

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**



Érika Santana Leotério

**Avaliação dos Canais de Potássio na
Fisiopatologia da Pré-eclâmpsia**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2021**

Érika Santana Leotério

Avaliação dos Canais de Potássio na Fisiopatologia da Pré-eclâmpsia

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal de Ciências da
Saúde de Porto Alegre como requisito
para a obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Dra. Gisele Branchini
Co-orientadora: Dra. Fernanda Bordignon Nunes

**Porto Alegre
2021**

Catálogo na Publicação

Leoterio, Erika Santana

Avaliação dos canais de potássio na fisiopatologia da pré-eclâmpsia / Erika Santana Leoterio. -- 2021.

69 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2021.

Orientador(a): Gisele Branchini ; coorientador(a): Fernanda Bordignon Nunes.

1. canais de potássio. 2. pré-eclâmpsia. 3. placenta. 4. KCa. 5. Kir. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

Meu primeiro agradecimento é a Deus, que me acolhe, auxilia e fortalece em todo os momentos. Sua presença constante em minha vida me motiva a seguir em frente a cada dia.

Agradeço aos meus pais Claudenice e Paulo por todo amor transmitido, pelo incentivo, pela educação e pelo carinho. Obrigada também aos meus irmãos Karina e Kayque que estiveram sempre próximos nos momentos alegres e que também aguentaram os momentos de mal humor e os estresses para cumprir os prazos e finalizar esse trabalho. Sou e serei eternamente grata por tudo. Amo vocês.

Ao meu (ainda) noivo, Diorgines, por estar sempre ao meu lado. Muito obrigada pelo amor doado e pela amizade incondicional durante a minha trajetória. Com certeza você foi o melhor presente. Te admiro e te amarei para sempre.

As minhas queridas professoras Dra. Gisele Branchini, Dra. Sheila Bünecker Lecke e Dra. Fernanda Bordignon Nunes, por terem me aceito como orientanda e feito o possível para contribuírem com seus conhecimentos e construirmos esse projeto em conjunto. Sou muito grata por toda a atenção, dedicação e conhecimentos compartilhados.

As demais professoras e membros do Laboratório de Biofísica Celular, Molecular e Computacional da UFCSPA (e do laboratório 503 como um todo) que de alguma forma se fizeram presente e contribuíram com o meu trabalho, fosse auxiliando nos experimentos e coletas, nas discussões das metodologias, trocas

de experiências ou somente ao compartilhar conversas ou uma xícara de chá. Todos foram imprescindíveis para que essa dissertação fosse concluída.

Obrigada a toda equipe assistencial médica e de enfermagem do Centro Obstétrico do Hospital Santa Clara que me acolheram nos períodos das coletas até no meio da madrugada. Meu agradecimento especial ao Dr. Antônio Celso Ayub e a Enfermeira Luanda que permitiram o acesso e a execução do trabalho no Hospital.

Aos colegas de trabalho do Laboratório Carlos Franco Voegeli e do Laboratório Clínico do Hospital São Lucas da PUC-RS que se dispuseram a fazer trocas de jornada para que os experimentos do meu projeto pudessem ser conduzidos da melhor maneira possível. Obrigada de todo meu coração por cada um que me ajudou nesse período permitindo a execução do meu trabalho.

Sou também muito grata as gestantes que aceitaram de bom grado participar dessa pesquisa, sem vocês nada disso teria sido possível. Vocês são uma fonte de inspiração para mim!

E por fim, agradeço a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

“Uma verdade científica confiável tem que estar alicerçada
naquilo que testamos experimentalmente, conhecemos
historicamente e raciocinamos intelectualmente”

José Venefrides

Resumo

Introdução: A pré-eclâmpsia está associada principalmente à presença da placenta e diminuição da perfusão desta, devido a malformação das artérias espiraladas maternas e ao aumento da resistência vascular. Analisando os fatores fisiológicos que regulam a pressão arterial, sabemos que a abertura dos canais de potássio promove a hiperpolarização celular e o relaxamento muscular vascular. Portanto, o objetivo deste projeto foi avaliar o papel dos canais de potássio ativados por cálcio (KCa) e dos canais de potássio corretores do fluxo de internalização (Kir) na fisiopatologia da gravidez normotensa e na pré-eclâmpsia. **Métodos:** Amostras de sangue e fragmentos de placenta foram obtidos de 67 gestantes maiores de 18 anos atendidas no Centro Obstétrico do Hospital Santa Clara. Os níveis séricos de eletrólitos foram medidos pela técnica de eletrodo íon seletivo. As amostras de placenta (42 controles e 25 casos) foram analisadas quanto à expressão gênica, por RT-qPCR, e proteica, por imunohistoquímica, dos canais KCa 3.1, Kir 2.1, Kir 3.4 e Kir 6.1. Os dados foram analisados por *one-way* ANOVA e teste U de Mann-Whitney, o índice de significância adotado foi $p < 0,05$ em todas as análises estatísticas. **Resultados:** A expressão gênica de KCa 3.1 foi maior nas amostras de placenta do grupo pré-eclâmpsia (PE), quando comparado ao grupo controle, porém essa diferença não foi observada na expressão proteica. Para os demais alvos do estudo, observamos uma menor expressão das proteínas Kir 3.4 e Kir 6.1 grupo PE e uma maior expressão de Kir 2.1, quando comparado ao controle. Em relação aos eletrólitos, observou-se menores níveis de cálcio iônico no grupo PE, comparado ao controle, porém ambos se encontravam dentro dos valores de referência para

