insulina, em PE comparada com normais, esses aumentos no RNAm podem ser usados como marcadores para PE (Mazaki-Tovi *et al.* 2005; Haugen *et al.* 2006). Estudos na via da Akt/PKB nesse tecido, para PE, não foram encontrados na literatura.

Scioscia e colaboradores (Scioscia *et al.* 2006) demonstraram diminuição da fosforilação em tirosina da p85, subunidade regulatória da *PI3-Kinase*, em preparações de placentas estimuladas com insulina de mulheres com pré-eclâmpsia quando comparadas com mulheres normais. Esse achado está associado à diminuição da atividade da PI3K, já que a fosforilação em tirosina da p85 diminui seu poder inibitório (Cuevas *et al.* 2001). Reduções parciais da expressão da p85 levam a um aumento da fosforilação da PI3K (Engelman *et al.* 2006).

Sendo função primordial da *PI3-Kinase* ativar a Akt/PKB poderia se esperar alterações em seus níveis de expressão basal, porém, nossos ensaios mostram uma semelhança entre expressão da P85 em placentas e músculo esquelético de PE e

normais. Esse dado demonstra uma semelhança entre os grupos, porém a análise da expressão da subunidade p110 e uma correlação entre as duas subunidades é necessária.

Nesse trabalho não foi detectada a presença de sinal nos western blots de fosforilação nos sítios ser473, thr308 e Thr34 da Akt/PKB, somente forte sinal de proteína total (não fosforilada) nos três tecidos analisados sendo que não houve diferença na expressão da Akt/PKB entre os dois grupos nestes tecidos. A presença de fosforilação em ser473 e thr308 da Akt/PKB está fortemente ligada à estimulação. Em um experimento teste (veja o item 5.2) com cultura de células de hepatoma humano, estimuladas com insulina a fosforilação dos sítios em questão foi presente, e naquelas não estimuladas foi praticamente nulo. Esse resultado demonstra que no estado basal, sem o estímulo insulínico, a Akt/PKB está muito pouco fosforilada e não pode ser detectada pelas técnicas que utilizamos.

A PDK1 é a responsável pela fosforilação do domínio Thr308, após ser recrutada do citoplasma para membrana plasmática por PtdIns (3,4,5) P3 (Alessi *et al.* 1997; Stephens *et al.* 1998; Fayard *et al.* 2005). Para a fosforilação do sítio ser473, recentemente, descreveu-se a ação do complexo mTOR TORC2 (Sarbasov *et al.* 2005). A fosforilação de Ser473 é um passo decisivo para a ativação da Akt/PKB pois estabiliza o seu estado ativo (Yang *et al.* 2002). Uma vez ativada na membrana, a Akt/PKB pode se deslocar para o citoplasma ou para o núcleo (Andjelkovic *et al.* 1996). Fica evidente que os níveis de Akt/PKB fosforilada em ser473 e Thr308 demonstram atividade dessa via de sinalização desencadeada por fatores de crescimento, como a insulina, mas em placentas, músculo esquelético

abdominal e tecido adiposo, retirados durante a cesárea, torna-se difícil essa análise, seja com estimulação com insulina *in vitro* e, obviamente, a impossibilidade de estimulação *in vivo*.

Menores quantidades de IR (receptor de insulina) e defeitos em sua ativação levam à resistência à insulina (Bhattacharya *et al.* 2007). Entretanto a expressão basal do IR β em placenta de mulheres com PE e normais foi similar, corroborando com os achados de Scioscia e colaboradores (Scioscia *et al.* 2006).

Tem se descrito muitas proteínas que interagem com a Akt/PKB inibindo a como a CTMP (*carboxy-terminal modulator protein*), a Trb3 (Mammalian *homologue tribblets*) e a Keratin K10 e outras que a regulam positivamente como Hsp90, Hsp27, Tcl1, Grb10, Ff1 (Song *et al.* 2005). Nós avaliamos a expressão da Hsp90, molécula da família Hsp que é induzida por choque térmico e age alterando o estado conformacional, estabilizando ou desestabilizando proteínas sobre estresse extracelular. Uma explosão de estresse oxidativo ocorre durante a gestação no tecido placentário e este mecanismo pode contribuir para fisiopatologia da pré-eclâmpsia (Jauniaux *et al.* 2000). Níveis elevados de HSP90 aumentam o grau de fosforilação em tirosina, serina e treonina, enquanto que níveis baixos podem degradar a Akt/PKB (Solit *et al.* 2003), porém os níveis de Hsp90 foram semelhantes entre placentas e músculos esqueléticos de pacientes com PE e normais. No tecido adiposo não encontramos sinal de expressão da Hsp90, talvez pela dificuldade de extração protéica desse tecido. Em um estudo de Divers, 1995, mostrou resultado semelhante sobre a expressão da família Hsp em placentas de diferentes grupos de

pacientes em diferentes tempos de gestação com e sem PE, sendo a expressão dessa família semelhante entre os grupos (Divers *et al.* 1995).

Uma vez ativada, a Akt/PKB fosforila seus substratos no citoplasma ou se transloca para o núcleo. Para detecção dos substratos fosforilados da Akt/PKB nós usamos um anticorpo disponível comercialmente que reconhece seqüências como: RXRXX(pT/pS). Nós identificamos 4 bandas bem definidas nos blots de placentas em posições aproximadas de 160; 100; 50-45 (banda dupla) e 30kDa. Nas amostras de músculo esquelético 2 bandas bem definidas nas posições 160kDa e 50-45kDa (banda dupla) foram visualizadas. Sendo que no tecido adiposo não encontramos sinal dos substratos da Akt/PKB, provavelmente pela baixa quantidade de proteína extraída nas preparações o que limita a técnica utilizada para esse experimento.

Na posição 160kDa a principal candidata é a AS160, substrato da Akt/PKB identificado pelo grupo de Lienhard (Kane *et al.* 2002), essa proteína tem importante função na translocação das vesículas de GLUT4 aumentando a permeabilidade à glicose (Welsh *et al.* 2005). Nas amostras de placenta e músculo esquelético identificamos forte expressão nessa posição, porém não houve diferença na expressão entre os grupos PE e normais.

Em placentas, somente, encontramos uma banda em aproximadamente 100 kDa, sendo um possível candidato as proteínas da família FOXO (105 kDa) que são fatores de transcrição para várias proteínas pró-apoptóticas como BIM e ligante FAS e são inibidas pela Akt/PKB diminuindo a morte celular (Yang *et al.* 2006). Sendo que não houve diferença estatística quando comparado PE e normais para essa

banda nos blots. Nós analisamos também a expressão da FOXO 01(Ser319), sítio fosforilado pela Akt/PKB (McManus *et al.* 2004). Os membros da família *Forkhead* (FoxO1, FoxO4 and FoxO3a) agem como supressores tumorais por promoverem interrupção do ciclo celular e apoptose. Aumentos na sua expressão ativam o p27Kip1 e causam uma *upregulation* do p21CIP1, ambos inibidores do ciclo celular. Quando a Akt/PKB fosforila os sítios Thr24, Ser256 e Ser319 da FOX001/FKHD, ocorre a inibição dessas proteínas, e estímulo pró-sobrevivência celular (Arden 2004; Manning e Cantley 2007). Os resultados mostraram semelhança na expressão da FOXO1 fosforilada em ser319 em placentas de mulheres com PE e normais. Nos tecidos adiposo e músculo esquelético obtivemos fracos sinais sem possibilidade de análise.

Encontramos em placentas uma banda em aproximadamente 30 kDa, identificada com anticorpo anti-substratos da Akt/PKB fosforilados em serina e treonina. Um possível candidato para essa posição é o p27KIP1, que é fosforilado diretamente pela Akt/PKB em Thr157, inibindo sua ação apoptótica. Porém não testamos com anticorpos específicos para essa posição, que também não mostrou diferença na expressão entre os grupos.

Na posição 45-50kDa (banda dupla) temos duas candidatas, a GSK3 e Caspase 9. A fosforilação da Caspase 9 em ser196 pela Akt/PKB inibe sua função iniciadora de apoptose (Cardone *et al.* 1998), porém essa proteína não foi analisada especificamente, pois identificamos com a GSK3 como a responsável por esse sinal em 45 e 50 kDa. A maior função fisiológica da Akt/PKB é a regulação do metabolismo celular mediado pela GSK3, quando altas concentrações de insulina

estão presentes, a Akt/PKB fosforila a GSK3 α e β , nos sítios ser21 e ser9, respectivamente, inibindo sua ação. Isso resulta em armazenamento de glicose e síntese de glicogênio (Brazil e Hemmings 2001; Song *et al.* 2005). Nossos *blots* mostram uma dupla banda de substratos, fosforilados em serina e treonina, em posições próximas 50 e 45kDa, o que sugere que esses substratos são GSK3 α (51kDa) e GSK3 β (46kDa). A quantificação das bandas 45-50KDa foi realizada em conjunto pois essas bandas foram consideradas como as duas isoformas da GSK3, confirmada com anticorpo específico para GSK3 β .

O substrato da Akt/PKB Pras40 foi testado com anticorpos específicos, mostrando sinal apenas em placentas. A expressão foi semelhante entre PE e normais. O Pras40 inibe o mTORC1, sendo que a Akt/PKB inibe o Pras40, estimulando então essa via que está ligada ao estímulo para o crescimento celular (Manning e Cantley 2007).

