

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

**ATIVIDADE DA VIA DE SINALIZAÇÃO DA Akt/PKB EM PLACENTA DE
PACIENTES COM PRÉ-ECLÂMPSIA**

GUSTAVO DIAS FERREIRA

Orientador Prof. Dr. Edison Capp

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS, como requisito
para obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre, março de 2010

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Professores e Funcionários.

Professor Edison Capp, meu orientador, pela aceitação, confiança, sugestões e conselhos prestados na realização do trabalho.

Professora Ilma Brum, pela sua enorme dedicação e apoio, sempre se mostrando disposta a ajudar.

Professora Helena Corleta pelo estímulo e conselhos.

Professores Maria Flávia Ribeiro e Alex Sander Araújo pela ajuda e ensinamentos.

Enfermeiras, Técnicas e Residentes do Centro Obstétrico do HCPA por permitirem e ajudarem na realização deste projeto.

Aos meus colegas de laboratório, principalmente Vanderlei, Lolita, Gisele, Vanessa, Fernanda, Patrícia, Carol, Aline, Tiago, Bruna, Klaus, Vívian e Ana Paula, pela paciência, ensinamentos e o excelente convívio diário de trabalho.

Aos meus colegas de Mestrado pela amizade e trocas constantes.

Meu grande amigo, Rafael Orcy, pela tranquilidade, paciência, ensinamentos e ajuda constante em toda realização do trabalho.

Aos meus pais, Sérgio e Rosângela, e minha irmã, Juliana, pelo apoio, carinho e amor incondicional. A eles dedico este trabalho, pois sem eles nada disso seria possível.

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE GRÁFICOS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. PRÉ-ECLÂMPسيا.....	13
1.1.1. CARACTERIZAÇÃO E DIAGNÓSTICO	13
1.1.2. FATORES DE RISCO	16
1.1.3. FISIOPATOLOGIA DA PRÉ-ECLAMPSIA	18
1.1.4. COMPLICAÇÕES MATERNO-FETAIS DA PRÉ- ECLAMPSIA.....	22
1.2. VIA DE SINALIZAÇÃO Akt/PKB	23
1.2.1. RECEPTOR TIROSINA QUINASE	23
1.2.2. ATIVAÇÃO DA FOSFATIDILINOSITOL 3 QUINASE (PI3K).....	24
1.2.3. Akt/PROTEÍNA QUINASE B	25
2. HIPÓTESE	30
3. OBJETIVOS	31
4. MÉTODO.....	32
4.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO	32
4.2. POPULAÇÃO E AMOSTRAS	32
4.3. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	33
4.4. COLETA DAS AMOSTRAS	33

4.5. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E ESTIMULAÇÃO COM INSULINA.....	33
4.6. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA	35
4.7. WESTERN BLOTS	35
4.8. AUTORADIOGRAFIAS.....	37
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4.10. CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA	38
5. RESULTADOS	39
5.1. CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES	39
5.2. ESTIMULAÇÕES DAS AMOSTRAS	42
5.3. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Akt/PKB EM PLACENTAS.....	45
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÃO.....	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
9. ANEXO I.....	59
10. ANEXO II - CONSENTIMENTO INFORMADO	60
11. ANEXO III – ARTIGO EM INGLÊS.....	61

RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é causa importante de mortalidade fetal e materna. Existem evidências que a resistência à insulina esteja implicada em sua fisiopatologia. A via Akt/PKB (Akt/ Proteína quinase B) é estimulada pela insulina e exerce várias funções vitais como crescimento, sobrevivência e metabolismo celular. O objetivo do trabalho foi comparar a expressão da Akt/PKB em placentas de pacientes normais e com pré-eclâmpsia estimuladas com insulina. Foram utilizadas amostras de placenta de 12 pacientes normais e de 12 pacientes com PE foram coletadas, estimuladas com insulina e analisadas por *Western blot* para quantificação da expressão da proteína Akt/PKB basal e fosforilada em serina473. Como resultados, a estimulação das amostras com a insulina foi comprovada quando comparamos grupos estimulados ($1,14 \pm 0,10$) e não estimulados ($0,91 \pm 0,08$), $P < 0,001$. A atividade da via da Akt/PKB fosforilada em serina473 foi semelhante entre placentas de mulheres normais ($1,26 \pm 0,16$) e com PE ($1,01 \pm 0,11$), $P = 0,237$. Concluímos que não há diferença de fosforilação na via da Akt/PKB, após estimulação com insulina, em placentas de pacientes com PE e normais. Contudo, não podemos descartar alterações desta via de sinalização na PE sem analisarmos os substratos da Akt/PKB quando estimulados.

ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is an 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 pathway is stimulated by insulin and performs several vital functions as growth, survival and cellular metabolism. Objective: to investigate stimulates expression of Akt/PKB pathway in the placenta, of normal and preeclampsia parturient. Method: samples were collected from 12 normal patients and 12 PE patients, stimulate and analyzed by Western blot to quantify the proteins expression in signaling of Akt/PKB. Results: stimulation of insulin samples was confirmed when comparing stimulated groups (1.14 ± 0.10) and non-stimulated (0.91 ± 0.08), $P < 0.001$. The Akt/PKB phosphor (Ser473) was not different in placenta of the normal (1.26 ± 0.16) and PE (1.01 ± 0.11) groups, with $P = 0.237$. Conclusions: there was no difference of phosphorylation in Akt/PKB pathway, after stimulation with insulin, in placentas of normal and PE patients. However, we cannot discard effects in this signaling pathway as pathophysiology of PE, because it is still necessary to analyze the substrates stimulation of this pathway.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Invasão trofoblástica na PE.....	20
Figura 2. Fosforilação da Akt/PKB nos sítios treonina 308 e serina 473.....	26
Figura 3. Ações dos substratos sobre as funções celulares.	28
Figura 4. Via <i>downstream</i> da Akt/PKB.	29
Figura 5. Western blot representativo com anticorpo Akt/PKB fosforilado.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de IMC segundo OMS.....	18
Tabela 2. Complicações da Pré-Eclampsia. Adaptado de Sibai, 2005.....	23
Tabela 3. Anticorpos.	38
Tabela 4. Perfil das pacientes	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Pressão arterial sistólica e diastólica das pacientes.	41
Gráfico 2. Análise da expressão da Akt/PKB fosforilada nos grupos controle e PE, estimulado e não estimulado.	44
Gráfico 3. Comparação da expressão da fosforilação entre os grupos controle e pré-eclâmpsia estimulados e não estimulados.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt/PKB	Akt/proteína quinase B
ATP	Trifosfato Adenosina
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
CIUR	Crescimento intra-uterino restrito
DCV	Doença Cardiovascular
DG	Diabetes Gestacional
dL	Decilitro
DM	Diabetes Mellitus
DPP	Descolamento prematuro de placenta
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide syntase</i>
GF	Fator de Crescimento
GFR	Receptor de Fator de Crescimento
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HG	Hipertensão Gestacional
HM	<i>Hydrophobic Motif</i>

HELLP	<i>Hemolysis Elevated Liver Enzymes Low Platelets</i>
HEPES	<i>4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
IMC	Índice de Massa Corporal
IR	Receptor de Insulina
IRS-1	Substrato 1 do Receptor de Insulina
KCl	Cloreto de Potássio
Kda	Kilodalton
Kg/m ²	Quilograma por metro quadrado
KH ₂ PO ₄	Hidrogenofosfato de Potássio
LDL	<i>Low Density Protein</i>
LaGOM	Laboratório de Ginecologia Obstetrícia Molecular
M	Molar
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmHg	Milimetro de mercúrio
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NC	Nitrocelulose
Nm	Nanômetro
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Fosforilada

PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PBS	Tampão Salina Fosfato
PDK1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase</i>
PE	Pré-eclâmpsia
pH	Potencial de Hidrogênio
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinase
PIP	Fosfoinosítídeos
PIP2	Fosfatidil inositol-bi-fostafo
PIP3	Fosfatidil inositol-tri-fostafo
rpm	Rotação por minute
RTK	Receptor Tirosina Quinase
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
Ser	Serina
Ser473	Sítio serina 473
THR308	Sítio treonina 308
Tris-HCl	Tris base Cloreto de Hidrogênio
v	Volts
µg	Micrograma
µm	Micrometro
µL	Microlitro

1. INTRODUÇÃO

1.1. PRÉ-ECLÂMPسيا

1.1.1. CARACTERIZAÇÃO E DIAGNÓSTICO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma doença multi-sistêmica, sendo considerada como um dos problemas mais graves à saúde da gestante [1]. A incidência desta doença varia entre 2% e 5% das gestações no Ocidente, mas esta complicação supera 10% das gestações nos países em desenvolvimento [1]. Esta complicação pode afetar tanto a saúde da mãe quanto a do feto [2], causando restrição no crescimento fetal, prematuridade e, em casos mais graves, morte materna [3-5].

A PE é uma doença própria da gestação e tem várias hipóteses etiológicas. Em 2000 houve concordância entre grupos de especialistas na área para estabelecer os critérios dos diagnósticos da pré-eclâmpsia [6]. Ela é caracterizada por hipertensão materna (pressão sanguínea sistólica e diastólica igual ou maior que 140 e 90 mmHg) em duas medidas com intervalo de 6 horas, proteinúria (excreção de proteína igual ou maior 300 mg em coleta de urina de 24 horas) [1, 6, 7] que ocorrem comumente após a 20^a semana de gestação e, mais frequentemente, próximo ao termo, em mulheres previamente normotensas. Dependendo do

envolvimento sistêmico, outros sintomas, como edema, vasoconstrição do leito vascular materno e aumento da resistência vascular [8], hemoconcentração, hipoalbuminemia, alteração de provas de função hepática, das provas de coagulação, aumento dos níveis de uratos (≥ 6 mg/dl) podem estar presentes [9, 10]. O diagnóstico da Síndrome HELLP inclui hemólise intravascular, elevação de enzimas hepáticas e trombocitopenia (plaquetas $< 100.000/\text{mm}^3$) [1, 4, 5].

Uma dificuldade atribuída para elucidação da PE está no período de desenvolvimento. Esta doença se desenvolve no início da gestação, entretanto seus sintomas aparecem geralmente no terceiro trimestre [11].

Os distúrbios hipertensivos, em mulheres previamente normotensas, podem evoluir para hipertensão gestacional (HG) ou PE (com proteinúria e/ou outros sinais). Na PE, há normalização da pressão arterial cerca de seis semanas após o parto, porém essas mulheres apresentam maior risco de hipertensão em fases mais tardias da vida [12]. 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, sendo que permanece incerto se a PE e a HG são doenças diferentes ou graus diferentes da mesma doença [12].

A medida da proteinúria em 24 h é o método mais seguro para o diagnóstico. Caso a proteinúria de 24 h não possa ser mensurada, realizar-se a relação proteína/creatinina em amostra de urina: relação maior que 0,5 é o ponto de corte considerado para diagnóstico [13]. Teste com bastão (multistix) pode ainda ser utilizado, sendo considerados valores acima de 1+ em duas mensurações separadas

por 6 horas. Contudo, seu uso não é consenso e não é usado como critério para diagnóstico de proteinúria na PE por grupos norte-americanos [7].

A PE pode ter um início precoce (pré-eclampsia com início antes de 34 semanas de gestação) ou tardio (pré-eclampsia partida após 34 semanas de gestação), pode mostrar sintomas leves ou mais graves (pressão sanguínea sistólica maior que 160 mmHg ou diastólica maior que 110 mmHg, proteinúria maior que 5 g/24 h, oligúria, sintomas neurológicos e eclâmpsia nos casos mais severos [1]).

Essa doença tem incidência aumentada em mulheres nulíparas, em mulheres que concebem com a técnica de reprodução assistida e em mulheres que sofrem de doenças auto-imunes [1, 14, 15]. Mulheres com história de pré-eclampsia severa têm o risco aumentado de desenvolver doença cardiovascular (DCV) no futuro [16, 17].

Até o momento, apesar das pesquisas, nenhuma abordagem terapêutica para prevenção ou tratamento da PE é conhecida. Terapias com vitaminas profiláticas antioxidantes, cálcio ou a suplementação com ácido fólico e ácido acetilsalicílico não se mostraram efetivas para a prevenção em nulíparas saudáveis, embora algum benefício tenha sido demonstrado nos grupos de alto risco [18-22].

Conseqüentemente, a cura da PE só é atingida com a interrupção da gestação e a remoção da placenta [1, 5]. Assim, a PE está entre as principais causas de morbi/mortalidade materna e neonatal em todo mundo [1].

A síndrome metabólica (síndrome X), que é caracterizada por presença de obesidade, hipertrigliceridemia, hiperglicemia, resistência à insulina e hipertensão,

está associada com a PE [23, 24]. Estudos atuais evidenciam que a síndrome de resistência à insulina pode contribuir com a fisiopatologia da pré-eclampsia, e este mecanismo é também apontado como possível desencadeador da hipertensão gestacional [12, 25, 26]. Todavia, ainda existem dúvidas se esta resistência à insulina realmente desencadeia ou é apenas uma consequência da PE [6, 27].