Maior fosforilação de IRS1 e 2 em serina e conseqüente diminuição do sinal da insulina em placentas de mulheres com PE já foi observada (Scioscia *et al.* 2006). Yang (Yang *et al.* 2003) demonstrou em camundongos importância da Akt/PKB para vascularização e desenvolvimento placentário. Os resultados demonstram uma semelhança na atividade basal dos substratos da Akt/PKB encontrados entre pacientes com PE e normais. Essas análises são quanto à expressão basal, no momento do parto, e especulações quanto à estimulação desses tecidos com insulina e análise da ativação da via Akt/PKB e seus substratos é necessária.

A figura 28 mostra um esboço da via *upstream* da Akt/PKB, marcadas com chaves azuis as proteínas analisadas nesse trabalho, sendo que essas mostraram semelhança em sua expressão basal o que nos leva a crer que no momento do parto, nos tecidos placentários e muscular esquelético a via da Akt/PKB tem atividade semelhante.

A figura 29 mostra um esboço da via *downstream* da Akt/PKB, em vermelho os substratos analisados com anticorpos específicos e em verde os substratos analisados com anticorpo anti-fosfo(ser/thr)Akt/PKB substratos. Os resultados de suas expressões demonstram uma semelhança na atividade da Akt/PKB entre normais e PE. No tecido adiposo não evidenciamos a expressão protéica dos substratos, porém, acreditamos que o tecido adiposo deva ser analisado, por métodos mais específicos, que consigam detectar baixas frações protéicas.

A análise parcial da expressão protéica da via *upstream* e *downstream* da AKT/PKB - proteína que regula a captações de glicose, angiogênese e outras funções que podem estar relacionadas à fisiopatologia da PE - em placentas, órgão responsável por gerar doença nas gestantes, e em músculo esquelético de mulheres normais e com pré-eclâmpsia, demonstrou semelhança nos níveis protéicos. Indicando que no momento do parto essa via de sinalização em mulheres com PE tem semelhante expressão e atividade comparada as pacientes normais.

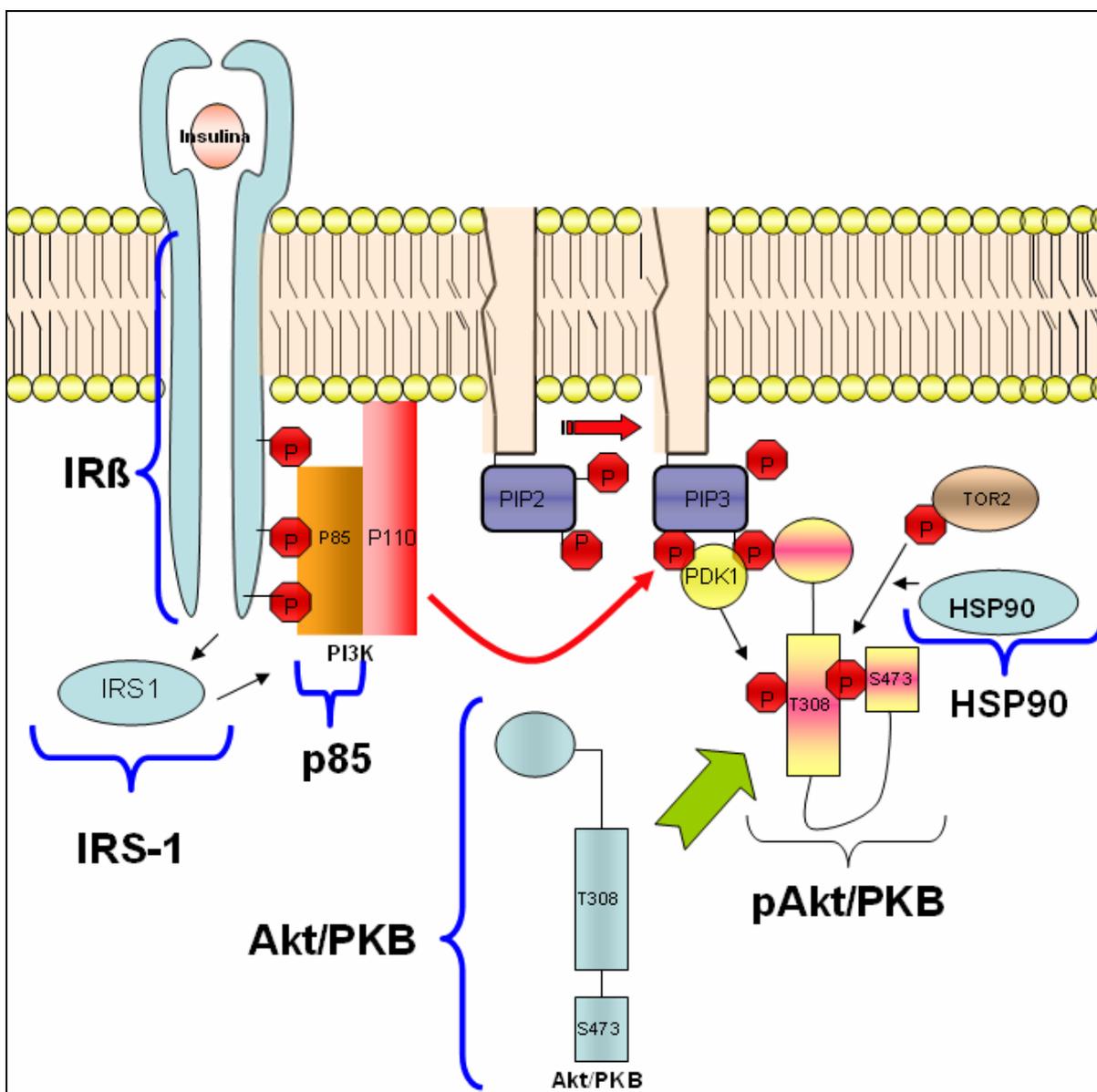


Figura 28. Via *upstream* da Akt/PKB analisada.

A estimulação com insulina leva a ativação da Akt/PKB. As proteínas assinaladas com as chaves azuis foram analisadas no nosso estudo e sua expressão foi semelhante em placentas de pacientes com pré-eclâmpsia e normais. No músculo esquelético foram analisadas as IRβ, p85, Akt/PKB e HSP90, sem diferença significativa entre os grupos. No tecido adiposo foram analisadas a expressão do IRβ e da Akt/PKB, e a expressão protéica dessas também não foi diferente.

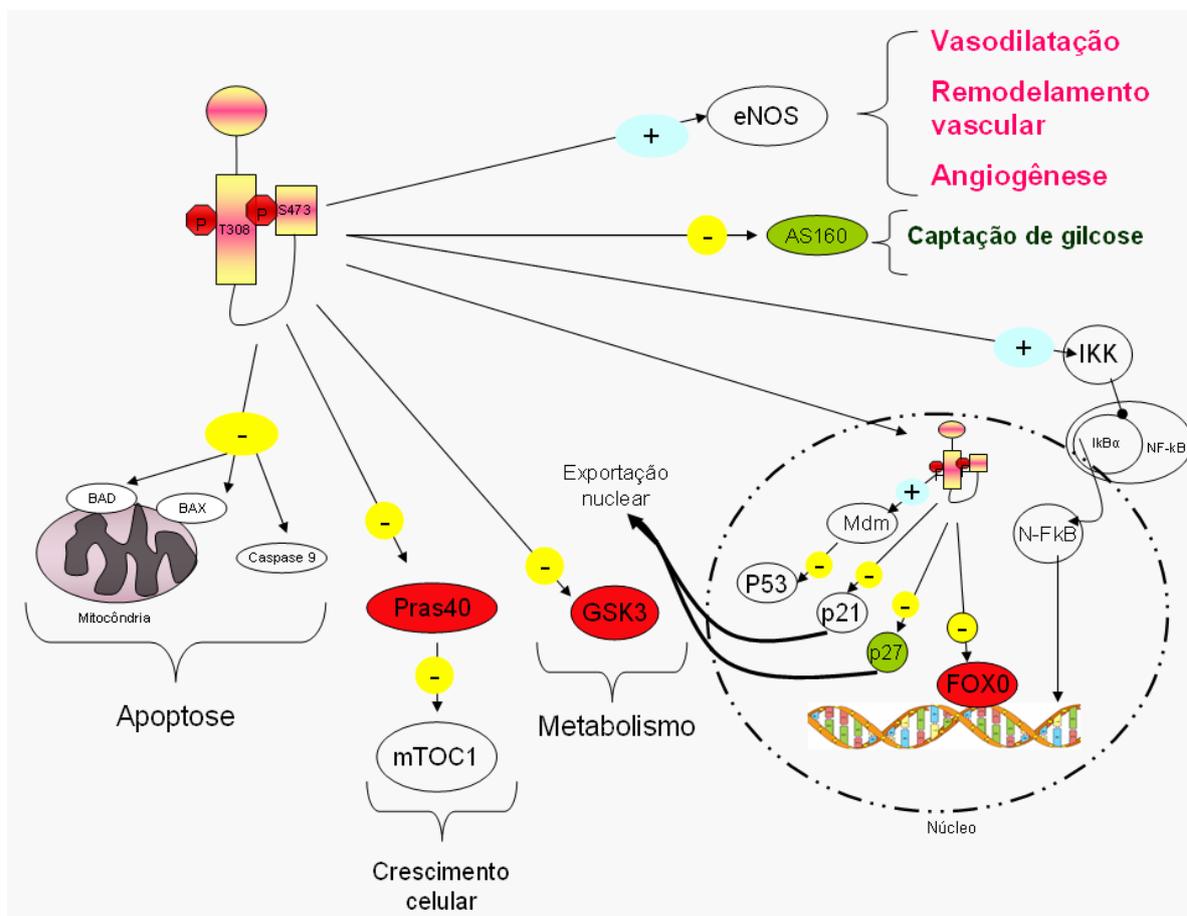


Figura 29. Via downstream da Akt/PKB analisada.

A Akt/PKB após fosforilada irá fosforilar seus substratos e desencadear funções celulares como a inibição do ciclo celular e apoptose, crescimento celular, aumento da síntese de glicogênio e captação de glicose e funções angiogênicas. Os substratos em vermelho— Pras40, GSK3 β e FOXO 01- foram analisados com anticorpos específicos em placentas de pacientes com PE e normais, e não apresentaram diferença significativa. A GSK3 no músculo esquelético foi analisada com anticorpo específico e não apresentou diferença entre PE e normais. Os substratos em verde – AS160 e p27- são possíveis substratos analisados com anticorpo anti-fosfo(ser/Thr)- Akt/PKB substratos, também não apresentaram diferenças entre normais e PE. No tecido adiposo não obtivemos sinal nos experimentos dos substratos da Akt/PKB com nenhum anticorpo.

7 CONCLUSÕES

A expressão basal da Akt/PKB total e de seus substratos fosforilados em serina/treonina (*motif RxRxxS/T*) nas amostras de placenta e músculo esquelético de pacientes com PE e normais são semelhantes, sugerindo uma igualdade na atividade basal dessa via. Em placentas, em estado basal, a GSK3 β e possíveis candidatos como: AS160, FKHR, Caspase9, P27 e GSK3 (total) têm semelhante grau de fosforilação em serina e treonina e, conseqüentemente, ativação similar. No músculo esquelético, no estado basal, 3 possíveis substratos AS160, GSK3 e Caspase9, têm semelhante atividade em PE e normais. No tecido adiposo, a expressão basal da Akt/PKB é semelhante em PE e normais, mas provavelmente, a baixa concentração protéica impossibilitou a detecção dos substratos da Akt/PKB. Nossos resultados sugerem que não há diferença na via da Akt/PKB, em estado basal, em placentas e músculo esquelético de pacientes com PE e normais, porém não podemos descartar defeitos nessa via de sinalização como fisiopatologia da PE, sendo necessário estudo desta via após estímulo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (2000). "Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy." Am J Obstet Gynecol 183(1): S1-S22.
- Alessi, D. R., *et al.* (1996). "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1." Embo J 15(23): 6541-51.
- Alessi, D. R., *et al.* (1996). "Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase." FEBS Lett 399(3): 333-8.
- Alessi, D. R., *et al.* (1997). "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α ." Curr Biol 7(4): 261-9.
- Andjelkovic, M., *et al.* (1996). "Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A 93(12): 5699-704.
- Andjelkovic, M., *et al.* (1999). "Domain swapping used to investigate the mechanism of protein kinase B regulation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 and Ser473 kinase." Mol Cell Biol 19(7): 5061-72.
- Arcaro, A. e M. P. Wymann (1993). "Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses." Biochem J 296 (Pt 2): 297-301.
- Arden, K. C. (2004). "FoxO: linking new signaling pathways." Mol Cell 14(4): 416-8.
- Auger, K. R., *et al.* (1989). "PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells." Cell 57(1): 167-75.
- Auguin, D., *et al.* (2004). "Structural basis for the co-activation of protein kinase B by T-cell leukemia-1 (TCL1) family proto-oncoproteins." J Biol Chem 279(34): 35890-902.
- Bainbridge, S. A., *et al.* (2005). "Direct placental effects of cigarette smoke protect women from pre-eclampsia: the specific roles of carbon monoxide and antioxidant systems in the placenta." Med Hypotheses 64(1): 17-27.

- Balendran, A., *et al.* (1999). "PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2." Curr Biol 9(8): 393-404.
- Barkett, M. e T. D. Gilmore (1999). "Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors." Oncogene 18(49): 6910-24.
- Barthwal, M. K., *et al.* (2003). "Negative regulation of mixed lineage kinase 3 by protein kinase B/AKT leads to cell survival." J Biol Chem 278(6): 3897-902.
- Bellacosa, A., *et al.* (1991). "A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region." Science 254(5029): 274-7.
- Bhattacharya, S., *et al.* (2007). "Molecular mechanism of insulin resistance." J Biosci 32(2): 405-13.
- Brazil, D. P. e B. A. Hemmings (2001). "Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow." Trends Biochem Sci 26(11): 657-64.
- Brazil, D. P., *et al.* (2002). "PKB binding proteins. Getting in on the Akt." Cell 111(3): 293-303.
- Burgering, B. M. e R. H. Medema (2003). "Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty." J Leukoc Biol 73(6): 689-701.
- Cardone, M. H., *et al.* (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." Science 282(5392): 1318-21.
- Caritis, S., *et al.* (1998). "Predictors of pre-eclampsia in women at high risk. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units." Am J Obstet Gynecol 179(4): 946-51.
- Carpenter, C. L., *et al.* (1990). "Purification and characterization of phosphoinositide 3-kinase from rat liver." J Biol Chem 265(32): 19704-11.
- Clausen, T., *et al.* (2001). "Dyslipidemia in early second trimester is mainly a feature of women with early onset pre-eclampsia." Bjog 108(10): 1081-7.
- Coffer, P. J. e J. R. Woodgett (1991). "Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families." Eur J Biochem 201(2): 475-81.
- Cuevas, B. D., *et al.* (2001). "Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem 276(29): 27455-61.
- Datta, S. R., *et al.* (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." Cell 91(2): 231-41.

- del Peso, L., *et al.* (1997). "Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt." Science 278(5338): 687-9.
- Dimmeler, S., *et al.* (1999). "Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation." Nature 399(6736): 601-5.
- Divers, M. J., *et al.* (1995). "Placental heat shock proteins: no immunohistochemical evidence for a differential stress response in preterm labour." Gynecol Obstet Invest 40(4): 236-43.
- Du, K., *et al.* (2003). "TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver." Science 300(5625): 1574-7.
- Dunaif, A., *et al.* (1995). "Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome." J Clin Invest 96(2): 801-10.
- Eguez, L., *et al.* (2005). "Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein." Cell Metab 2(4): 263-72.
- Engelman, J. A., *et al.* (2006). "The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism." Nat Rev Genet 7(8): 606-19.
- Esplin, M. S., *et al.* (2001). "Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia." N Engl J Med 344(12): 867-72.
- Fayard, E., *et al.* (2005). "Protein kinase B/Akt at a glance." J Cell Sci 118(Pt 24): 5675-8.
- Feng, J., *et al.* (2004). "Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase." J Biol Chem 279(39): 41189-96.
- Folgero, T., *et al.* (2000). "Skeletal muscle ultrastructure in normal pregnancy and preeclampsia." Gynecol Obstet Invest 49(2): 88-92.
- Foster, F. M., *et al.* (2003). "The phosphoinositide (PI) 3-kinase family." J Cell Sci 116(Pt 15): 3037-40.
- Fuh, M. M., *et al.* (1995). "Resistance to insulin-mediated glucose uptake and hyperinsulinemia in women who had preeclampsia during pregnancy." Am J Hypertens 8(7): 768-71.
- Gottlieb, T. M., *et al.* (2002). "Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis." Oncogene 21(8): 1299-303.
- Haugen, F., *et al.* (2006). "Increased plasma levels of adipokines in preeclampsia: relationship to placenta and adipose tissue gene expression." Am J Physiol Endocrinol Metab 290(2): E326-33.

- Hubel, C. A., *et al.* (1997). "Increased ascorbate radical formation and ascorbate depletion in plasma from women with preeclampsia: implications for oxidative stress." Free Radic Biol Med 23(4): 597-609.
- Jahn, T., *et al.* (2002). "Role for the adaptor protein Grb10 in the activation of Akt." Mol Cell Biol 22(4): 979-91.
- Jauniaux, E., *et al.* (2000). "Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure." Am J Pathol 157(6): 2111-22.
- Johnson, G. L. e R. Lapadat (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." Science 298(5600): 1911-2.
- Jones, P. F., *et al.* (1991). "Molecular cloning of a second form of rac protein kinase." Cell Regul 2(12): 1001-9.
- Kaaja, R., *et al.* (1999). "Evidence of a state of increased insulin resistance in preeclampsia." Metabolism 48(7): 892-6.
- Kaaja, R., *et al.* (1995). "Serum lipoproteins, insulin, and urinary prostanoid metabolites in normal and hypertensive pregnant women." Obstet Gynecol 85(3): 353-6.
- Kane, S., *et al.* (2002). "A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain." J Biol Chem 277(25): 22115-8.
- Karumanchi, S. A., *et al.* (2005). "Preeclampsia: a renal perspective." Kidney Int 67(6): 2101-13.
- Kato, H., *et al.* (1997). "Fetal plasma lipid peroxide levels in pregnancies complicated by preeclampsia." Gynecol Obstet Invest 43(3): 158-61.
- Kawakami, Y., *et al.* (2004). "Protein kinase C beta11 regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion." J Biol Chem 279(46): 47720-5.
- Kim, A. H., *et al.* (2001). "Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1." Mol Cell Biol 21(3): 893-901.
- Knuist, M., *et al.* (1998). "Risk factors for preeclampsia in nulliparous women in distinct ethnic groups: a prospective cohort study." Obstet Gynecol 92(2): 174-8.
- Kohn, A. D., *et al.* (1996). "Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation." J Biol Chem 271(49): 31372-8.