Além de a alteração endotelial vascular provocar a hipertensão, há um aumento da permeabilidade vascular que resulta em edema. Proteínas angiogênicas afetam o mecanismo de filtração renal e são responsáveis pela proteinúria [27].

1.1.2. FATORES DE RISCO

A pré-eclâmpsia é duas vezes mais frequente em nulíparas do que em multíparas. No entanto, a troca de parceiro aumenta o risco da doença para multíparas, sugerindo correlações imunológicas. Embora a maioria dos casos de pré-eclampsia seja esporádica, observações sugerem que fatores genéticos desempenham um papel na susceptibilidade à doença. Primigestas com história familiar de pré-eclampsia (mãe ou irmã) têm de dois a cinco vezes maior risco da doença do que primigestas sem essa história [9, 28].

Mulheres com gestações múltiplas (gêmeos e trigêmeos) são mais susceptíveis de desenvolver pré-eclampsia. Além disso, um abortamento ou uma gestação normal prévia diminui o risco para próxima gestação, mas se houver troca de parceiro, o risco aumenta novamente. Os extremos da idade materna também são fatores de risco para PE (idade materna maior que 40 ou menor de 20) [7, 29,

30]. A frequência de PE em mulheres com episódio prévio de PE é em torno de 15 - 25 % [31, 32].

Mulheres negras têm uma incidência de PE duas vezes maior do que mulheres brancas. A obesidade é considerada um fator de risco importante [7]. O índice de massa corporal (IMC) materna e a resistência à insulina são fatores de risco diretamente implicados com o desenvolvimento de PE e disfunções endoteliais, sendo que para cada 5 a 7 kg/m² de aumento no IMC o risco para PE dobra [23].

O IMC relaciona a altura com o peso para estabelecer o percentual de massa gorda, determinando a quantidade de adiposidade do corpo. O valor é obtido dividindo-se o peso pela altura ao quadrado [23]. A classificação adotada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é apresentada na Tabela 1.

Fatores como hipertensão, diabetes, aumento da resistência para insulina, são fatores de risco para PE e comuns para doença endotelial – como aterosclerose - e *diabetes mellitus* tipo II [2]. Além disso, dislipidemias, com aumento de triglicérides e 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 [16, 17].

Tabela 1. Classificação de IMC segundo OMS.

IMC < 18,5 kg/m ²	Baixo peso
IMC ≥ 18,5 até 25 kg/m ²	Peso normal
IMC ≥ 25 até 29,9 kg/m ²	Sobrepeso
IMC ≥ 30,0 kg/m ²	Obesidade

1.1.3. FISIOPATOLOGIA DA PRÉ-ECLAMPSIA

A pré-eclâmpsia está relacionada com a má inserção da placenta, por falha de invasão do trofoblasto, e inadequada invasão das arteríolas espiraladas promovendo aumento da resistência vascular e maior resposta inflamatória materna (Figura 1). A formação inadequada dos leitos capilares resulta em má perfusão fetal, podendo causar restrição de crescimento, oligúria fetal, prematuridade e morte fetal intra-útero [5, 9, 33-35].

Na gravidez normal, as artérias espiraladas que perfundem a placenta sofrem notável remodelação, distendendo-se significativamente e penetrando no interior do miométrio. Este processo começa provavelmente no primeiro trimestre da gravidez, e se completa em torno de 18 a 20 semanas de gestação. Esta extensa modificação não ocorre na pré-eclâmpsia, quando o citotrofoblasto, apesar de infiltrar parte da decídua, não consegue penetrar na porção miometrial. Assim, os vasos

permanecem estreitos levando à hipoperfusão [33, 34, 36]. A inadequada invasão trofoblástica nas artérias uterinas espiraladas, resulta em relativa isquemia placentária, seguida de liberação placentária de proteínas angiogênicas que levariam à disfunção endotelial generalizada [27].

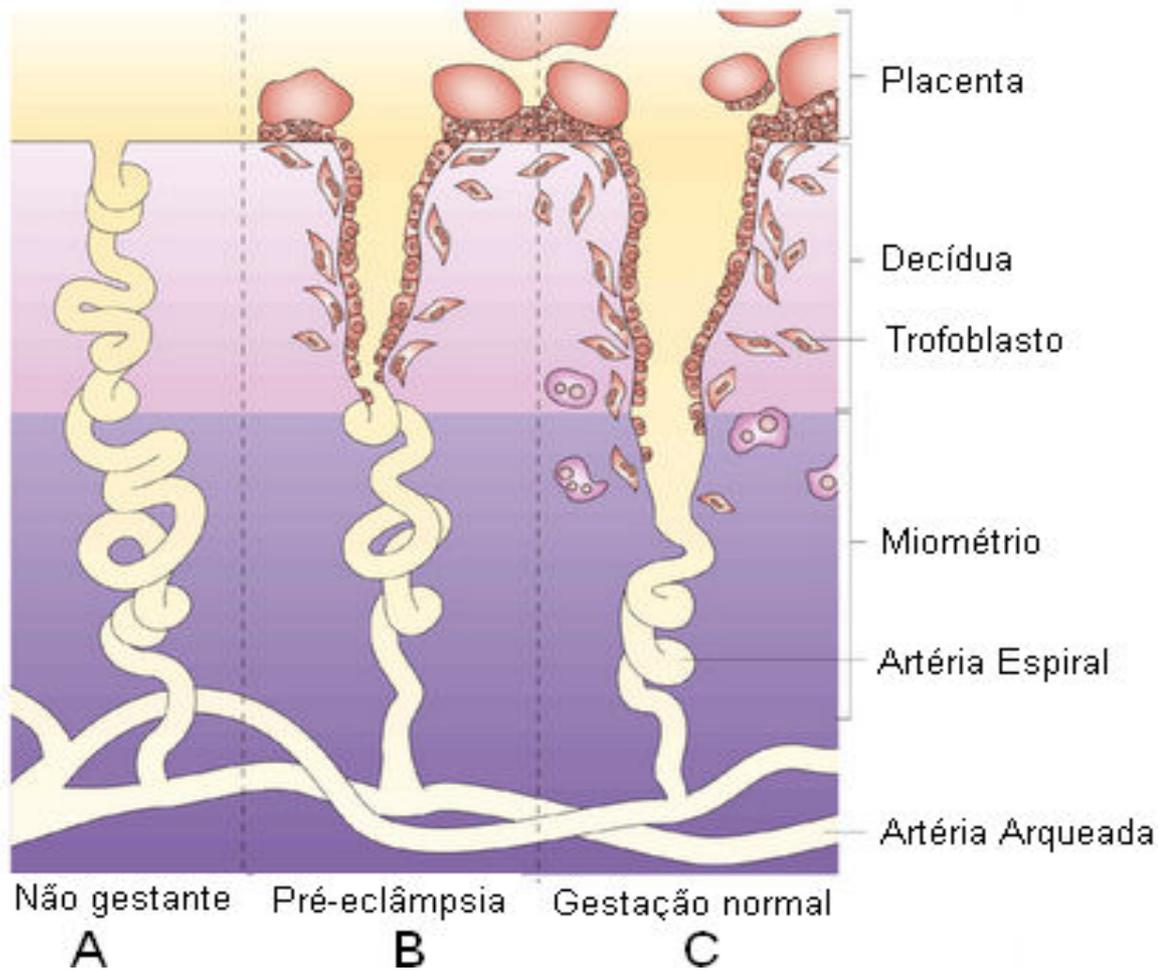


Figura 1. Invasão trofoblástica na PE.

O esquema (acima) demonstra a artéria espiral no miométrio de uma mulher não gestante (A), gestante com pré-eclâmpsia (B) e gestante normal (C). Observa-se a maior invasão trofoblástica na gestação normal, fazendo com que o leito placentário tenha uma baixa resistência e alto fluxo quando comparado ao da gestante com PE.

Em 2006, foi descrito por Scioscia e colaboradores, 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 (Substrato do Receptor de Insulina-1) em mulheres com PE do que em mulheres normais [25].

A resistência à insulina é definida pela alta concentração sérica de insulina em associação com concentração de glicose sérica normal ou elevada. Quando a resistência à insulina se associa com diabetes tipo 2, hipertensão, perfil lipídico aterogênico (o qual inclui hipertrigliceridemia, baixo HDL-colesterol, alto LDL-colesterol) é então chamada Síndrome Metabólica (ou síndrome de resistência à insulina ou síndrome X) [25].

A gravidez normal é caracterizada por ser um período de aumento da resistência à insulina e consequente hiperinsulinemia. Estas atingem seu máximo no terceiro trimestre e é mediado por várias alterações hormonais. Na pré-eclampsia, parece haver um aumento exagerado de resistência à insulina e de alterações metabólicas. Os estudos disponíveis são consistentes com a hipótese de que a resistência à insulina tem um papel na patogênese da pré-eclampsia [25].

A resistência à insulina, com consequente hiperinsulinemia [36], parece ser causada por um defeito na transmissão do sinal de insulina nas células. Tardiamente à gestação, a hiperinsulinemia permanente pode contribuir para o aumento do risco para doença cardiovascular, como coronariopatia isquêmica, e para desenvolver doenças como diabetes *mellitus* (DM) e hipertensão arterial sistêmica (HAS) [37].

O estresse oxidativo parece ter também um papel na patogênese da PE e da diabetes gestacional (DG), estando relacionado com o aumento da formação de espécies reativas ao oxigênio e ou a diminuição da habilidade antioxidativa [38].

1.1.4. COMPLICAÇÕES MATERNO-FETAIS DA PRÉ- ECLAMPSIA

Os resultados maternos e perinatais da pré-eclampsia dependem de fatores como idade gestacional em que a doença tem início e da severidade do quadro. Geralmente os resultados são melhores em gestantes com pré-eclampsia leve iniciada após 36 semanas de gestação. Já em pacientes que desenvolvem a doença antes de 33 semanas de gestação, nas com doenças pré-existentes e nas gestantes de países em desenvolvimento, há grande aumento na morbi/mortalidade materna e perinatal [1].

As complicações maternas são relacionadas aos efeitos da pré-eclampsia nos vários órgãos, aos efeitos do aumento da pressão arterial e aos problemas associados ao parto, tais como hemorragia, descolamento prematuro de placenta (DPP), coagulação intravascular, edema pulmonar e sangramento pós-operatório. As complicações serão maiores se a pré-eclampsia for grave ou se ocorrer eclâmpsia.

As complicações fetais na pré-eclampsia são decorrentes do DPP, inadequada perfusão placentária ou parto pré-termo [7]. A Tabela 2 mostra as complicações mais freqüentes da PE.

Tabela 2. Complicações da Pré-Eclampsia.

MATERNAS	FETAIS
DPP (1 – 4%)	Prematuridade (15-67%)
CIVD/ Síndrome HELLP (10–20%)	CIUR (10-25%)
Edema Pulmonar / Aspiração (2 -5%)	Hipóxia- dano neurológico (<1%)
Insuficiência renal aguda (1-5%)	Morte perinatal (1-2%)
Eclâmpsia (<1%)	Morbidade cardiovascular futura associada ao CIUR
Insuficiência hepática/hemorragia (<1%)	
Acidente vascular Cerebral (raro)	
Morte (rara)	
Morbidade cardiovascular futura	

DPP: descolamento prematuro de placenta; CIVD: coagulação intravascular disseminada; HELLP (hemólise, elevação enzimas hepáticas e diminuição de plaquetas); CIUR: crescimento intra-uterino restrito. Adaptado de Sibai, 2005.

1.2. VIA DE SINALIZAÇÃO AKT/PKB

1.2.1. RECEPTOR TIROSINA QUINASE

O receptor de insulina (IR) pertence à família dos receptores tirosina quinases

(RTKs). Estes são caracterizados por ter domínios extracelular, transmembrana e intracelular [39, 40].

No domínio extracelular é onde ocorre a ligação do fator de crescimento ou hormônio. A porção intracelular tem atividade intrínseca de tirosina quinase, a qual é ativada após ligação extracelular [39].

O IR é uma proteína heterotetramétrica, isto é, tem duas subunidades extracelulares (alfa) e duas subunidades transmembrana-intracelulares (beta). Estas últimas, após ligação da insulina, sofrem modificação conformacional, se autofosforilam e desencadeiam a cascata intracelular de transmissão do sinal. A importância da atividade de tirosina quinase do receptor de insulina na transdução deste sinal hormonal está bem estabelecida [40, 41].

1.2.2. ATIVAÇÃO DA FOSFATIDILINOSITOL 3 QUINASE (PI3K)

A autofosforilação de receptores tirosina quinase por ligação de fatores de crescimento, como insulina, ativa a via *downstream* da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) [42-45].