- Kossenjans, W., *et al.* (2000). "Role of peroxynitrite in altered fetal-placental vascular reactivity in diabetes or preeclampsia." Am J Physiol Heart Circ Physiol 278(4): H1311-9.
- Laivuori, H., *et al.* (1996). "Hyperinsulinemia 17 years after preeclamptic first pregnancy." J Clin Endocrinol Metab 81(8): 2908-11.
- Lie, R. T., *et al.* (1998). "Fetal and maternal contributions to risk of pre-eclampsia: population based study." Bmj 316(7141): 1343-7.
- Luo, J., *et al.* (2003). "Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise." Cancer Cell 4(4): 257-62.
- Maira, S. M., *et al.* (2001). "Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane." Science 294(5541): 374-80.
- Mammen, M., *et al.* (2005). "Glucose tolerance in rural women with pre-eclampsia." S Afr Med J 95(12): 955-8.
- Manning, B. D. e L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." Cell 129(7): 1261-74.
- Maurer, U., *et al.* (2006). "Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1." Mol Cell 21(6): 749-60.
- Maynard, S. E., *et al.* (2003). "Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia." J Clin Invest 111(5): 649-58.
- Mayo, L. D. e D. B. Donner (2001). "A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus." Proc Natl Acad Sci U S A 98(20): 11598-603.
- Mazaki-Tovi, S., *et al.* (2005). "Adiponectin and human pregnancy." Curr Diab Rep 5(4): 278-81.
- McCormick, F. (1999). "Signalling networks that cause cancer." Trends Cell Biol 9(12): M53-6.
- McManus, E. J., *et al.* (2004). "The in vivo role of PtdIns(3,4,5)P3 binding to PDK1 PH domain defined by knockin mutation." Embo J 23(10): 2071-82.
- Mohaupt, M. (2007). "Molecular aspects of preeclampsia." Mol Aspects Med 28(2): 169-91.
- Morbidelli, L., *et al.* (2003). "Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis." Curr Pharm Des 9(7): 521-30.

- Morikawa, S., *et al.* (1997). "Increased mitochondrial damage by lipid peroxidation in trophoblast cells of preeclamptic placentas." Biochem Mol Biol Int 41(4): 767-75.
- O'Brien, T. E., *et al.* (2003). "Maternal body mass index and the risk of preeclampsia: a systematic overview." Epidemiology 14(3): 368-74.
- Paramio, J. M., *et al.* (2001). "Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKCzeta mediates keratin K10-induced cell cycle arrest." Mol Cell Biol 21(21): 7449-59.
- Park, H. S., *et al.* (2002). "Akt (protein kinase B) negatively regulates SEK1 by means of protein phosphorylation." J Biol Chem 277(4): 2573-8.
- Persad, S., *et al.* (2001). "Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343." J Biol Chem 276(29): 27462-9.
- Pessin, J. E. e A. R. Saltiel (2000). "Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance." J Clin Invest 106(2): 165-9.
- Plas, D. R. e C. B. Thompson (2005). "Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving." Oncogene 24(50): 7435-42.
- Poranen, A. K., *et al.* (1998). "The effect of vitamin C and E on placental lipid peroxidation and antioxidative enzymes in perfused placenta." Acta Obstet Gynecol Scand 77(4): 372-6.
- Ramos, J. G., *et al.* (1999). "Urinary protein/creatinine ratio in hypertensive pregnant women." Hypertens Pregnancy 18(3): 209-18.
- Rane, M. J., *et al.* (2003). "Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation." J Biol Chem 278(30): 27828-35.
- Remy, I. e S. W. Michnick (2004). "Regulation of apoptosis by the Ft1 protein, a new modulator of protein kinase B/Akt." Mol Cell Biol 24(4): 1493-504.
- Roberts, J. M. e D. W. Cooper (2001). "Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia." Lancet 357(9249): 53-6.
- Salamalekis, E., *et al.* (2005). "No association between insulin resistance and preeclampsia." J Matern Fetal Neonatal Med 18(2): 113-5.
- Sarbassov, D. D., *et al.* (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." Science 307(5712): 1098-101.
- Scioscia, M., *et al.* (2006). "Insulin resistance in human preeclamptic placenta is mediated by serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and -2." J Clin Endocrinol Metab 91(2): 709-17.

- Seely, E. W. e C. G. Solomon (2003). "Insulin resistance and its potential role in pregnancy-induced hypertension." J Clin Endocrinol Metab 88(6): 2393-8.
- Shaw, R. J. e L. C. Cantley (2006). "Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth." Nature 441(7092): 424-30.
- Sibai, B., *et al.* (2005). "Pre-eclampsia." Lancet 365(9461): 785-99.
- Sibai, B. M. e J. R. Barton (2007). "Expectant management of severe preeclampsia remote from term: patient selection, treatment, and delivery indications." Am J Obstet Gynecol 196(6): 514 e1-9.
- Solit, D. B., *et al.* (2003). "Inhibition of heat shock protein 90 function down-regulates Akt kinase and sensitizes tumors to Taxol." Cancer Res 63(9): 2139-44.
- Song, G., *et al.* (2005). "The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival." J Cell Mol Med 9(1): 59-71.
- Staal, S. P., *et al.* (1977). "Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma." Proc Natl Acad Sci U S A 74(7): 3065-7.
- Stambolic, V., *et al.* (1998). "Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN." Cell 95(1): 29-39.
- Stephens, L., *et al.* (1998). "Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B." Science 279(5351): 710-4.
- Thadhani, R., *et al.* (2004). "Insulin resistance and alterations in angiogenesis: additive insults that may lead to preeclampsia." Hypertension 43(5): 988-92.
- Toker, A. e A. C. Newton (2000). "Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site." J Biol Chem 275(12): 8271-4.
- Trupin, L. S., *et al.* (1996). "Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas." Epidemiology 7(3): 240-4.
- Viniegra, J. G., *et al.* (2005). "Full activation of PKB/Akt in response to insulin or ionizing radiation is mediated through ATM." J Biol Chem 280(6): 4029-36.
- Walker, J. J. (2000). "Pre-eclampsia." Lancet 356(9237): 1260-5.
- Welsh, G. I., *et al.* (2005). "Role of protein kinase B in insulin-regulated glucose uptake." Biochem Soc Trans 33(Pt 2): 346-9.
- Wolf, M., *et al.* (2002). "First trimester insulin resistance and subsequent preeclampsia: a prospective study." J Clin Endocrinol Metab 87(4): 1563-8.

- Yang, J., *et al.* (2002). "Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP." Nat Struct Biol 9(12): 940-4.
- Yang, J. Y., *et al.* (2006). "Ionizing radiation activates expression of FOXO3a, Fas ligand, and Bim, and induces cell apoptosis." Int J Oncol 29(3): 643-8.
- Yang, Z. Z., *et al.* (2004). "Physiological functions of protein kinase B/Akt." Biochem Soc Trans 32(Pt 2): 350-4.
- Yang, Z. Z., *et al.* (2003). "Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth." J Biol Chem 278(34): 32124-31.
- Zhou, B. P., *et al.* (2001). "HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation." Nat Cell Biol 3(11): 973-82.
- Zhou, Y., *et al.* (1997). "Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome?" J Clin Invest 99(9): 2152-64.

9 ANEXO 1 - FICHA DE COLETA DE DADOS

Iniciais: _____

Prontuário: _____

Idade: _____

Data: _____

- Prê-eclampsia () Controle ()

Tempo de gestação _____

Medicação hormonal _____

História de diabetes mellitus na família _____

História de pré-eclâmpsia na família _____

Antecedentes gineco-obstétricos _____

Gesta _____ Para _____ Ces _____ Abort _____

Glicemia de jejum _____

Teste de tolerância a glicose _____

Peso _____

Altura _____

IMC _____

Observações:

10 ANEXO 2 - Consentimento informado**Autorização para participar de um projeto de pesquisa**

NOME DO ESTUDO: TRANSDUÇÃO DO SINAL DE INSULINA EM MÚSCULO ESQUELÉTICO ADIPÓCITOS E PLACENTA DE PACIENTES COM PRÉ-ECLÂMPسيا

NÚMERO DO PROTOCOLO: _____ INSTITUIÇÃO: UFRGS

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Rafael Orcy / Edison Capp

TELEFONE para contato:

NOME DO PACIENTE: _____

Estamos convidando você para participar de um projeto de pesquisa chamado "TRANSDUÇÃO DO SINAL DE INSULINA EM MÚSCULO ESQUELÉTICO, ADIPÓCITOS E PLACENTA DE PACIENTES COM PRÉ-ECLÂMPسيا". Já há indicação de cirurgia (cesariana) para tratamento o seu caso. Necessitamos de sua autorização para retirar um pequeno pedaço (1 g) do músculo da barriga (do abdômen), bem como, a retirada de 3 - 4 g de gordura e de placenta que é normalmente jogada fora. A retirada desse material será realizada durante a cesariana não causando nenhum desconforto adicional ao procedimento.