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. Elas são

classificadas em três classes (I, II e III), sendo que a classe I é dividida em duas subclasses A e B. As PI3Ks classe IA são ativadas por receptores tirosina quinase (RTK) pois possuem uma subunidade p85 regulatória essencial para essa interação, enquanto as PI3Ks classe IB, as quais são ativadas por receptores acoplados à proteína G, não possuem essa subunidade. As diferentes classes de PI3K ainda diferem quanto à capacidade de fosforilar os lipídeos de membrana, sendo capacidade de fosforilar fosfatidil inositol-bi-fosfato (PIP2) e produzir fosfatidil inositol-tri-fosfato (PIP3) até então descrita somente para PI3K classe I [46].

Uma vez ativada, a PI3K classe IA que é composta por duas subunidades (p85 e p110) fosforila os fosfoinosítídeos de membrana (PIP), transformando PIP2 em PIP3 [46, 47].

1.2.3. Akt/PROTEÍNA QUINASE B

A Akt/proteína quinase B (Akt/PKB) contém três domínios funcionais: 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*), sendo os domínios, central e HM altamente conservados. O domínio PH é essencial para ligação dessas proteínas em lipídios como fosfoinositol-tri-fosfato (PIP3), um fosfolípido de membrana plasmática [47-49].

Para a Akt/PKB ser ativada, é necessário a fosforilação do sítio treonina 308 (THR308) no domínio PH e a fosforilação do sítio serina 473 (Ser473) no domínio regulatório. Os domínios *Pleckstrin Homology* (PH) da Akt/PKB são atraídos do

citoplasma para a membrana por PIP3 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 [50] (Figura 2).

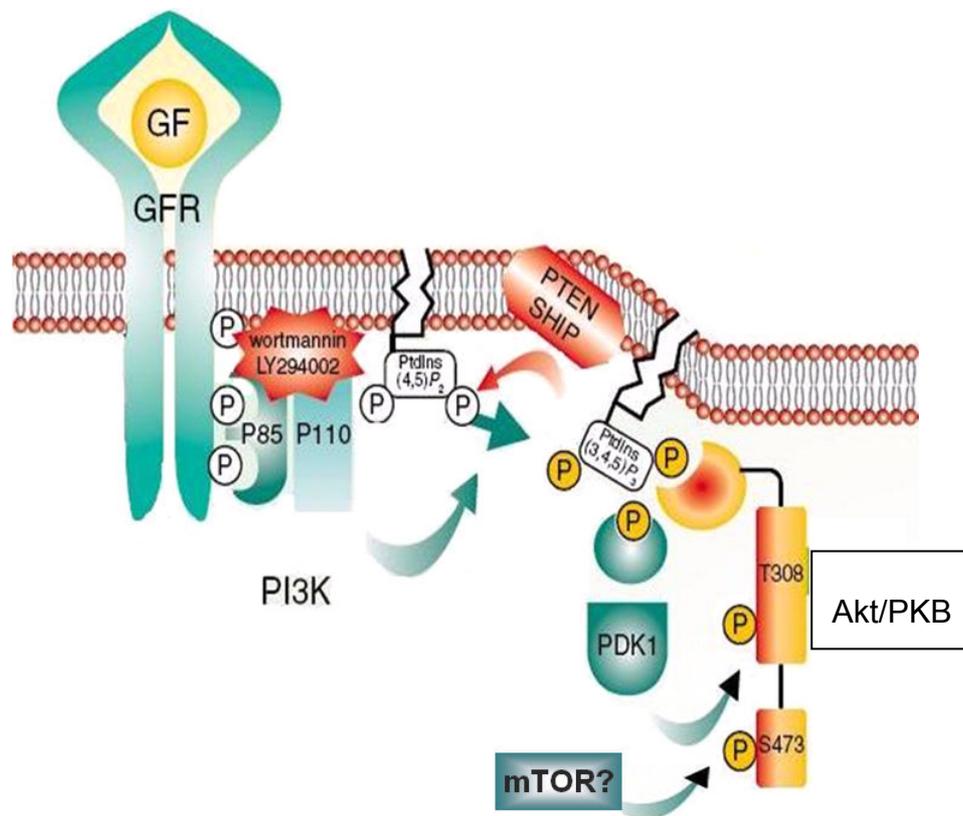


Figura 2. Fosforilação da Akt/PKB nos sítios serina 473 e treonina 308.

GF (Fator de crescimento), GFR (Receptor de Fator de Crescimento), PI3K (fosfatidil inositol 3 quinase), p85 (subunidade da PI3K), p110 (subunidade de PI3K).

A fosforilação do sítio treonina 308 (THR308) 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.

A fosforilação do sítio Ser473 (no domínio regulatório) mantém-se controversa, mais recentemente *mTOR complex (mammalian target of rapamycin)* foi indicado como a quinase responsável pela fosforilação do sítio Ser473 (Figura 2) [51]. 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 [52]. Uma vez ativada a Akt/PKB pode se translocar para o citoplasma ou para o núcleo celular, podendo fosforilar seus substratos [53].

Os 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. Há vias de sinalização que conferem a vários substratos da Akt/PKB a participação em mais de uma dessas funções como demonstra as figuras 3 e 4.

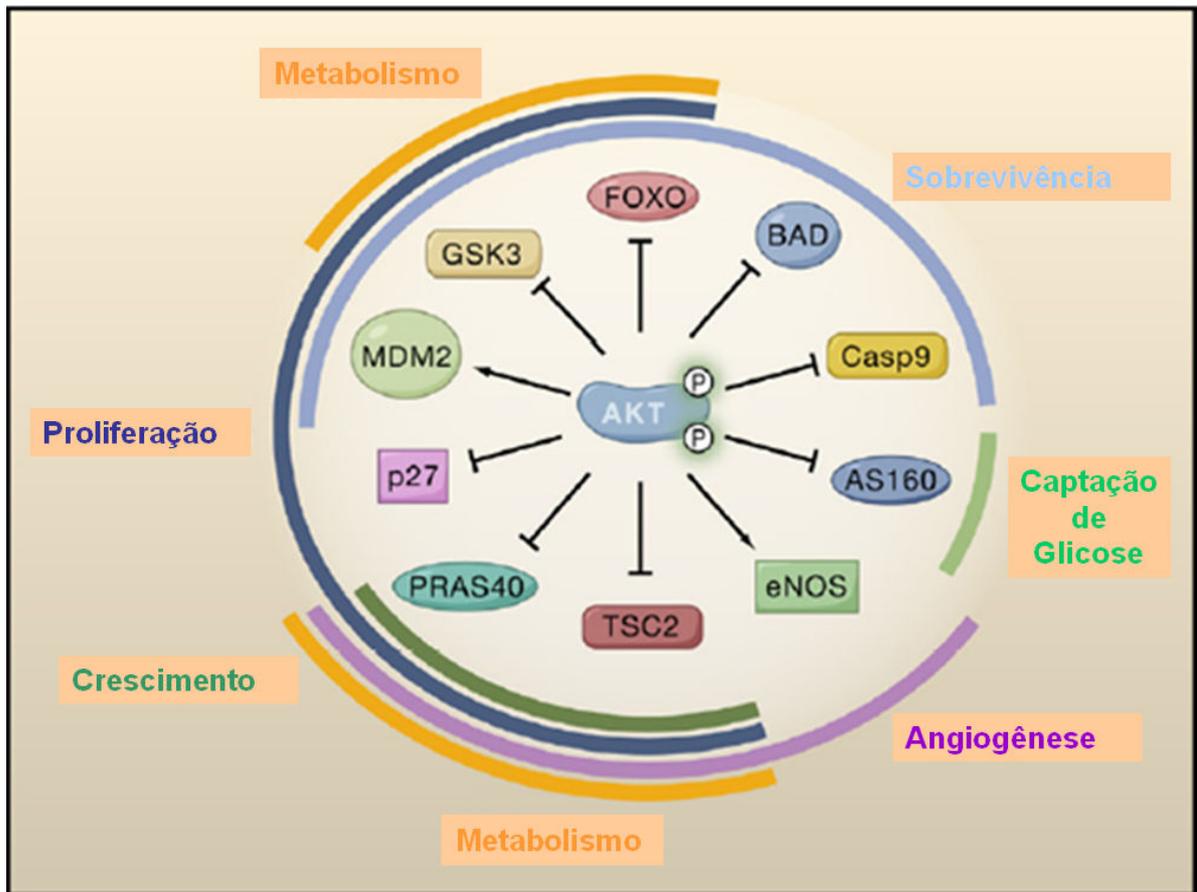


Figura 3. Ações dos substratos sobre as funções celulares.

O diagrama mostra que a fosforilação de um substrato da Akt/PKB pode inibir ou estimular suas funções, sendo que essa fosforilação irá repercutir em uma ou mais funções celulares.

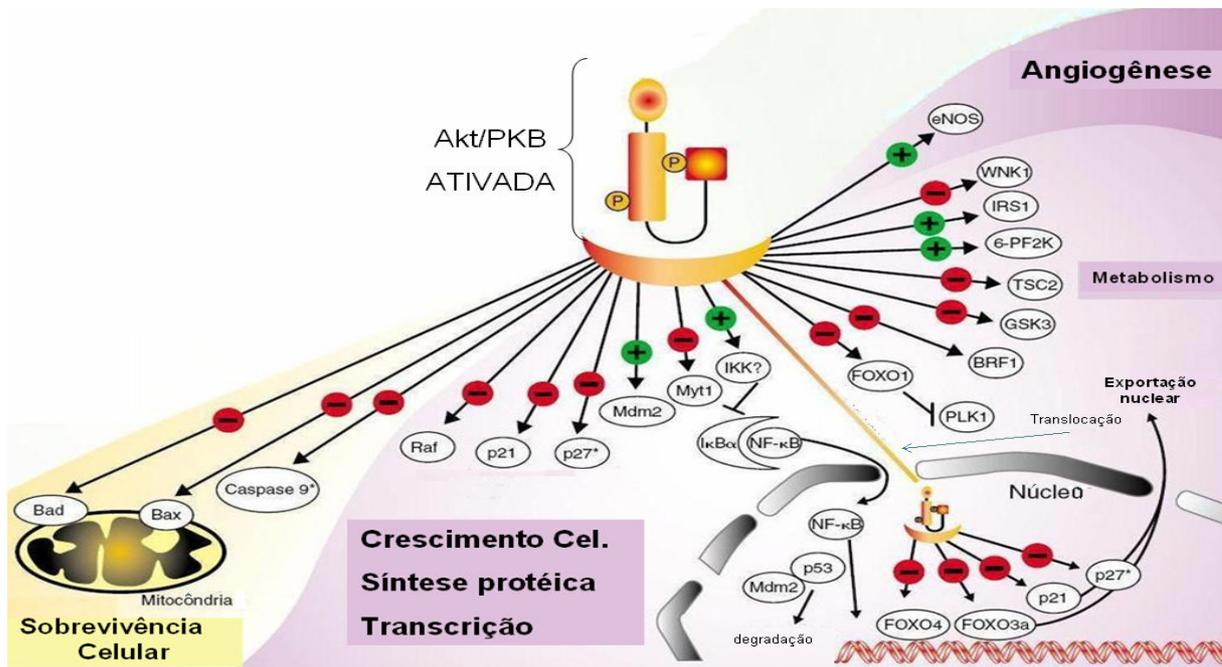


Figura 4. Via downstream da Akt/PKB.

A Akt/PKB tem como funções primordiais a 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.

2. HIPÓTESE

A transdução do sinal da Akt/PKB estimulada por insulina é menor em placentas de pacientes com pré-eclâmpsia comparadas com normais demonstrando resistência à insulina.

3. OBJETIVOS

- ✓ Estabelecer a técnica para isolamento e estimulação do tecido placentário com insulina.

- ✓ Verificar e comparar a atividade da Akt/PKB em placenta de parturientes normais e com pré-eclâmpsia, estimuladas e não estimuladas com insulina.

- ✓ Comparar a atividade da Akt/PKB total e fosforilada no sítio de serina 473.

4. MÉTODO

4.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foi realizado um ensaio experimental, caso-controle.

4.2. POPULAÇÃO E AMOSTRAS

Participaram desse trabalho, 12 pacientes normais (controle) e 12 pacientes com pré-eclâmpsia (PE). As amostras de tecido placentário coletadas foram distribuídas em quatro grupos: controle estimulado, controle não-estimulado, PE estimulado e PE não-estimulado. As amostras de placenta foram coletadas no momento do parto no Centro Obstétrico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período de julho de 2008 a julho de 2009.

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 parto 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 08-124). As pacientes foram informadas sobre os objetivos do projeto e foram incluídas após assinarem termo de consentimento informado (Anexo 2).

4.4. COLETA DAS AMOSTRAS

Aproximadamente 30 gramas de placenta foram obtidos imediatamente após a dequitação placentária. As amostras foram lavadas com PBS - Tampão Salina Fosfato (4°C) para retirada do excesso de sangue e levadas para o Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular (LaGOM), no Hospital de Clínicas de Porto Alegre para preparação e estimulação com a insulina.

4.5. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E ESTIMULAÇÃO COM INSULINA

A preparação da placenta foi realizada pela técnica de dissociação de Klein (1986) com modificações [54]. O tecido no laboratório foi pesado, separado de vasos sanguíneos e cortado em fatias finas, sendo adicionado 5 mL de tampão-BSA (*bovine serum albumin*) (32 mM HEPES, 195 mM NaCl , 7,2 mM KCl, 1,8 mM KH₂PO₄, 8,3 mM glicose, albumina 1 %) para cada 1 g de tecido. Foi adicionado 1 mg/mL de colagenase para dissociação (5 mg colagenase/5 mL Buffer- BSA/ 1 g

tecido). A seguir foi realizada incubação a 37°C em agitação orbital (100 rpm) por 45 min.

Após, foi adicionado o mesmo tampão para lavar e inibir a ação da collagenase e então, foi realizada filtração (com uma membrana de 250 µm) para remover as grandes partículas e fibrina remanescentes.

Para separação das células, a amostra foi dividida em dois tubos de 50 mL e centrifugada a 2000 x g, por 10 minutos, a 30°C.

Depois de desprezar o sobrenadante, uma pequena parte da amostra foi visualizada em lupa com Azul de Tripán, para observar a viabilidade das células antes da estimulação. As células, então, foram homogeneizadas com 0,5 mL de PBS. Estas amostras foram transferidas para dois tubos de 1,5 mL, onde foram incubadas com 0,5mL de um tampão de estimulação contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,01% BSA, 1 mM ATP, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5 mM pirofosfato de sódio, 1 mM ortovanadato de sódio, e 50 mM fluoreto de sódio, sem e com insulina [10⁻⁷M], por 8 min, a 37°C [25].

4.6. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA

Para extração protéica, as células foram homogeneizadas com 0,5 mL de tampão de lise – RIPA – *modified radioimmunoprecipitation buffer* (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, Triton X100 1%, 0,25% deoxicolato de sódio, 100 mM EDTA) e agitadas por duas horas à 4°C.

Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10000 x g, por 10 minutos, à 4°C e o sobrenadante foi coletado.

Cerca de 10 µL de amostra foram utilizados para dosagem de proteínas com o Método Colorimétrico de Bradford [55]. A quantidade de proteína das amostras foi analisada por leitura de espectrometria com comprimento de onda de 595 nm. Todas as amostras foram testadas em duplicata, com 5 µL de amostra diluída em 95 µL de água e 1000 µL de solução de Bradford, e comparadas com curva padrão de albumina. Para a realização dos Western blots foram carregadas 60 µg de proteína por poço.

4.7. WESTERN BLOTS

Com base nos trabalhos de Beisiegel, 1986, e Gershoni e Palade, 1983, [56, 57] foi realizada a técnica de Western Blot com algumas modificações para verificação da expressão protéica das proteínas Akt/PKB fosforilada em Ser473, Akt/PKB basal.

As proteínas foram inicialmente separadas em um SDS-PAGE 10% e a seguir

transferidas para uma membrana de nitrocelulose.

Aproximadamente 60 µg de proteína total das preparações de membrana de cada amostra foram desnaturados em solução de Laemmli (glicerol 30%, SDS 10%, DTT 750 mg e 0,001 % azul de bromofenol) a 95°C por 5 minutos, e colocadas em cada poço do gel. A eletroforese foi efetuada na presença de tampão contendo glicina 192 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1%, pH 8,3. Depois de efetuada a eletroforese, foi realizada a etapa de transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose (NC) por sistema semi-seco para as membranas. A transferência foi efetuada por 1 hora, com voltagem de 25 v.

As membranas de nitrocelulose foram então incubadas durante 1 hora em solução bloqueadora, contendo NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Tris 50 mM, Tween 0,05%, leite em pó desnatado 5%, pH 7,4, para o bloqueio de sítios de ligação inespecíficos. Em seguida, colocadas sob agitação em primeiro anticorpo em câmara fria (4°C) *overnight*. Os anticorpos primários utilizados são descritos na tabela 3. 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 incubadas com o segundo anticorpo (anti- Rabbit Santa Cruz[®] – SC-2357) por duas horas em temperatura ambiente e novamente, lavadas 3 vezes de 10 min (30 min). Em seguida, em câmara escura, as NC foram expostas por aproximadamente 1 min a substância quimiluminescente (ECL).

4.8. AUTORADIOGRAFIAS

Após a incubação com solução para quimiluminescência, as membranas de nitrocelulose foram colocadas em contato com o filme autoradiográfico (GE Healthcare[®]) por aproximadamente 15 a 120 segundos. Após a revelação, o filme foi analisado por densitometria no equipamento Image Master VDS (Amersham Pharmacia Biosciences[®]) para identificar as bandas e quantificar a densidade permitindo a comparação e a análise dos resultados da expressão protéica, os quais são apresentados em unidades arbitrárias.

Tabela 3. Anticorpos.

Anticorpo	Mono/policlonal	Firma	Catálogo n°
Akt/PKB	Policlonal	Santa Cruz [®]	8312
Ser473 Akt/PKB	Policlonal	Santa Cruz [®]	7985

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do *software* SPSS versão 15.0. Foi utilizado o teste t de *Student* para amostras pareadas e independentes nas variáveis numéricas paramétricas, sendo considerados como significativos $P < 0,05$.

4.10. CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

O tamanho da amostra para a análise da expressão protéica foi calculado através do programa estatístico PEPI versão 404x para teste t pareado, utilizando-se dados de estudo prévios realizado por Scioscia em 2006 [25]. O cálculo foi de pelo menos 8 mulheres por grupo, levando em consideração uma diferença de 0,3 unidades arbitrárias na variável pAkt entre as médias dos grupos controle e PE, e um desvio padrão de 0,25, para um nível de significância bicaudal de 0,05, e poder estatístico de 90%.

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES

Os resultados das características das pacientes estão apresentados na tabela 4 (média \pm desvio padrão).

Tabela 4. Perfil das pacientes

	Normais	PE	P
Idade (anos)	26,8 \pm 4,1	27,8 \pm 8,2	0,714
IMC (kg/m ²)	28,4 \pm 3,5	31,3 \pm 4,1	0,080
Idade gestacional (semanas)	39,1 \pm 0,4	35,6 \pm 0,5	< 0,001*
Número de gestações	2,5 \pm 2,1	1,8 \pm 1,1	0,303
Glicemia de jejum (mg/dL)	76,0 \pm 2,3	91,5 \pm 2,8	< 0,001*

*teste t de Student.

A média de idade, IMC e número de gestações não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos, sendo a idade com $P = 0,71$, o IMC $P = 0,08$ e o

número de gestações com o $P= 0,303$. A idade gestacional foi significativamente menor no grupo PE ($35,67 \pm 0,55$ semanas) quando comparado com as gestantes sem PE ($39,17 \pm 0,42$ semanas) $P < 0,001$. A glicemia em jejum foi significativamente maior no grupo PE ($91,58 \pm 2,83$) quando comparado com as gestantes sem PE ($76,00 \pm 2,39$) $P < 0,001$.

As pressões diastólica e sistólica foram significativamente mais elevadas nas pacientes com PE, sendo de $118,5 \pm 10,2$ mmHg em gestantes normais e $154,8 \pm 10,4$ mmHg em PE para pressão sistólica com $P < 0,001$ e $70,6 \pm 6,4$ mmHg em normais e $97,5 \pm 5,9$ mmHg em PE para pressão diastólica com $P < 0,001$ (Gráfico 1).

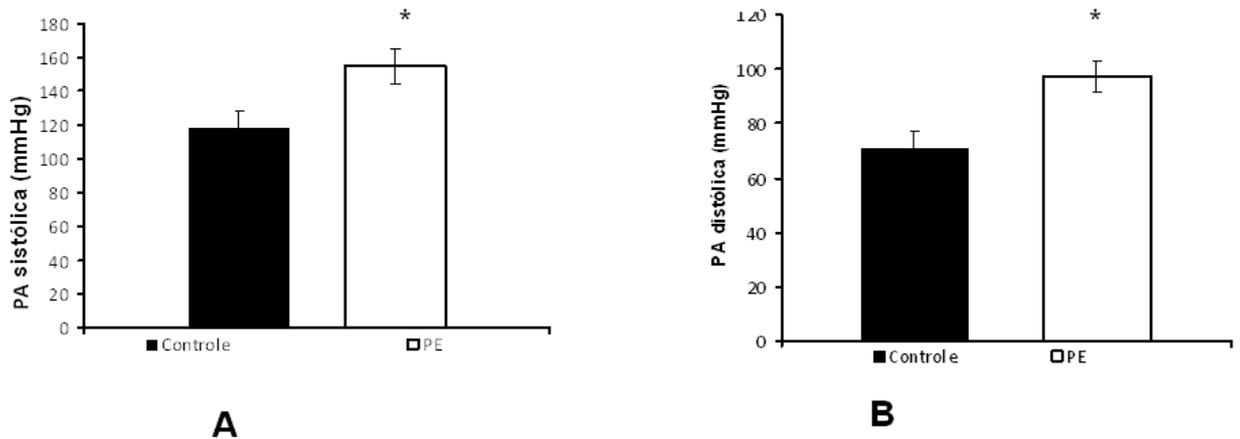


Gráfico 1. Pressão arterial sistólica e diastólica das pacientes.

Em A comparação entre as médias da PAS (Pressão Arterial Sistólica) $P < 0,001$. Em B comparação entre as médias da PAD (Pressão Arterial Diastólica) $P < 0,001$.

Como critério diagnóstico, as 12 pacientes com PE apresentaram proteinúria acima de 300 mg/dL, associado com a hipertensão arterial. As gestantes normais não apresentavam nenhuma patologia associada.

O teste de tolerância à glicose (TTG) é um exame laboratorial que tem como objetivo a identificação de resistência à insulina. Este é realizado com a ingestão de dextrosol (glicose anidra), seguido de coletas de sangue e/ou de urina para avaliar a ação da insulina na metabolização da glicose. As 12 pacientes com PE realizaram o

TTG e obtiveram valores normais segundo OMS (2h pós-dextrosol < 140 mg/dL), com uma média de $89,42 \pm 7,6$ mg/dL.

5.2. ESTIMULAÇÕES DAS AMOSTRAS

Após coletadas, as amostras foram estimuladas com insulina conforme protocolo descrito na metodologia. Foi avaliada a expressão da Akt/PKB, fosforilada em Ser473, comparando entre as amostras estimuladas (+) e não estimuladas (-) de cada parturiente (Figura 5). Como proteína normalizadora foi utilizada a Akt/PKB total.

Analisando as 12 pacientes controles e as 12 pacientes PE em grupos separados, no grupo controle a expressão da Akt/PKB fosforilada foi de $1,26 \pm 0,16$ para amostras estimuladas com insulina (+) e de $0,93 \pm 0,12$, para amostras não estimuladas (-), com uma diferença significativa de $P < 0,001$. Enquanto no grupo PE apresenta-se expressão de $1,01 \pm 0,10$ para o grupo estimulado (+) e $0,89 \pm 0,10$ para o grupo não estimulado (-), com uma diferença estatisticamente significativa de $P = 0,001$, confirmando que as amostras foram estimuladas (Gráfico 2).

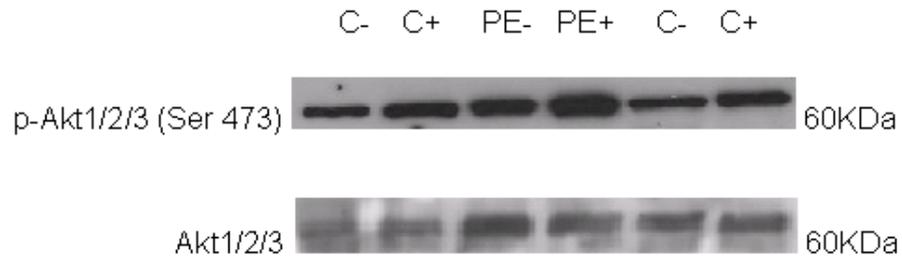


Figura 5. Western blot representativo com anticorpo Akt/PKB fosforilado.

Western blot representativo com anticorpo Akt/PKB fosforilado (p-Akt1/2/3) e anticorpo Akt/PKB total (Akt1/2/3) para amostras de placenta de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) e controles normais (C). (+) amostra estimulada com insulina, (-) amostra não estimulada.