Durante a realização do projeto e a publicação dos resultados sua identidade será mantida confidencial. As informações obtidas com este estudo poderão ser publicadas com finalidade científica. A recusa em não participar deste estudo não causará prejuízo a sua assistência médica.

Os riscos de aumento da dor ou hematoma no pós-cirúrgico, as custas desses procedimentos, são mínimos, visto que freqüentemente fragmentos de músculos e gordura são descartados durante a cirurgia, sendo a placenta completamente descartada.

Este estudo trará benefícios científicos com informações importantes sobre o papel da insulina, permitindo identificação de possíveis alterações no seu mecanismo e influência no desenvolvimento de pré-eclâmpسيا durante a gestação.

Declaro ter lido as informações acima antes de assinar este formulário. Foi-me dada ampla oportunidade de fazer perguntas, esclarecendo plenamente minhas dúvidas. Por este instrumento, tomo parte voluntariamente no presente estudo.

Assinatura do paciente _____ Data: _____

Assinatura do pesquisador _____ Data: _____

11 ANEXO 3 -Tabela de dados clínicos e antropométricos das pacientes com pré-eclampsia e normais.

| | Normais | PE | P |
|---------------------------------------|----------------|----------------|----------|
| Idade (anos) | 26,29 ± 8,16 | 27,05 ± 7,81 | 0,78 |
| IMC (kg/m ²) | 28,54 ± 4,62 | 29,85 ± 5,08 | 0,43 |
| Tempo gestacional (dias) | 258,94 ± 18,70 | 236,82 ± 21,31 | 0,002* |
| Glicemia de jejum (mg/dL) | 78,21 ± 7,24 | 91,09 ± 22,36 | 0,05* |
| Teste de tolerância à glicose (mg/dL) | 103,97 ± 20,39 | 90,58 ± 33,70 | 0,52 |
| Pressão Arterial Sistólica (mmHg) | 112,30 ± 15,35 | 149,23 ± 25,96 | < 0,001* |
| Pressão Arterial Diastólica (mmHg) | 70,76 ± 9,54 | 98,46 ± 14,05 | < 0,001* |

*teste t de Student.

12 ANEXO 4 – Artigo submetido.

**12 ANEXO 4 – ARTIGO SUBMETIDO:
GYNECOLOGIC AND OBSTETRIC INVESTIGATION**

**SIGNALIZATION OF Akt/PKB IN THE PLACENTA, SKELETAL MUSCLE AND ADIPOSE
TISSUE OF PREECLAMPSIA PATIENTS**

Rafael Bueno Orcy¹, Sabrina Schroeder², Sérgio Hofmeister Martins-Costa^{2,3}, José Geraldo Lopes Ramos^{2,3}, Wolfgang Schechinger⁴, Harald Klein⁴, Ilma Simoni Brum¹, Edison Capp^{1,2,3}, Helena von Eye Corleta^{1,2,3,5}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; ²Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; ³Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ⁵Centro Gerar de Reprodução Assistida, Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴BG-Kliniken Bergmannsheil - Universitätsklinik Medical Clinic I, Endocrine Research Laboratory, University of Bochum, Germany.

Address for correspondence:

Edison Capp

Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular

Centro de Pesquisa - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP: 90 035-903- Porto Alegre, RS, Brazil

edcapp@ufrgs.br

FAX: 0055 51 3311 6588

ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is a significant cause of fetal and maternal mortality around the world and there is evidence that insulin resistance has been implicated in the pathophysiology of preeclampsia. Akt/PKB via is stimulated by insulin and performs several vital functions relative to growth, survival and cellular metabolism. **Objective:** To investigate the basal expression of Akt/PKB, HSP90 expression, proteins that regulate Akt/PKB activity and substrate in the placenta, skeletal muscle and adipocytes of normal and preeclampsia parturient. **Method:** Samples were collected from 17 normal patients and 17 PE patients, and analyzed by *Western blot* to quantify the protein expression involved in signaling cascade of Akt/PKB. **Results:** total Akt/PKB expression for normal placentas was 1.85 (1.07 - 3.12) and 1.53 (91.27-3.08) in PE, $p = 1.00$; in the adipose tissue of normal placentas was 1.10 (0.53 - 1.73) and for PE 1.66 (0.83 - 2.00) with $p = 0.37$. **Conclusions:** There was no difference in Akt/PKB via, in basal state, in placentas and skeletal muscle of normal and PE patients. However, defects in this signaling via as pathophysiology of PE cannot be exclude because it is necessary to analyze this via during stimulation.

KEYWORDS

Preeclampsia; adipose tissue; skeletal muscle; insulin signal transduction; Akt/PKB.

INTRODUCTION

Preeclampsia is considered to be one of the most significant health problems in human pregnancy, leading to fetal growth restriction, prematurity and, in the worst cases, maternal death (1). The cause of preeclampsia is unknown but the mechanisms of dysfunction are characterized by maternal hypertension, proteinuria, edema, vasoconstriction of the maternal vascular beds and, consequently, an increase in vascular resistance (2, 3).

Several studies have shown that insulin resistance syndrome – a decrease in target tissue insulin action, with normal or increased insulin concentrations, with a resulting decrease of glucose uptake and glycogen synthesis (4) – is associated with PE and can contribute to preeclampsia pathophysiology (5, 6). However, these findings are of little significance and doubts persist as to whether insulin resistance is involved in the preeclampsia pathophysiology or whether insulin resistance is a consequence of preeclampsia (7, 8).

Defects in the insulin signaling cascade, defects in insulin receptors phosphorylation and substrates with abnormal activation of PI3-Kinase/Akt can play an important role in the development of insulin resistance (4). Akt/PKB via is important for the growth factor signal transduction and other extracellular stimulus as well as for the regulation of nutrient metabolism, cell growth, survival and apoptosis. This protein is a serine/threonine Kinase regulated by PI3-Kinase activation that regulates cell survival directly through the substrates - such as BAD, Caspase-9, SAPK, ForKhead and others – as well as glucose metabolism by GSK3 (9, 10). Animal studies have demonstrated that Akt/PKB protein levels are important for growth and development of the normal placenta, also for fetal growth (11). The degree of IRS 1 and 2 tyrosine phosphorylation and the increase in serine phosphorylation demonstrate a decrease of insulin activity in the placenta of PE patients that can inhibit the phosphorylation at tyrosine residue (5). The active Akt/PKB is a kinase phosphorylated at serine and threonine (12) that serves as an important

regulator of several cellular functions including survival, growth, differentiation, transcription, translation and cell metabolism (13).

In this study, we investigated the basal expression of principal proteins involved in Akt/PKB signaling in the placenta, skeletal muscle and adipocytes of normal and preeclampsia parturient.

METHODS

Thirty-four women participated, including 17 normal patients and 17 preeclampsia patients. The placenta samples, abdominal fat and abdominal muscles were collected during cesarean section at Obstetric Center of Hospital de Clinicas de Porto Alegre. Cesarean sections were medically indicated without any relationship to this study. This research was approved by the ethics committee of Hospital de Clinicas de Porto Alegre (03-371). All patients were informed about the project objectives and risks, and the project was undertaken only for those who agreed to participate by signing an informed consent form.

Sample

Approximately 3 g of placenta were obtained immediately after birth, washed with PBS (4°C) to remove excess blood, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The same procedure was executed in muscle (rectus abdominis) and fat (abdomen) samples (1 - 2 g). Samples were analyzed by *Western blot*. Proteins were transferred to membranes of polyvinyl with a semi-dry system. Rabbit polyclonal antibodies, anti-P85 of Upstate; total anti-IRS1, total anti-AKT, Phospho-Akt(ser473), Phospho-Akt(Thr308); anti-AKTsubstrates, anti-GSK3 β from Cell Signaling; anti-HSP90 from Abcam; Mouse monoclonal antibodies, anti- β -tubulina Upstate and anti-IR β Calbiochem[®]. Autoradiograms were performed and the results are presented in arbitrary units.

Statistics

Statistical analysis was performed by using SPSS 15.0 statistical software. Mann-Whitney test was used for non-parametric data, and *Student's* t-test was used for parametric variables with a significance of $p < 0.05$.

RESULTS

Patients' characteristics are presented in Table 1. The results are presented as mean values \pm standard deviation. The two groups did not differ significantly in age and IMC, the mean age was 27.05 ± 7.81 for normal patients and 26.29 ± 8.16 for PE patients ($p = 0.78$) and the IMC of 28.54 ± 4.62 for normal patients and 29.85 ± 5.08 for PE patients ($p = 0.43$). Gestational age was significantly lower in the PE group (236.82 ± 21.31 days) when compared to the normal patients (258.94 ± 18.70 days) $p = 0.002$.

Diastolic and systolic blood pressure readings were significantly higher in PE patients, mean systolic blood pressure of 112.30 ± 15.35 for normal patients and 149.23 ± 25.96 for PE patients ($p = 0.001$) and mean diastolic blood pressure of 70.76 ± 9.54 for normal patients and 98.46 ± 14.05 for PE patients ($p = 0.001$).