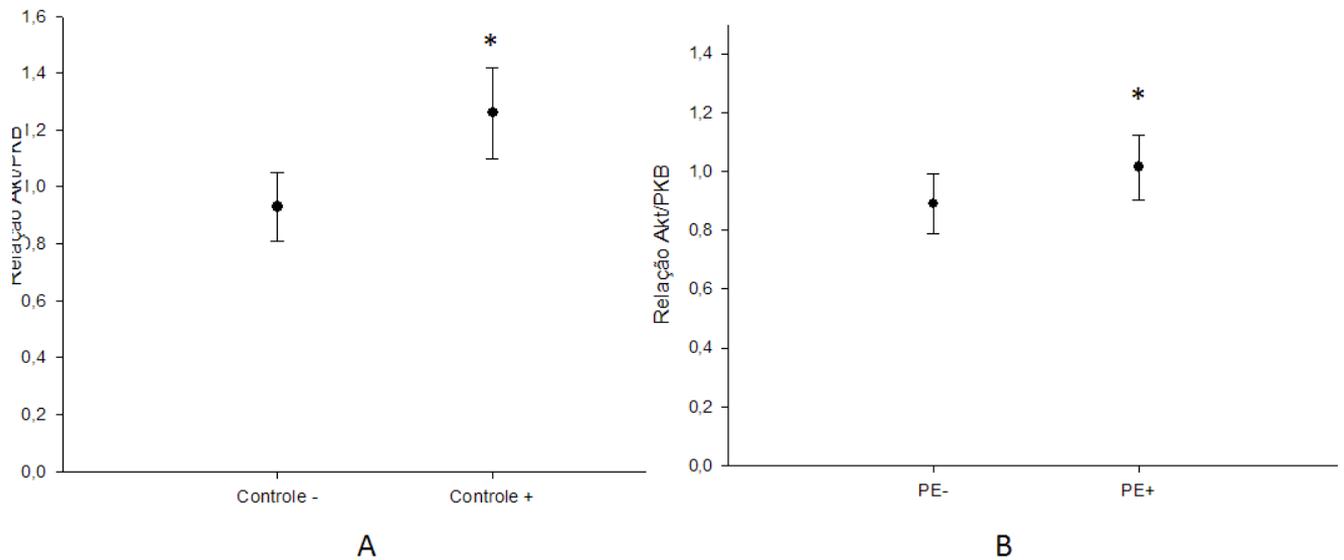


Gráfico 2. Análise da expressão da Akt/PKB fosforilada nos grupos controle e PE, estimulado e não estimulado com insulina.

No controle (A), $0,93 \pm 0,12$ para amostras não estimuladas (-) e $1,26 \pm 0,16$ para amostras estimuladas (+) ($n = 12$) $P < 0,001$. Na PE (B), $0,89 \pm 0,10$ para o grupo não estimulado (PE-) e $1,01 \pm 0,10$ para o grupo estimulado (PE+) ($n = 12$) $P = 0,001$, confirmando a estimulação das amostras.

5.3. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Akt/PKB EM PLACENTAS

Os resultados para expressão da proteína Akt/PKB fosforilada em serina 473 foram normalizados pela proteína Akt/PKB total (Figura 5).

Para comparação da expressão da via da Akt/PKB entre os grupos controle e PE a análise das amostras foram realizadas em dois estados: no basal (sem estimulação com insulina) e no estado estimulado.

No estado basal, a expressão foi de $0,93 \pm 0,13$ no grupo controle ($n = 12$) e $0,89 \pm 0,11$ no grupo PE ($n = 12$), com $P = 0,82$.

Comparando nas amostras estimuladas com insulina, a expressão do grupo controle foi de $1,26 \pm 0,16$ ($n = 12$) e no grupo PE de $1,01 \pm 0,11$ ($n=12$), com $P = 0,23$.

Tanto no estado basal, como no estimulado não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e PE (Gráfico 3) .

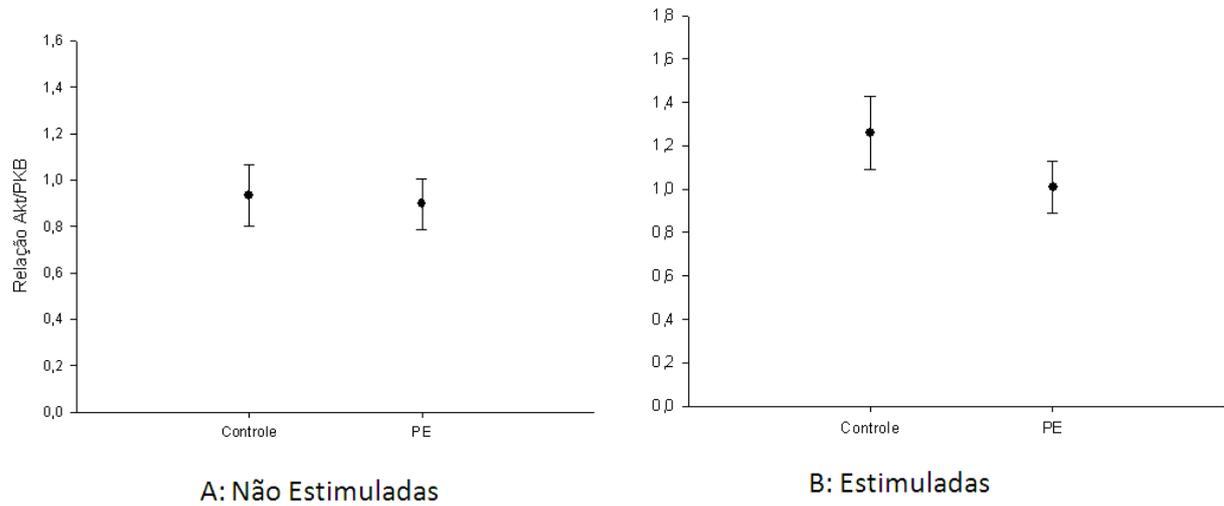


Gráfico 3. Comparação da expressão da fosforilação entre os grupos controle e pré-eclâmpsia estimulados e não estimulados com insulina.

Comparação da expressão da fosforilação entre os grupos controle e pré-eclâmpsia não estimulados (A) $P = 0,828$, e controle e pré-eclâmpsia estimulados (B) $P = 0,237$, não obtendo diferença significativa estatisticamente.

6. DISCUSSÃO

A pré-eclâmpsia é uma das principais morbidades na gestação, sendo uma doença multi-sistêmica, de causa desconhecida [7, 35]. A resistência à insulina é definida como um fator de risco para o desenvolvimento dessa doença [24-26].

Nesse estudo, tanto idade quanto IMC não diferiram significativamente entre os grupos controle e PE. A idade ainda é discutida como fator de risco para PE, pois extremos da idade (mais que 40 anos ou menos de 20) aumentam o risco da doença. Fatores como a primeira gestação influencia aumentando os casos em mulheres jovens [30]. Quanto ao IMC, nas pacientes controles, 6 apresentaram sobrepeso ($IMC \geq 25$ até $29,9 \text{ kg/m}^2$) e 4 obesidade ($IMC \geq 30,0 \text{ kg/m}^2$), enquanto na PE, 5 apresentaram sobrepeso e 6 obesidade. A obesidade é um fator de risco importante para PE, visto que o aumento de IMC a cada 5 a 7 kg/m^2 duplica o risco da doença [23].

Um estudo de Soonthornpun e colaboradores, 2009, investigou a existência de resistência à insulina pós-parto em mulheres com história de pré-eclâmpsia severa, e verificou que mesmo não havendo diferença significativa no IMC da mulher com histórico de pré-eclâmpsia com o da controle, os níveis séricos de triglicerídeos estavam elevados e níveis de HDL diminuídos significativamente no grupo PE grave

[16]. No presente trabalho não avaliamos o perfil lipídico das pacientes, pois não fazia parte dos nossos objetivos.

Villa e colaboradores, 2009, verificaram o perfil dos ácidos graxos livres em mulheres com PE e controles, e constatou que mesmo sem diferença de IMC, o grupo PE apresentou uma quantidade elevada de ácido oléico, linoléico e araquidônico, potencializando a resistência à insulina [24].

Quanto ao número de gestações, também não houve diferença significativa entre os grupos, sendo que nas pacientes com PE, 7 estavam na primeira gestação, enquanto no grupo controle foram 5. Pacientes primigestas têm risco aumentado desta doença, e um abortamento ou uma gestação normal prévia diminui o risco para a próxima gestação [28].

A média da idade gestacional é menor significativamente em aproximadamente 4 semanas nas pacientes com PE comparadas com o grupo controle. O trabalho de Orcy e colaboradores, 2008, comparando 17 pacientes controles e 17 pacientes com PE, demonstrou que o grupo PE tem em média três semanas a menos de idade gestacional comparando com pacientes normais [4]. Em outro estudo, Yung e colaboradores analisaram mulheres em gestações normais, gestações com complicações de restrição do crescimento intra-uterino e gestações com restrição do crescimento intra-uterino associado com pré-eclâmpsia. Foi demonstrada uma importante diferença na média de idade gestacional entre os grupos, sendo que as gestações normais apresentaram uma média de 39 semanas, enquanto o grupo com restrição do crescimento intra-uterino e PE obteve uma média

de 31 semanas de gestação [8]. Essa média de tempo gestacional menor em pacientes com PE comparada com normais resulta em consequências como prematuridade e aumento das taxas de morte perinatal [7].

Apesar dos valores de glicemia em jejum nos dois grupos não ultrapassarem o valor de referência normal, as pacientes com PE apresentaram índices maiores significativamente em relação ao grupo controle, ficando sua média muito próxima dos valores para intolerância a glicose. Isto se pode relacionar com a associação da PE à hiperinsulinemia em jejum [58].

A pressão arterial sistêmica é um importante critério diagnóstico, sendo a hipertensão arterial (PAS > 140 mmHg e PAD > 90 mmHg) relacionada com a PE [7, 17, 38]. As pressões sistólica e diastólica estão significativamente elevadas na PE, onde as 12 pacientes deste grupo apresentaram valores hipertensos, sendo este, concordando com a literatura, que sugere a PAD como um forte fator para o diagnóstico de PE [59].

No estudo de Orcy e colaboradores, 2008, o grupo PE teve uma média de pressão arterial de 150/100 mmHg, enquanto o grupo controle uma média de 120/70 mmHg. Villa e colaboradores, 2009, quando comparado um grupo de pacientes com PE e um grupo controle normal, a média demonstrada da pressão arterial foi respectivamente 140/90 mmHg e 110/70 mmHg [4, 24].

A PE é uma das mais importantes doenças da gestação, porém seus mecanismos moleculares não são completamente conhecidos [60]. Nesse estudo,

foi analisada a expressão da via da Akt/PKB no estado basal e com ação da insulina.

As funções da Akt/PKB na resistência à insulina ficaram evidentes quando se demonstrou que sua ativação é promovida pela sinalização da PI3K, a qual é ativada pela autofosforilação de receptores tirosina quinase, como o receptor de insulina e outros receptores de fatores de crescimento [42-45]. Uma vez ativada, a PI3K irá gerar a fosforilação do segundo mensageiro PIP2 formando o PIP3 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) [46]. A PDK1 é a responsável pela fosforilação do domínio Thr308, após ser recrutada do citoplasma para membrana plasmática por PIP3 [50]. Para a fosforilação do sítio Ser473, recentemente, descreveu-se a ação do complexo mTOR [51]. A fosforilação de Ser473 é um passo decisivo para a ativação da Akt/PKB, pois estabiliza o seu estado ativo [52]. Uma vez ativada na membrana, a Akt/PKB pode se deslocar para o citoplasma ou para o núcleo [53]. 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, e em placentas foi realizada uma análise desta via, com estimulação com insulina *in vitro*.

Após padronização do protocolo, a estimulação foi confirmada quando comparadas a expressão da Akt/PKB fosforilada em Ser473, utilizando como normalizador a Akt/PKB total, entre as células das placentas que foram estimuladas pela insulina com as que não sofreram estimulação. A estimulação desta via é um

importante fator para averiguar mecanismos moleculares da síndrome de resistência à insulina nas pacientes com PE [25].

A placenta é o principal tecido envolvido nas disfunções desta doença, a má formação e má implantação das artérias espirais na PE parece ser a alteração melhor aceita em sua fisiopatologia [8, 11, 35, 61]. Já foi demonstrada em animais a importância da Akt/PKB para vascularização e desenvolvimento placentário [62]. A via da Akt/PKB tem atuação na fisiologia da angiogênese, e se relaciona com a via de sinalização da insulina, pois a eNOS (*endothelial nitric oxide syntase*) é uma enzima que promove liberação de Óxido Nítrico (NO) e é ativada pela Akt/PKB ativa [26, 38, 63]. O NO produz vasodilatação e estimula a angiogênese [64].

O trabalho de Scioscia e colaboradores, em 2006, demonstrou uma diminuição do sinal da insulina, em preparação de placentas estimuladas em mulheres com PE comparando com normais, constatando um menor grau de fosforilação em tirosina do IRS1 (Substrato 1 do Receptor de Insulina) nas mulheres com PE [25].

Orcy e colaboradores, em 2008, analisaram a via da Akt/PKB no estado basal em placenta, músculo esquelético e tecido adiposo em pacientes com PE e pacientes controles, porém seus achados não demonstraram diferença significativa desta proteína entre os grupos de pacientes [4]. Nossos resultados também não mostraram diferenças significativas entre a expressão basal na proteína da Akt/PKB em placenta de pacientes com PE e controles.