The two groups had similar results for the glucose tolerance test (mg/dL), 103.97 ± 20.39 for normal patients and 90.58 ± 33.70 for PE patients ($p = 0.52$). Glycemic control (mg/dL) was statistically significant, 79.15 ± 6.59 for normal patients and 91.09 ± 22.36 for PE patients ($p = 0.07$).

Protein expression in placentas.

Table 2 shows results of protein expression in placentas that are presented as median (25% - 75% percentile) normalized by β tubulina protein expression (55 kDA).

Insulin receptor beta-subunit (IR β) expression in placentas was 4.78 (2.87 – 6.70) for normal patients and 6.74 (4.47- 8.75) for PE patients ($p = 0.2$). IRS-1 was 0.47 (0.19- 1.05) for normal patients (n=16) and 0.33 (0.12- 0.57) for PE patients (n=11) ($p = 0.36$).

Values of P85 expression and PI3- Kinase regulatory subunit were 1.12 (0.83- 1.62) for normal patients and 1.29 (0.89- 1.96) for PE patients ($p = 0.42$) (Figure 1A and Graph 1). The total Akt/PKB was 1.85 (1.07- 3.12) for normal patients (n=18) and 1.53 (1.27- 3.08) for PE patients ($p= 1.00$) (Figure 2 and Graph 3).

Substrates that bind to Akt/PKB and phosphorylate on serine and threonine were analyzed and five well-defined bands were visualized at positions 30, 45-55 (double band), 100, 160 kDA (Figure 3; Graph 4). A comparison did not show differences in substrate phosphorylation. Results are presented in Table 2.

Specific antibodies were used to analyze GSK3 β , protein recognized as Akt/PKB substrate, and HSP90, protein that positively regulates Akt/PKB. GSK3 β result was 2.87 (1.77- 5.70) for normal patients and 2.83 (1.58- 5.01) for PE patients ($p= 0.88$) and HSP90 result was 1.55 (1.06- 2.82) for normal patients and 1.79 (1.40- 4.07) for PE patients ($p= 0.56$).

Protein expression in skeletal muscle

Table 3 shows results for basal expression of protein for skeletal muscle. IR β expression was 1.58 (0.56- 3.23) for normal patients and 2.00 (0.91- 6.65) for PE patients ($p = 0.56$). P85 was 1.41 (1.20-6.29) for normal patients and 1.63 (1.32- 1.90) for PE patients ($p = 0.91$). AKT expression mean was 0.96 (0.84- 1.31) for normal patients and 1.55 (0.87- 1.86) for PE patients ($p = 0.41$). Also, HSP90 expression did not differ: 1.41 (0.52- 1.81) for normal patients and 0.83 (0.65- 2.38) for PE patients ($p = 0.53$). We obtained from Akt/PKB substrates (*phospho-AKT (Ser/Thr) substrate Antibody*) two well-defined visible bands at 160 and 45 kDA without differences between the two groups.

Protein expression in adipose tissue

IR β expression in adipose tissue was 1.58 (0.56- 3.23) and 2.00 (0.91- 6.65) (p= 0.53) for normal patients (n=11) and for PE patients (n=11), respectively. Akt/PKB expression was 1.10 (0.53- 1.73) for normal patients (n=9) and 1.66 (0.83-2.00) and for PE patients (p= 0.37). We did not obtain *blots* signals for other proteins.

DISCUSSION

PE is a multiple system disease of unknown cause (7). Obesity and insulin resistance (5) are risk factors for developing PE but the molecular mechanisms of this disturbance are not completely understood (14).

The mean gestational period for PE patients in this study was shorter than for normal patients resulting in prematurity and consequences of post prematurity (7). There was a statistical difference in the gestational period: PE patients had approximately 3 weeks less than normal patients. Systolic and diastolic blood pressure readings are important diagnostic criteria and were significantly higher in PE patients.

Our results showed that there were no significant differences in the analysis of basal expression of protein in Akt/PKB signaling in the placentas, skeletal muscle and adipose tissue of normal and PE patients. Evidence for Akt/PKB functions is demonstrated by Akt/PKB activation that is promoted by the *PI3-Kinase* signaling by which receptor tyrosine kinase is activated by auto-phosphorylation, such as insulin receptor and other growth factors (15). Once activated, *PI3-Kinase* phosphorylates *PtdIns(4,5)P2* second messenger to *PtdIns(3,4,5)P3* recruiting Akt/PKB to the plasma membrane that for its activation requires phosphorylation of Thr308 in the catalytic domain and Ser473 (in the regulatory domain). Scioscia in all (5) demonstrated a decrease in tyrosine phosphorylation of p85, *PI3-Kinase* regulatory subunit, in insulin-stimulated preparations of human preeclamptic placenta compared with normal

placenta. Alterations in basal levels of *PI3-Kinase* were expected because the main function of *PI3-Kinase* is Akt/PKB activation. However, our analysis showed similarities between the P85 expression of PE and normal placentas, skeletal muscle and adipose tissue. No signal was detected for phosphorylation of Akt/PKB at Ser473 and Thr308 by *Western blots*, only a strong signal for total protein (not phosphorylated) in the three tissues analyzed, but there were no differences in expression of Akt/PKB between the two groups in these tissues. The presence of phosphorylation of Akt/PKB at Ser473 and Thr308 seems to be strongly connected to its stimulation. An experiment with hepatoma cells culture insulin-stimulated, phosphorylation of Akt/PKB at Ser473 and Thr308 were present, and those unstimulated were practically nil (experiment not shown).

PDK1 is responsible for Thr308 phosphorylation which is recruited from the cytoplasm to the plasma membrane by PtdIns (3,4,5) P3 (13, 16, 17). More recently, the action of mTOR TORC2 complex has been ascribed to phosphorylate Akt/PKB at Ser473 (18). Ser473 phosphorylation is a decisive step for the activation of Akt/PKB required for establishment of its active form (19). Once activated, Akt/PKB can move into the cytoplasm or into the nucleus (20). It is evident that the levels of phosphorylation of Akt/PKB at Ser473 and Thr308 demonstrate activity in its signalization via unleashed by growth factors such as insulin. However, in placentas, abdominal skeletal muscle and adipose tissue, removed during the cesarean section, are difficult to analyze because the insulin stimulation occurs *in vitro* and, obviously, stimulation *in vivo* is impossible.

Small quantities of IR (insulin receptor) and defects of IR activation can lead to insulin resistance (21). However, basal expression of IR β in PE and in normal placenta was similar, corroborating evidence by Scioscia at all (5).

Several proteins that interact with and inhibit the Akt/PKB have been reported, such as CTMP (*carboxyl-terminal modulator protein*), Trb3 (Mammalian homologue tribblets), Keratin K10 and other positive regulators of Akt/PKB, including HSP90, HSP27, Tc11, Grb10, Ffl (10). We analyzed the

expressions of HSP90, a molecule of the Hsp family, that is induced by *heat shock* and that may alter the conformational state, establish or destabilize proteins under extracellular stress. During pregnancy, an oxidative stress explosion occurs in placenta tissue and this mechanism can contribute to preeclampsia pathophysiology (22). High levels of HSP90 increase the degree of tyrosine phosphorylation while low levels can degrade Akt/PKB (23). However, in our study the levels of HSP90 were similar between placentas and skeletal muscle in PE and normal patients. We did not find signal of Hsp90 expression in adipose tissue perhaps due to the difficulty of extracting protein from this tissue.

Once active, the Akt/PKB phosphorylate substrates in the cytoplasm or translocate to the nucleus. To identify Akt/PKB substrates, we used an antibody commercially available that recognizes the RXXXX(pT/pS) sequence. We identified four well-defined bands on the *blots* of placentas on positions at approximately 160; 100; 50-45 (double band) and 30 kDA. On skeletal muscle samples, we observed two well-defined bands in positions 160 kDA and 50-45 kDA (double band). Signal of Akt/PKB substrates was not found in adipose tissue probably because of the low quantity of protein extraction of the preparations that limited the technique used in this study.

We found in the placentas only one band of approximately 100 kDA, being a possible protein in the FOXO family (105 kDA) that includes transcription factors for many pro-apoptotic proteins such as BIM and binding FAS and that is inhibited by Akt/PKB, thus decreasing cell death (24). But there was no statistical difference between the PE and normal groups relative to this band.

GSK3 and Caspase 9 were found on position 45-50 kDA (double band). Akt/PKB can phosphorylate Caspase 9 on Ser196 and inhibit its function in the initial stages of apoptosis (25); however, this protein was not specifically analyzed. The greatest physiological function of Akt/PKB is regulation of cellular metabolism mediated by GSK3. Insulin increases the activity of Akt/PKB that inhibits GSK3 α and β , phosphorylating the Ser21 and Ser9, respectively. This results in glucose storage and glycogen synthesis (10, 26). Our *blots* showed a double band of substrates - serine and tyrosine phosphorylation of

50 and 45 kDA - suggesting they are GSK3 α (51 kDA) and GSK3 β (46 kDA). The quantifications for bands 45-50 kDA, as shown in Tables 2 and 3, concerning the placentas and skeletal muscle, were analyzed together because these bands were considered to be two GSK3 isoforms, as confirmed by using specific GSK3 β antibody that also confirmed the position of these bands throughout the experiments.