Nesse trabalho, mesmo com a estimulação da insulina nas amostras de placenta não houve diferença significativa na expressão da Akt/PKB quando comparado PE e controle. Outros níveis de ativação desta via, como substratos da Akt/PKB envolvidos na sobrevivência celular (BAD e Caspase-9), que promovem angiogênese e vasodilatação (eNOS), que estão envolvidos com metabolismo e crescimento celular (GSK3) e que estão envolvidos na captação de glicose (AS160), precisam ser avaliados após estimulação.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo, foi desenvolvido um protocolo de estimulação pela insulina em amostras de placenta, a qual foi confirmada quando comparada a fosforilação de amostras estimuladas com a insulina com amostras não estimuladas. A expressão da Akt/PKB, tanto comparando controles e PE não estimulados (estado basal), quanto no grupo controle e PE estimulados com insulina, em amostras de placenta, foram semelhantes, sugerindo uma igualdade na atividade dessa via.

Nosso resultado sugere que não há diferença na expressão da Akt/PKB entre placentas de pacientes com PE e controles normais, porém não podemos descartar efeitos desta via de sinalização com a fisiopatologia da PE, sendo necessários estudos dos substratos da Akt/PKB após estímulo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grill, S., et al., *Potential markers of preeclampsia--a review*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009. **7**: p. 70.
2. Scioscia, M., K. Gumaa, and T.W. Rademacher, *The link between insulin resistance and preeclampsia: new perspectives*. *J Reprod Immunol*, 2009. **82**(2): p. 100-5.
3. Kossenjans, W., et al., *Role of peroxynitrite in altered fetal-placental vascular reactivity in diabetes or preeclampsia*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **278**(4): p. H1311-9.
4. Orcy, R.B., et al., *Signalization of Akt/PKB in the placenta, skeletal muscle and adipose tissue of preeclampsia patients*. *Gynecol Obstet Invest*, 2008. **66**(4): p. 231-6.
5. Roberts, J.M., *Preeclampsia: is there value in assessing before clinically evident disease?* *Obstet Gynecol*, 2001. **98**(4): p. 596-9.
6. Milne, F., et al., *The pre-eclampsia community guideline (PRECOG): how to screen for and detect onset of pre-eclampsia in the community*. *Bmj*, 2005. **330**(7491): p. 576-80.
7. Sibai, B., G. Dekker, and M. Kupferminc, *Pre-eclampsia*. *Lancet*, 2005. **365**(9461): p. 785-99.
8. Yung, H.W., et al., *Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction*. *Am J Pathol*, 2008. **173**(2): p. 451-62.
9. Walker, J.J., *Severe pre-eclampsia and eclampsia*. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2000. **14**(1): p. 57-71.
10. Deborde, S., J.N. Schofield, and T.W. Rademacher, *Placental GPI-PLD is of maternal origin and its GPI substrate is absent from placentae of pregnancies associated with pre-eclampsia*. *J Reprod Immunol*, 2003. **59**(2): p. 277-94.
11. Mohaupt, M., *Molecular aspects of preeclampsia*. *Mol Aspects Med*, 2007. **28**(2): p. 169-91.
12. Seely, E.W. and C.G. Solomon, *Insulin resistance and its potential role in pregnancy-induced hypertension*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(6): p. 2393-8.

13. Gonsales Valerio, E., et al., *Variation in the urinary protein/creatinine ratio at four different periods of the day in hypertensive pregnant women*. *Hypertens Pregnancy*, 2005. **24**(3): p. 213-21.
14. Saito, S., et al., *Inadequate tolerance induction may induce pre-eclampsia*. *J Reprod Immunol*, 2007. **76**(1-2): p. 30-9.
15. Sargent, I.L., A.M. Borzychowski, and C.W. Redman, *Immunoregulation in normal pregnancy and pre-eclampsia: an overview*. *Reprod Biomed Online*, 2006. **13**(5): p. 680-6.
16. Soonthornpun, K., et al., *Insulin resistance in women with a history of severe pre-eclampsia*. *J Obstet Gynaecol Res*, 2009. **35**(1): p. 55-9.
17. Craici, I., S. Wagner, and V.D. Garovic, *Preeclampsia and future cardiovascular risk: formal risk factor or failed stress test?* *Ther Adv Cardiovasc Dis*, 2008. **2**(4): p. 249-59.
18. Wen, S.W., et al., *Folic acid supplementation in early second trimester and the risk of preeclampsia*. *Am J Obstet Gynecol*, 2008. **198**(1): p. 45 e1-7.
19. Bucher, H.C., et al., *Effect of calcium supplementation on pregnancy-induced hypertension and preeclampsia: a meta-analysis of randomized controlled trials*. *Jama*, 1996. **275**(14): p. 1113-7.
20. Coomarasamy, A., et al., *Individualising use of aspirin to prevent pre-eclampsia: a framework for clinical decision making*. *Bjog*, 2003. **110**(10): p. 882-8.
21. Duley, L., et al., *Antiplatelet agents for preventing pre-eclampsia and its complications*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007(2): p. CD004659.
22. Rumiris, D., et al., *Lower rate of preeclampsia after antioxidant supplementation in pregnant women with low antioxidant status*. *Hypertens Pregnancy*, 2006. **25**(3): p. 241-53.
23. O'Brien, T.E., J.G. Ray, and W.S. Chan, *Maternal body mass index and the risk of preeclampsia: a systematic overview*. *Epidemiology*, 2003. **14**(3): p. 368-74.
24. Villa, P.M., et al., *Free fatty acid profiles in preeclampsia*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2009. **81**(1): p. 17-21.
25. Scioscia, M., 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. **91**(2): p. 709-17.
26. Scioscia, M., et al., *Is there a link between insulin resistance and inflammatory activation in preeclampsia?* *Med Hypotheses*, 2009. **73**(5): p. 813-7.

27. Wolf, M., et al., *First trimester insulin resistance and subsequent preeclampsia: a prospective study*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(4): p. 1563-8.
28. Trupin, L.S., L.P. Simon, and B. Eskenazi, *Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas*. Epidemiology, 1996. **7**(3): p. 240-4.
29. Esplin, M.S., et al., *Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia*. N Engl J Med, 2001. **344**(12): p. 867-72.
30. Lie, R.T., et al., *Fetal and maternal contributions to risk of pre-eclampsia: population based study*. Bmj, 1998. **316**(7141): p. 1343-7.
31. *Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy*. Am J Obstet Gynecol, 2000. **183**(1): p. S1-S22.
32. Caritis, S., et al., *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, 1998. **179**(4): p. 946-51.
33. Wang, H., et al., *Stage-specific integration of maternal and embryonic peroxisome proliferator-activated receptor delta signaling is critical to pregnancy success*. J Biol Chem, 2007. **282**(52): p. 37770-82.
34. Husslein, H., et al., *Expression, regulation and functional characterization of matrix metalloproteinase-3 of human trophoblast*. Placenta, 2009. **30**(3): p. 284-91.
35. Carty, D.M., C. Delles, and A.F. Dominiczak, *Novel biomarkers for predicting preeclampsia*. Trends Cardiovasc Med, 2008. **18**(5): p. 186-94.
36. Pessin, J.E. and A.R. Saltiel, *Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(2): p. 165-9.
37. Laivuori, H., M.J. Tikkanen, and O. Ylikorkala, *Hyperinsulinemia 17 years after preeclamptic first pregnancy*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(8): p. 2908-11.
38. Cindrova-Davies, T., *Gabor Than Award Lecture 2008: pre-eclampsia - from placental oxidative stress to maternal endothelial dysfunction*. Placenta, 2009. **30 Suppl A**: p. S55-65.
39. Hubbard, S.R. and J.H. Till, *Protein tyrosine kinase structure and function*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 373-98.
40. Scotlandi, K. and P. Picci, *Targeting insulin-like growth factor 1 receptor in sarcomas*. Curr Opin Oncol, 2008. **20**(4): p. 419-27.

41. Taniguchi, C.M., B. Emanuelli, and C.R. Kahn, *Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 85-96.
42. Haruta, T., et al., *Ligand-independent GLUT4 translocation induced by guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) involves tyrosine phosphorylation*. Endocrinology, 1998. **139**(1): p. 358-64.
43. Carpenter, C.L., et al., *Purification and characterization of phosphoinositide 3-kinase from rat liver*. J Biol Chem, 1990. **265**(32): p. 19704-11.
44. Auger, K.R., et al., *PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells*. Cell, 1989. **57**(1): p. 167-75.
45. Lee, W.J., *Insulin-like growth factor-I-induced androgen receptor activation is mediated by the PI3K/Akt pathway in C2C12 skeletal muscle cells*. Mol Cells, 2009.
46. Engelman, J.A., J. Luo, and L.C. Cantley, *The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(8): p. 606-19.
47. Fayard, E., et al., *Protein kinase B/Akt at a glance*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 24): p. 5675-8.
48. Brazil, D.P. and B.A. Hemmings, *Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(11): p. 657-64.
49. Brazil, D.P., J. Park, and B.A. Hemmings, *PKB binding proteins. Getting in on the Akt*. Cell, 2002. **111**(3): p. 293-303.
50. Alessi, D.R., et al., *Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α* . Curr Biol, 1997. **7**(4): p. 261-9.
51. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.
52. Yang, J., et al., *Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(12): p. 940-4.
53. Andjelkovic, M., et al., *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, 1999. **19**(7): p. 5061-72.

54. Klein, H.H., et al., *Insulin activation of insulin receptor tyrosine kinase in intact rat adipocytes. An in vitro system to measure histone kinase activity of insulin receptors activated in vivo.* J Biol Chem, 1986. **261**(10): p. 4691-7.
55. Bradford, H.F. and C.D. Richards, *Specific release of endogenous glutamate from piriform cortex stimulated in vitro.* Brain Res, 1976. **105**(1): p. 168-72.
56. Beisiegel, U. and W. Weber, *[New knowledge of the pathogenesis of familial hypercholesterolemia].* Verh Dtsch Ges Inn Med, 1986. **92**: p. 383-9.
57. Gershoni, J.M. and G.E. Palade, *Protein blotting: principles and applications.* Anal Biochem, 1983. **131**(1): p. 1-15.
58. Fuh, M.M., et al., *Resistance to insulin-mediated glucose uptake and hyperinsulinemia in women who had preeclampsia during pregnancy.* Am J Hypertens, 1995. **8**(7): p. 768-71.
59. Knuist, M., et al., *Risk factors for preeclampsia in nulliparous women in distinct ethnic groups: a prospective cohort study.* Obstet Gynecol, 1998. **92**(2): p. 174-8.
60. Kaaja, R., et al., *Evidence of a state of increased insulin resistance in preeclampsia.* Metabolism, 1999. **48**(7): p. 892-6.
61. Zhou, Y., C.H. Damsky, and S.J. Fisher, *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, 1997. **99**(9): p. 2152-64.
62. Yang, Z.Z., et al., *Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth.* J Biol Chem, 2003. **278**(34): p. 32124-31.
63. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.* Nature, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
64. Morbidelli, L., S. Donnini, and M. Ziche, *Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis.* Curr Pharm Des, 2003. **9**(7): p. 521-30.

9. ANEXO I

FICHA DE COLETA DE DADOS

Iniciais: _____

Prontuário: _____

Idade: _____

Data: _____

- Pré-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 à glicose _____

Peso _____ Peso do bebê _____

Altura _____

IMC _____

PA _____

Proteinúria _____

10. ANEXO II - CONSENTIMENTO INFORMADO

AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAR DE UM PROJETO DE PESQUISA

NOME DO ESTUDO: ATIVIDADE DA VIA DE SINALIZAÇÃO DA AKT/PKB EM PLACENTA DE PACIENTES COM PRÉ-ECLÂMPسيا

Número do protocolo: 08-124 Instituição: UFRGS

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gustavo Ferreira / Edison Capp

TELEFONE para contato:

NOME DO PACIENTE: _____

Estamos convidando você para participar de um projeto de pesquisa chamado "ATIVIDADE DA VIA DE SINALIZAÇÃO DA Akt/PKB EM PLACENTA DE PACIENTES COM PRÉ-ECLÂMPسيا".

Necessitamos de sua autorização para utilizar um pequeno pedaço, 30g, de placenta que é normalmente jogada fora. A coleta desse material será realizada após o parto, não causando nenhum desconforto adicional a você.

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 participar deste estudo não causará prejuízo a sua assistência médica.