Greater serine phosphorylation of IRS1 and 2 and, consequently, a decrease of insulin signal in placentas of PE have already been observed (5). Yang (11) demonstrated the importance of Akt/PKB in animals for vascularization and development of placenta. Our results showed a similar basal activity of Akt/PKB substrates between PE and normal patients. Because these analyses were undertaken with regard to basal expression at the moment of delivery, further research concerning insulin stimulation of these tissues and analysis of Akt/PKB activation and its substrates is needed.

CONCLUSIONS

In our study, the basal expression of total Akt/PKB and its substrates serine/threonine phosphorylation (*motif RxRRxS/T*) were found to be similar in the placenta and skeletal muscle samples of preeclampsia and normal patients, suggesting equality of basal activity in this via. In placentas, in the basal state, GSK3 β and possible candidates, such as AS160, FKHR, Caspase9, P27 and GSK3 (total), have similar degrees of serine and tyrosine phosphorylation and, consequently, similar degrees of activation. In skeletal muscle, in the basal state, three possible substrates - AS160, GSK3 and Caspase9 - have similar activity in PE and normal patients. In adipose tissue, the basal expression of Akt/PKB was found to be similar in PE and normal patients but the low protein concentration in our tests probably made the detection of Akt/PKB substrates impossible. Our results suggest that there was no difference in Akt/PKB via, in basal state, in placentas and skeletal muscle of PE and normal patients. However we cannot exclude defects in this signaling via as pathophysiology of PE because it is necessary to analyze this via during stimulation.

ACKNOWLEDGMENTS

We kindly thank Ms. Joanne Click for her careful English revision of our manuscript. Edison Capp, and Rafael Orcy are recipients of scholarships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). This work was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa do HCPA (03-371), PROF/CAPES, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (05/2148.4).

REFERENCES

1. Kossenjans W, Eis A, Sahay R, Brockman D, Myatt L. Role of peroxynitrite in altered fetal-placental vascular reactivity in diabetes or preeclampsia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Apr;278(4):H1311-9.
2. Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet*. 2001 Jan 6;357(9249):53-6.
3. Walker JJ. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2000 Oct 7;356(9237):1260-5.
4. Sesti G. Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006 Dec;20(4):665-79.
5. Scioscia M, Gumaa K, Kunjara S, Paine MA, Selvaggi LE, Rodeck CH, et al. Insulin resistance in human preeclamptic placenta is mediated by serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and -2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Feb;91(2):709-17.
6. Seely EW, Solomon CG. Insulin resistance and its potential role in pregnancy-induced hypertension. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Jun;88(6):2393-8.
7. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005 Feb 26-Mar 4;365(9461):785-99.
8. Wolf M, Sandler L, Munoz K, Hsu K, Ecker JL, Thadhani R. First trimester insulin resistance and subsequent preeclampsia: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Apr;87(4):1563-8.
9. Obata T, Yaffe MB, Leparac GG, Piro ET, Maegawa H, Kashiwagi A, et al. Peptide and protein library screening defines optimal substrate motifs for AKT/PKB. *J Biol Chem*. 2000 Nov 17;275(46):36108-15.
10. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*. 2005 Jan-Mar;9(1):59-71.
11. Yang ZZ, Tschopp O, Hemmings-Mieszczak M, Feng J, Brodbeck D, Perentes E, et al. Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth. *J Biol Chem*. 2003 Aug 22;278(34):32124-31.
12. Marte BM, Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci*. 1997 Sep;22(9):355-8.
13. Fayard E, Tintignac LA, Baudry A, Hemmings BA. Protein kinase B/Akt at a glance. *J Cell Sci*. 2005 Dec 15;118(Pt 24):5675-8.

14. Kaaja R, Laivuori H, Laakso M, Tikkanen MJ, Ylikorkala O. Evidence of a state of increased insulin resistance in preeclampsia. *Metabolism*. 1999 Jul;48(7):892-6.
15. Alessi DR, Caudwell FB, Andjelkovic M, Hemmings BA, Cohen P. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett*. 1996 Dec 16;399(3):333-8.
16. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*. 1997 Apr 1;7(4):261-9.
17. Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, et al. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science*. 1998 Jan 30;279(5351):710-4.
18. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005 Feb 18;307(5712):1098-101.
19. Yang J, Cron P, Good VM, Thompson V, Hemmings BA, Barford D. Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat Struct Biol*. 2002 Dec;9(12):940-4.
20. Andjelkovic M, Jakubowicz T, Cron P, Ming XF, Han JW, Hemmings BA. Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 11;93(12):5699-704.
21. Bhattacharya S, Dey D, Roy SS. Molecular mechanism of insulin resistance. *J Biosci*. 2007 Mar;32(2):405-13.
22. Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol*. 2000 Dec;157(6):2111-22.
23. Solit DB, Basso AD, Olshen AB, Scher HI, Rosen N. Inhibition of heat shock protein 90 function down-regulates Akt kinase and sensitizes tumors to Taxol. *Cancer Res*. 2003 May 1;63(9):2139-44.
24. Yang JY, Xia W, Hu MC. Ionizing radiation activates expression of FOXO3a, Fas ligand, and Bim, and induces cell apoptosis. *Int J Oncol*. 2006 Sep;29(3):643-8.
25. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998 Nov 13;282(5392):1318-21.
26. Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci*. 2001 Nov;26(11):657-64.

Table 1: Patient profiles

| | Normal | PE | P |
|---------------------------------|----------------|----------------|----------|
| Age (years) | 26.29 ± 8.16 | 27.05 ± 7.81 | 0.78 |
| IMC (kg/m ²) | 28.54 ± 4.62 | 29.85 ± 5.08 | 0.43 |
| Gestational period (days) | 258.94 ± 18.70 | 236.82 ± 21.31 | 0.002* |
| Glycemic control (mg/dL) | 79.15 ± 6.59 | 91.09 ± 22.36 | 0.07 |
| Glucose tolerance test (mg/dL) | 103.97 ± 20.39 | 90.58 ± 33.70 | 0.52 |
| Systolic blood pressure (mmHg) | 112.30 ± 15.35 | 149.23 ± 25.96 | < 0.001* |
| Diastolic blood pressure (mmHg) | 70.76 ± 9.54 | 98.46 ± 14.05 | < 0.001* |

*Student t test

Table 2: Protein expression in placentas

| Protein | n | Normal | n | PE | P |
|------------------|----------|-------------------|----------|-------------------|----------|
| IR β | 11 | 4.78 (2.87- 6.70) | 11 | 6.74 (4.47- 8.75) | 0.20 |
| IRS-1 | 16 | 0.47 (0.19- 1.05) | 11 | 0.33 (0.12- 0.57) | 0.36 |
| P85 | 16 | 1.12 (0.83- 1.62) | 16 | 1.29 (0.89- 1.96) | 0.42 |
| Akt/PKB | 17 | 1.85 (1.07- 3.12) | 12 | 1.53 (1.27-3.08) | 1.00 |
| AKTsubs30 kDA | 16 | 1.25 (0.39- 1.89) | 11 | 1.67 (0.90- 4.09) | 0.25 |
| AKTsubs45-50 kDA | 17 | 3.59 (1.58- 6.59) | 12 | 3.41 (1.63- 5.94) | 0.81 |
| AKTsubs100 kDA | 17 | 0.89 (0.17- 2.20) | 11 | 0.51 (0.35- 1.34) | 0.58 |
| AKTsubs160 kDA | 8 | 0.44 (0.24- 1.02) | 9 | 0.46 (0.28- 0.63) | 0.81 |
| HSP90 | 16 | 1.5 (1.06- 2.82) | 12 | 1.79 (1.40- 4.07) | 0.56 |
| GSK3 β | 17 | 2.87 (1.77- 5.70) | 12 | 2.83 (1.58- 5.01) | 0.88 |

Table 3: Protein expression in skeletal muscle

| Protein | n | Normal | n | PE | p |
|------------------|----------|-------------------|----------|-------------------|----------|
| IR β | 11 | 1.58 (0.56- 3.23) | 11 | 2.00 (0.91- 6.65) | 0.56 |
| P85 | 11 | 1.41 (1.20- 6.29) | 09 | 1.63 (1.32- 1.90) | 0.91 |
| Akt/PKB | 11 | 0.96 (0.84- 1.31) | 09 | 1.55 (0.87-1.86) | 0.41 |
| AKTsubs45-50 kDA | 11 | 1.34 (0.79- 1.49) | 09 | 1.55 (1.14- 2.10) | 0.33 |
| AKTsubs160 kDA | 11 | 1.17 (0.87- 1.60) | 09 | 1.09 (0.87- 1.72) | 0.82 |
| HSP90 | 8 | 1.41 (0.52- 1.81) | 10 | 0.83 (0.65- 2.38) | 0.53 |

Figure 1

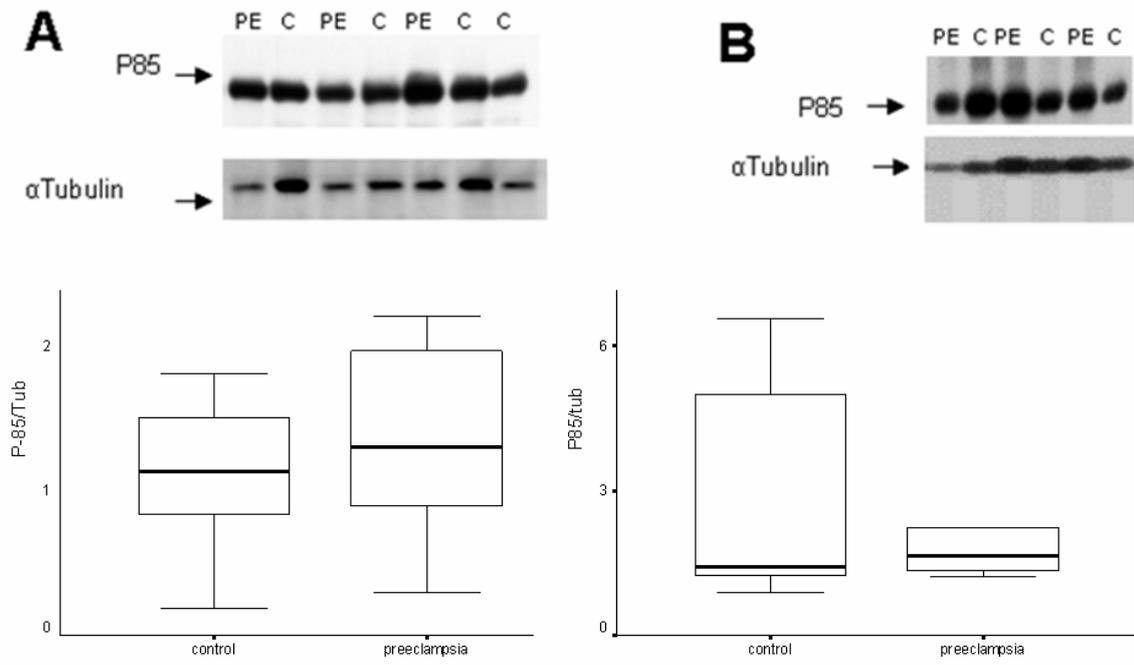


Figure 2

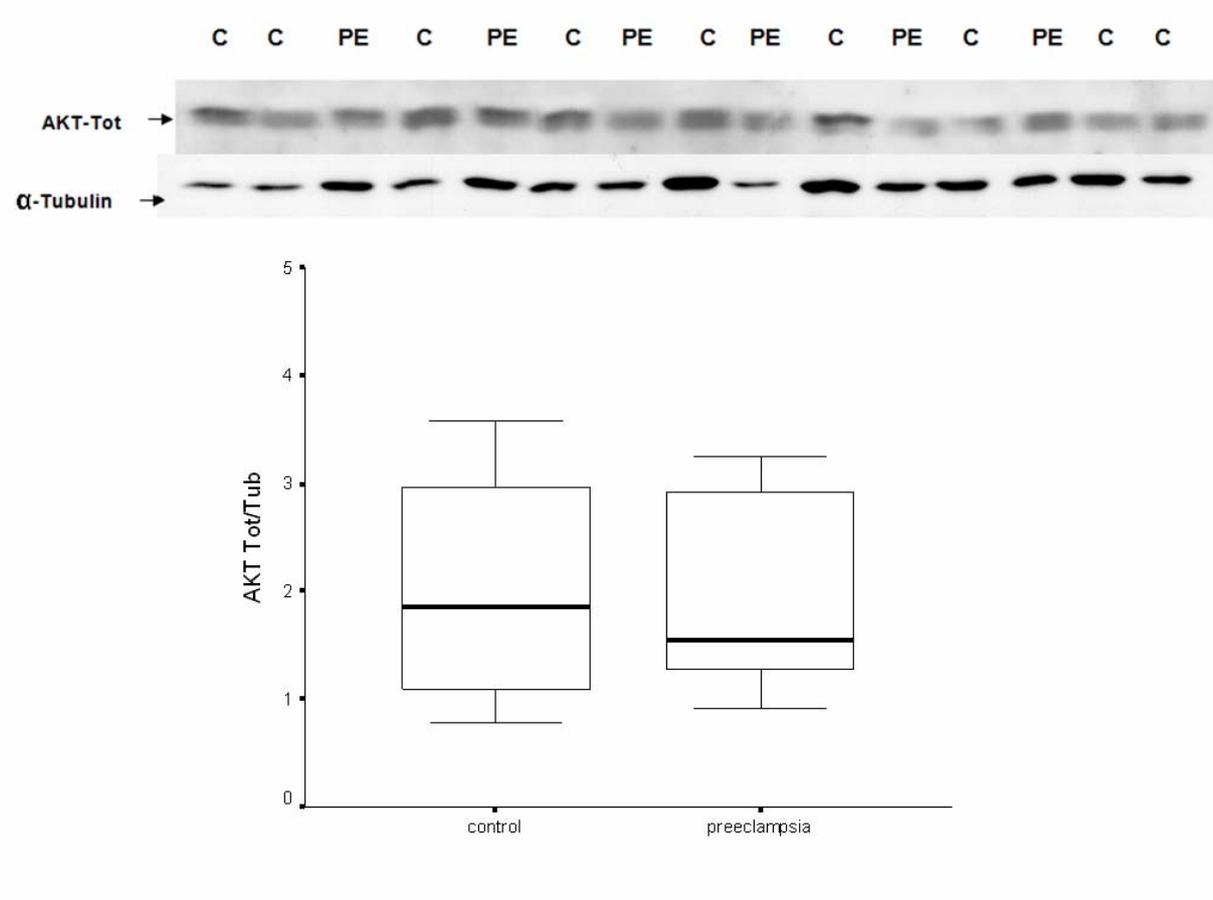
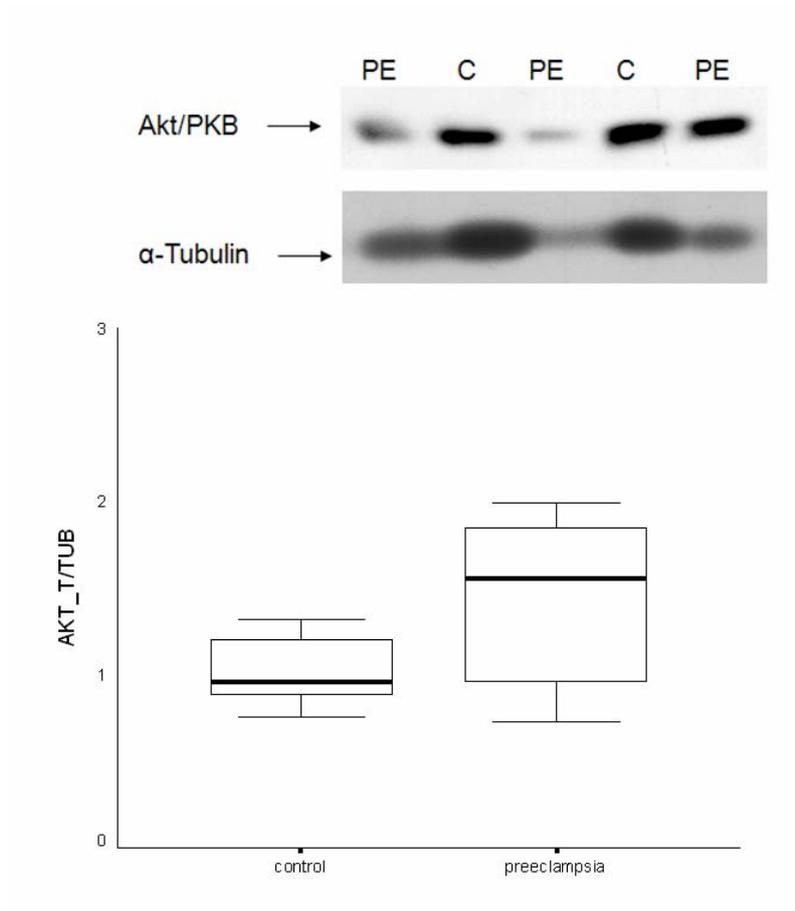


Figure 3



LEGENDS

Figure 1- **A-** Basal expression of P85/ Alfa-Tubulin in PE placentas (group 2) n=16; 1.29 (0.89- 1.96) and Normal (group 1) n= 16; 1.12 (0.83- 1.62) with p= 0.42. **B-** Basal expression of P85/ Alfa-Tubulin in PE skeletal muscle (group 2) n= 11; 1.41 (1.20- 6.29) and Normal (group 1) n= 09; 1.63 (1.32- 1.90) p=0.91.

Figure 2 – **A:** Total Akt/PKB expression normalized by alfa-tubulin in PE placentas (group 2, n=12) 121.53 (1.27-3.08) and controls (C) (group 1, n=17) 171.85 (1.07- 3.12) with p = 1.00.

Figure 3- representation of Immunoblot in skeletal muscle with anti- Akt/PKB total and anti- α -Tubulin in normal patients (C) and with preeclampsia (PE). Akt/PKB expression normalized by α -Tubulin. Group 1 (C) normal patients n= 11; 0.96 (0.84- 1.31) in group 2 Preeclampsia (PE) n= 09; 1.55 (0.87-1.86) with p=0.41. Mann-Whitney test results show mean (25%- 75%).