Os riscos de aumento da dor ou hematoma no pós-parto, à custa desse procedimento, não existem, visto que 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

Assinatura do Pesquisador

11. ANEXO III – ARTIGO EM INGLÊS

Insulin stimulation of Akt/PKB phosphorylation in the placenta of preeclampsia patients

Gustavo Dias Ferreira¹, Rafael Bueno Orcy¹, Sérgio Hofmeister Martins-Costa^{2,3}, José Geraldo Lopes Ramos^{2,3}, Ilma Simoni Brum¹, Helena von Eye Corleta^{1,2,3}, Edison Capp^{1,2,3}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Laboratório de Biologia Molecular, Endócrina e Tumoral, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 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, Brasil

Correspondence to:

Prof. Dr. Edison Capp

Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular

Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90 035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

Tel. +55 51 3308 3671, Fax +55 51 3311 5699

e-mail:edcapp@ufrgs.br

Abstract

Preeclampsia (PE) is an 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 pathway is stimulated by insulin and performs several vital functions as growth, survival and cellular metabolism.

Objective: to investigate stimulated expression of Akt/PKB pathway in the placenta, of normal and preeclampsia parturients. **Method:** samples were collected from 12 normal patients and 12 PE patients, stimulated and analyzed by Western blot to quantify the phosphorylated protein expression in Akt/PKB signaling. **Results:** insulin stimulation was confirmed when stimulated (1.14 ± 0.10) and non-stimulated (0.91 ± 0.08) groups were compared, $P < 0.001$. The phosphorylated Akt/PKB (Ser473) was not different in placenta of the normal (1.26 ± 0.16) and PE (1.01 ± 0.11) groups, $P = 0.237$. **Conclusions:** there was no difference of phosphorylation in Akt/PKB pathway, after stimulation with insulin, in placentas of normal and PE patients. However, we cannot discard effects of this signaling pathway in the pathophysiology of PE, because the phosphorylation of substrates involved remains to be analyzed.

Key Words: preeclampsia, placenta, insulin signal transduction, Akt/PKB

Introduction

Preeclampsia (PE) is a multi-systemic disease and is considered one of the most significant health problems of pregnant women. It occurs mainly in nulliparous women, particularly after the 20th week of gestation, and more frequently near birth [1]. It is diagnosed when the patient presents gestational hypertension and new onset proteinuria, with vasoconstriction of the maternal vascular bed and, consequently, an increase of vascular resistance [2-4]. The incidence of this disease is 2% to 5% of pregnancies, but this complication exceeds 10% of pregnancies in developing countries, where prenatal care is still inadequate [1]. This complication can affect both mother's and fetus' health [5], causing fetal growth restriction, prematurity, and in severe cases, maternal and perinatal death [6-8]. Studies have shown that insulin resistance is associated with preeclampsia and contributes to its pathophysiology [9].

Defects in the phosphorylation of insulin receptor and substrates, and no activation of PI3-kinase-Akt may have an important role in developing insulin resistance [10, 11]. If not activated, the Akt/PKB pathway will not phosphorylate its substrates. The main substrates of this pathway participate in various cellular functions, such as control of metabolism, survival, glucose uptake, proliferation, growth, and angiogenesis [12].

In this study, we investigated the expression of the protein Akt/PKB in the basal state and after stimulation with insulin, in the placenta of normal and preeclampsia parturient.

Methods

An experimental assay, case-control, was performed, where 24 women participated, including 12 patients who presented preeclampsia (PE) and 12 normotensive pregnant women (control group). The samples were divided in four groups: stimulated control, non-stimulated control, stimulated PE and non-stimulated PE. Information such as age, use of hormonal medication, familiar history of diabetes mellitus, gynecological and obstetric history, fasting glucose, blood pressure, proteinuria, glucose tolerance test and gestational age were collected before birth. This study was submitted to and approved by the Research Ethics Committee of the Research and Post-Graduation Group of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG 08-124).

Sample

Approximately 30 g of placenta were obtained immediately after birth. The samples were washed with PBS - Phosphate Buffer Saline (4 ° C) to remove excess blood and taken to the Laboratory for preparation and stimulation with insulin.

The preparation of the placenta was performed according to Klein [13] with modifications. The tissue was weighed in the laboratory, separated from blood vessels and cut in slices. 1g of tissue was incubated in 5 ml BSA (bovine serum albumin) buffer – 32mM HEPES, 195mM NaCl, 7.2mM KCl, 1.8mM KH₂PO₄, 8.3mM glucose and albumin 1% in distilled H₂O. Briefly, placental tissue was digested with collagenase type I (Gibco, Invitrogen Corporation) and incubated at 37°C in orbital

agitation (100 rpm) for 45min. After this, it was separated by 250 μm filter to remove large particles and fibrin remaining. For separation of cells, the sample was divided into two 50mL tubes and centrifuged at 2000xg for 10 minutes at 30°C. After you discard the supernatant, a small portion of the sample was visualized with microscope to observe the viability of cells to stimulation. The cells were then homogenized with 0.5mL of PBS. These samples were transferred to two 1.5mL tubes, which were incubated with 0.5mL of a stimulation buffer containing 50mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.01% BSA, 1mM ATP, 2mM MgCl_2 , 1mM EDTA, 5mM sodium pyrophosphate, 1mM sodium orthovanadate, and 50mM sodium fluoride, with and without insulin [10^{-7}M] for 8min at 37°C [9]. For analysis, placental pieces were pooled and homogenated. Protein concentration was measured with Bradford's Method [14].

Samples were analyzed by Western blot [15, 16]. 60 μg of protein (per lane) was loaded in the acrylamide gels of 10% concentration. Proteins were transferred to membranes of nitrocellulose with a semidry system. We used rabbit polyclonal antibodies of Santa Cruz (California, U.S.A): total anti-AKT (sc-8312) and phosphor-Akt (Ser473) (sc-7985).

Statistics

Statistical analysis was performed by using SPSS 15.0 statistical software. Data was tested with Student's t test for paired samples and independent samples, in parametric variables (data shown as mean \pm SD) with a significance of $p < 0,05$.

Results

The 12 patients with PE fulfilled the diagnostic criteria and had proteinuria over 300 mg/dL and were hypertensive. In normotensive group we did not find any patient that got proteinuria over 300 mg/dL.

The normotensive and PE groups did not differ significantly in age (26.8 ± 4.1 vs. 27.8 ± 8.2 , $p = 0.714$) and BMI (28.4 ± 3.5 vs. 31.3 ± 4.1 , $p = 0.08$) and number of pregnancies (2.5 ± 2.1 vs. 1.8 ± 1.1 , $p = 0.303$) (table1).

The mean gestational age was approximately four weeks shorter in the PE group (35.6 ± 0.5 vs. 39.1 ± 0.4 , $p < 0.001$), while the fasting glucose (mg/dL) was significantly higher in PE group (91.58 ± 2.83 vs. 76.00 ± 2.39 , $p < 0.001$). Diastolic and systolic blood pressures were significantly higher in PE patients, $p < 0.001$ (table 1).

Stimulation of the samples

Stimulation of the samples was assessed by comparing the expression of phosphor-Akt(Ser473) in samples stimulated with insulin (+) and not stimulated (-) both in the control group (C) as well as in the PE group. Normalized by total anti-AKT protein expression (60kDa) (figure 1).

The control group ($n = 12$), the expression of phosphor-Akt(Ser473) was 1.26 ± 0.16 for samples stimulated with insulin (+) and 0.93 ± 0.12 for samples not stimulated (-), with a significant difference of $p < 0.001$, while in the PE group ($n=12$),

the expression was 1.01 ± 0.01 for samples stimulated and 0.89 ± 0.11 for samples not stimulated, with a significant difference of $p = 0.001$, confirming that the samples were stimulated (figure 2).

Protein Expression in PE group and control group

To compare the expression of Akt/PKB between the PE and control group, the analyses were performed in two states: the basal (not stimulation with insulin) and stimulated state.

At basal state, the expression of phosphor-Akt(Ser473) was 0.93 ± 0.13 in control group ($n = 12$) and 0.89 ± 0.11 in the PE group ($n = 12$), $p = 0.82$ (figure 3A).

When comparing the samples stimulated with insulin, the expression of the control group ($n = 12$) was 1.26 ± 0.16 and in the PE group ($n = 12$) was 1.01 ± 0.11 , $p = 0.23$ (figure 3B). There was no statistically significant difference between the PE group and control group, both at basal state as in stimulated.

Discussion

Preeclampsia is a major disease during a pregnancy, being a multi-system disease of unknown etiology [3, 17]. Insulin resistance and obesity are defined as a risk factor for the development of this disease [9, 18, 19].

In this study, age and BMI did not differ between the control and PE. The age is discussed as a risk factor for PE, as extremes of age (more than 40 years or less than 20) increase the risk of disease, and factor such as the first pregnancy increases the influence cases in young women [20]. BMI in the control patients, 6 were overweight (BMI ≥ 25 kg/m² to 29.9 kg/m²) and 4 obesity (BMI ≥ 30.0 kg/m²), while in PE, 5 were overweight and 6 obesity. Obesity is a major risk factor for PE, because the increase in BMI in 7 kg/m², doubles the risk of disease [21].

Soonthornpun et al. demonstrated that even with no significant difference in BMI of women with a history of PE and control. The serum triglycerides were higher and HDL levels decreased significantly in the Group with severe preeclampsia [22]. Villa et al. investigated the profile of fatty acids in women with PE and controls, and found that even without difference in BMI, the PE group showed a high amount of oleic acid, linoleic acid, and arachidonic acid, increasing insulin resistance [18].

In the number of pregnancies there was no significant difference between the PE and control groups. Their first pregnancy is at increased risk of this disease, and an abortion or a previous normal pregnancy decreases the risk for next pregnancy [23].

The mean gestational age is significantly lower in about 4 weeks in patients with PE compared with the control group. Orcy et al. examined 17 control patients and 17 PE patients. He showed that the PE group has less three weeks gestational age compared with normal patients [6]. Yung et al. showed significant difference in mean gestational age between groups of normal pregnancy, 39 weeks, and a group

with restricted intrauterine growth and with preeclampsia, 31 weeks of gestation [4]. The smaller gestational age results have consequences such as premature birth increased of perinatal death [3].

Systemic blood pressure is an important criterion, because hypertension (SBP > 140 mmHg and DBP > 90 mmHg) is associated with PE [3, 24, 25]. The systolic and diastolic pressures are significantly higher in PE, where 12 patients in this group had values with hypertension. DBP is a strong factor for the diagnosis of PE [26]. Orcy et al. showed that the PE group had a mean of blood pressure of 150/100 mmHg, while the control group 120/70 mmHg. Villa et al. compared the mean of groups of patients with PE and normal control, being respectively 140/90 and 110/70 mmHg [6, 18].

PE is one of the most important diseases of pregnancy, but its molecular mechanisms do not know [27]. In this study, we analyzed the expression the Akt/PKB in the basal state and with stimulation of insulin.

The functions of Akt/PBK in insulin resistance are evident when it is shown that its activation is performed by PI3K signaling, which is activated by autophosphorylation of tyrosine kinase receptors, such as the insulin receptor and other receptors of growth factors [28-31]. When activated, PI3K activates the second messenger then activating the Akt/PKB, in the phosphorylation sites serine 473 and threonine 308 [32]. When activated, the Akt/PKB can move to the cytoplasm or the nucleus, activated substrates with actions on metabolism, growth and cell survival [12]. It is true that the levels of Akt/PKB phosphorylated have demonstrated activity of

this signaling pathway that begins with growth factors, such as insulin, and placentas needed to analysis with insulin stimulation in vitro.

After making the protocol, stimulation was confirmed when compared to expression of phosphor-Akt/PKB(Ser 473) between the cells of the placentas that were stimulated by insulin with those that were not stimulated. Stimulation of this pathway is an important factor to analyze the molecular mechanisms of the syndrome of insulin resistance in patients with PE [9].

Scioscia et al. showed a decrease in tyrosine phosphorylation of IRS1, in insulin-stimulated preparations of human preeclamptic placenta compared with normal placenta, noting a lower level of insulin signal in women with PE [9].

Orcy et al. has the path of Akt/PKB in the basal state in placenta, skeletal muscle and adipose tissue in PE patients with controls, but their findings showed no significant difference of protein between the groups of patients [6]. Our results also showed no significant differences between the basal protein expression of Akt/PKB in placenta of patients with PE and controls.

In this study, even with the stimulation of insulin in samples of placenta were not significant different in the expression of Akt/PKB when compared PE and control. The substrates of this pathway need to be analyzed after stimulation.

Conclusion

The expression of Akt/PKB, comparing PE patients and controls, both at basal state, and stimulated with insulin, in samples of placenta, were similar, suggesting an equal activity of this pathway. We cannot rule out effects of this signaling pathway in the pathophysiology of PE, more studies of substrates of Akt/PKB after stimulation are needed.

This project was supported by the Fundo de Incentivo à Pesquisa of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

References

1. Grill, S., et al., *Potential markers of preeclampsia--a review*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009. **7**: p. 70.
2. Milne, F., et al., *The pre-eclampsia community guideline (PRECOG): how to screen for and detect onset of pre-eclampsia in the community*. *Bmj*, 2005. **330**(7491): p. 576-80.
3. Sibai, B., G. Dekker, and M. Kupferminc, *Pre-eclampsia*. *Lancet*, 2005. **365**(9461): p. 785-99.
4. Yung, H.W., et al., *Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction*. *Am J Pathol*, 2008. **173**(2): p. 451-62.
5. Scioscia, M., K. Gumaa, and T.W. Rademacher, *The link between insulin resistance and preeclampsia: new perspectives*. *J Reprod Immunol*, 2009. **82**(2): p. 100-5.
6. Orcy, R.B., et al., *Signalization of Akt/PKB in the placenta, skeletal muscle and adipose tissue of preeclampsia patients*. *Gynecol Obstet Invest*, 2008. **66**(4): p. 231-6.
7. Roberts, J.M., *Preeclampsia: is there value in assessing before clinically evident disease?* *Obstet Gynecol*, 2001. **98**(4): p. 596-9.

8. Kossenjans, W., et al., *Role of peroxynitrite in altered fetal-placental vascular reactivity in diabetes or preeclampsia*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(4): p. H1311-9.
9. Scioscia, M., 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. **91**(2): p. 709-17.
10. Hubbard, S.R. and J.H. Till, *Protein tyrosine kinase structure and function*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 373-98.
11. Scotlandi, K. and P. Picci, *Targeting insulin-like growth factor 1 receptor in sarcomas*. Curr Opin Oncol, 2008. **20**(4): p. 419-27.
12. Andjelkovic, M., et al., *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, 1999. **19**(7): p. 5061-72.
13. Klein, H.H., et al., *Insulin activation of insulin receptor tyrosine kinase in intact rat adipocytes. An in vitro system to measure histone kinase activity of insulin receptors activated in vivo*. J Biol Chem, 1986. **261**(10): p. 4691-7.
14. Bradford, H.F. and C.D. Richards, *Specific release of endogenous glutamate from piriform cortex stimulated in vitro*. Brain Res, 1976. **105**(1): p. 168-72.
15. Beisiegel, U. and W. Weber, *[New knowledge of the pathogenesis of familial hypercholesterolemia]*. Verh Dtsch Ges Inn Med, 1986. **92**: p. 383-9.
16. Gershoni, J.M. and G.E. Palade, *Protein blotting: principles and applications*. Anal Biochem, 1983. **131**(1): p. 1-15.
17. Carty, D.M., C. Delles, and A.F. Dominiczak, *Novel biomarkers for predicting preeclampsia*. Trends Cardiovasc Med, 2008. **18**(5): p. 186-94.
18. Villa, P.M., et al., *Free fatty acid profiles in preeclampsia*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2009. **81**(1): p. 17-21.
19. Scioscia, M., et al., *Is there a link between insulin resistance and inflammatory activation in preeclampsia?* Med Hypotheses, 2009. **73**(5): p. 813-7.
20. Lie, R.T., et al., *Fetal and maternal contributions to risk of pre-eclampsia: population based study*. Bmj, 1998. **316**(7141): p. 1343-7.
21. O'Brien, T.E., J.G. Ray, and W.S. Chan, *Maternal body mass index and the risk of preeclampsia: a systematic overview*. Epidemiology, 2003. **14**(3): p. 368-74.
22. Soonthornpun, K., et al., *Insulin resistance in women with a history of severe pre-eclampsia*. J Obstet Gynaecol Res, 2009. **35**(1): p. 55-9.

23. Trupin, L.S., L.P. Simon, and B. Eskenazi, *Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas*. Epidemiology, 1996. **7**(3): p. 240-4.
24. Craici, I., S. Wagner, and V.D. Garovic, *Preeclampsia and future cardiovascular risk: formal risk factor or failed stress test?* Ther Adv Cardiovasc Dis, 2008. **2**(4): p. 249-59.
25. Cindrova-Davies, T., *Gabor Than Award Lecture 2008: pre-eclampsia - from placental oxidative stress to maternal endothelial dysfunction*. Placenta, 2009. **30 Suppl A**: p. S55-65.
26. Knuist, M., et al., *Risk factors for preeclampsia in nulliparous women in distinct ethnic groups: a prospective cohort study*. Obstet Gynecol, 1998. **92**(2): p. 174-8.
27. Kaaja, R., et al., *Evidence of a state of increased insulin resistance in preeclampsia*. Metabolism, 1999. **48**(7): p. 892-6.
28. Haruta, T., et al., *Ligand-independent GLUT4 translocation induced by guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) involves tyrosine phosphorylation*. Endocrinology, 1998. **139**(1): p. 358-64.
29. Carpenter, C.L., et al., *Purification and characterization of phosphoinositide 3-kinase from rat liver*. J Biol Chem, 1990. **265**(32): p. 19704-11.
30. Auger, K.R., et al., *PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells*. Cell, 1989. **57**(1): p. 167-75.
31. Lee, W.J., *Insulin-like growth factor-I-induced androgen receptor activation is mediated by the PI3K/Akt pathway in C2C12 skeletal muscle cells*. Mol Cells, 2009.
32. Engelman, J.A., J. Luo, and L.C. Cantley, *The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(8): p. 606-19.

Table 1

	Normal	PE	<i>p</i>
Age (years)	26.8 ± 4.1	27.8 ± 8.2	0.714
BMI (kg/m ²)	28.4 ± 3.5	31.3 ± 4.1	0.080
Gestational period (weeks)	39.1 ± 0.4	35.6 ± 0.5	< 0.001 [*]
Systolic blood pressure (mmHg)	118.5 ± 10	154.8 ± 10	< 0.001 [*]
Diastolic blood pressure (mmHg)	70.6 ± 6.4	97.5 ± 5.9	< 0.001 [*]
Number of pregnancies	2.5 ± 2.1	1.8 ± 1.1	0.303
Fasting glucose (mg/dL)	76.0 ± 2.3	91.5 ± 2.8	< 0.001 [*]

^{*}Student t test.

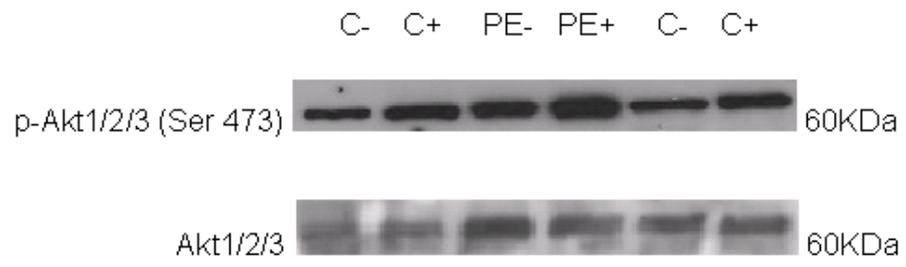
Figure 1

Figure 2

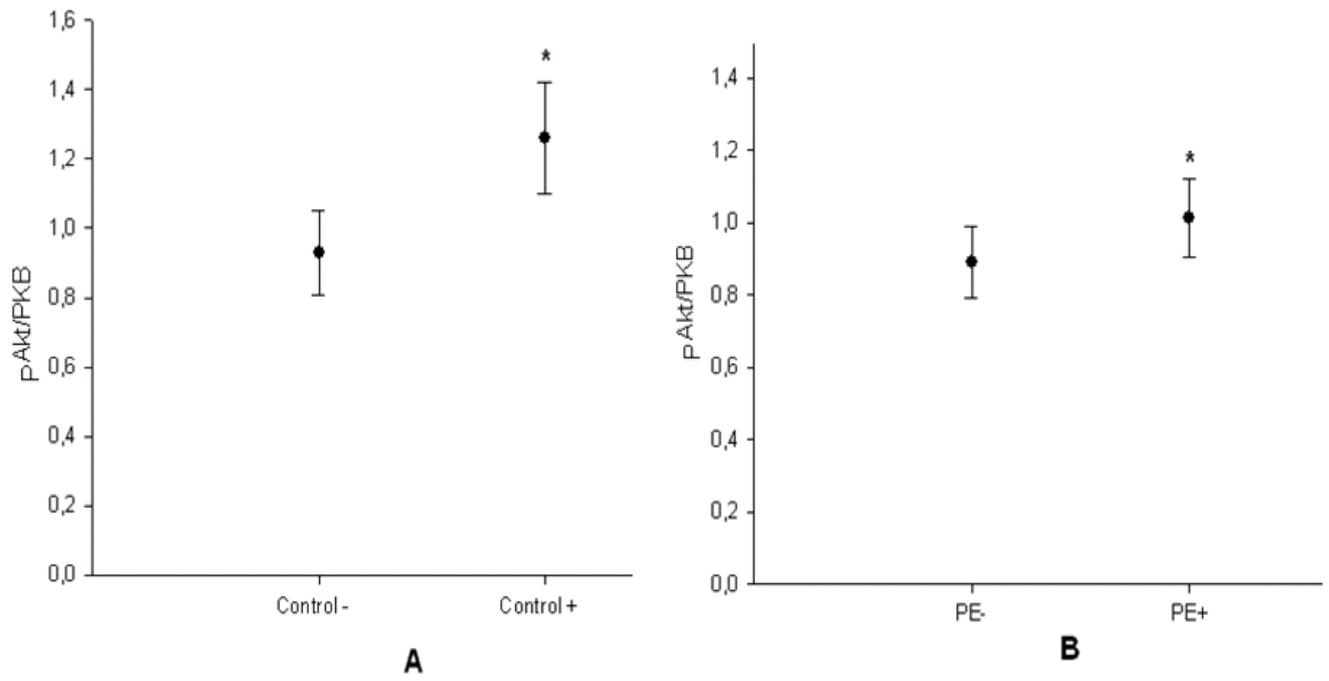
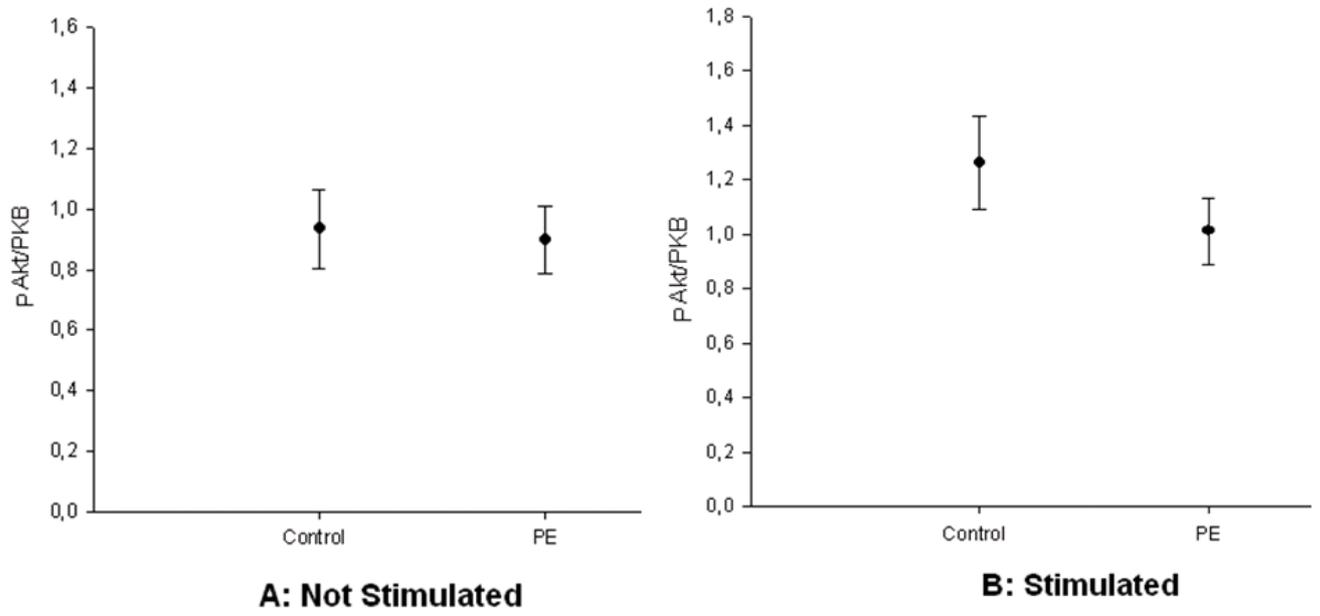


Figure 3



Legends

Table 1. Patient profiles.

Figure 1. Representative Western blot for samples of placenta of patients with preeclampsia (PE) and normal controls (C). Sample stimulated with insulin (+), sample not stimulated with insulin (-).

Figure 2. Expression of phosphor-Akt(Ser473) in samples stimulated and not stimulated. In the control group (A), 0.93 ± 0.12 for not stimulated samples (-) and 1.26 ± 0.16 for the stimulated samples (+), $p < 0.001$. In PE group (B), 0.89 ± 0.11 for the not stimulated samples (PE-) and 1.01 ± 0.11 for the stimulated samples (PE +) $p = 0.001$.

Figure 3. Expression of phosphorylation of Akt/PBK between the control group and PE group not stimulated (A) $p = 0.828$, and control group and PE group stimulated (B) $p = 0.237$.