níveis séricos. **Conclusão:** Apesar da maior expressão gênica dos canais KCa 3.1 entre as amostras placentárias do grupo PE, a expressão proteica foi similar nos dois grupos. Podemos hipotetizar que o aumento da expressão gênica pode ser induzida na placenta de gestantes pré-eclâmpicas em resposta a um estímulo para reduzir o tônus vascular e, conseqüentemente, reduzir a pressão arterial como um mecanismo de regulação homeostática. Uma vez que os canais Kir são incluídos na vasodilatação em resposta à hipóxia, a expressão reduzida dos canais Kir na placenta pode estar relacionada ao maior tônus vascular na pré-eclâmpsia.

Palavras-chave: Placenta; pré-eclâmpsia; canal de potássio ativado por cálcio; Canal de potássio corretor do fluxo de internalização.

Abstract

Introduction: Preeclampsia is primarily associated with the presence of placenta and decreased placental perfusion, mainly due to malformation of maternal spiral arteries and increased vascular resistance. Looking at the physiological factors that regulate blood pressure, we know that the opening of potassium channels promotes cellular hyperpolarization and vascular muscle relaxation. So, the aim of this project was to evaluate the role of calcium-activated potassium channels (KCa) and inward-rectifier potassium channels (Kir) in the pathophysiology of both normotensive pregnancy and preeclampsia. **Methods:** a blood sample and a fragment of placenta were obtained from 67 women over 18 years-old attending at the Santa Clara Hospital Obstetric Centre for delivery. Serum electrolytic levels were measured using the selective electrode-ion technique. The placenta samples (42 controls and 25 cases) were analysed for gene expression by RT-qPCR and protein expression by immunohistochemistry to KCa 3.1, Kir 2.1, Kir 3.4 and Kir 6.1 channels. The data were analysed by one-way ANOVA and Mann-Whitney U test, the significance index adopted was $p < 0.05$ in all statistical analyses. **Results:** The gene expression of KCa 3.1 was higher in placentas from the pre-eclampsia (PE) group when compared to the control group, but this difference was not observed in protein expression. For the other targets of the study, we observed a lower expression of the Kir 3.4 and Kir 6.1 proteins in the PE group and a higher expression of Kir 2.1, when compared to the control. Regarding electrolytes, lower levels of ionic calcium were observed in the PE group, compared to the control, but both were within the reference values for serum levels. **Conclusion:** Despite the higher gene expression of the KCa 3.1

channels between PE and control group placenta samples, the protein expression was similar in the two groups. We could hypothesize that the gene expression could be induced in the placenta of PE patients in response to a stimulus for the increased of KCa expression, to reduce the vascular tonus, and, hence, reduce blood pressure in a homeostatic regulation mechanism. Once Kir channels are enrolled in vasodilatation in response to hypoxia, the lower expression of Kir channels in placenta could be related to an enhanced vascular tone in preeclampsia.

Keywords: Placenta; preeclampsia; calcium-activated potassium channel; Inward-rectifier potassium channel.

Lista de abreviaturas

11,12,15-THETA: ácido 11,12,15-trihidroxi-eicosatrienóico, do inglês *11, 12, 15-*

Trihydroxyicosatrienoic acid

15-H-11,12-EETA: ácido 15-hidroxi-11,12-epoxieicosatrienóico, do inglês *15-*

hydroxy-11,12-epoxyeicosatrienoic acid

cm: centímetro

EDHF: fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio, do inglês

hyperpolarizing factors derived from endothelium

EET: ácido epoxieicosatrienóico, do inglês *epoxyeicosatrienoic acid*

HPLC: cromatografia líquida de alta performance, do inglês *high performance*

liquid chromatography

K_{ATP}: Canal de potássio dependente do ATP

K_{Ca}: canal de potássio ativado por cálcio

K_{ir}: canal de potássio corretor do fluxo de internalização

K_v: Canal de potássio dependente de voltagem

mg/24h: miligrama por 24 horas

mg/dL: miligrama por decilitro

mL/24h: mililitro por 24 horas

mm Hg: milímetro de Mercúrio

PE: pré-eclâmpsia

Síndrome HELLP: sigla que descreve a condição de pré-eclâmpsia grave com presença de hemólise (H), níveis elevados de enzimas hepáticas (EL) e plaquetopenia (LP)

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UI/L: unidade internacional por litro

μL: microlitro

Lista de Figuras

FIGURA 1: Esquema de uma placenta a termo.....	21
--	----

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
1.1. Caracterização e diagnóstico da pré-eclâmpsia	18
1.2. Fatores de risco para o desenvolvimento da pré-eclâmpsia.....	20
1.3. Fisiopatologia da pré-eclâmpsia	21
1.4. Complicações materno-fetais	22
1.5. Tratamento.....	23
1.6. Fatores que regulam a pressão arterial.....	24
1.7. Canais de potássio	26
1.8. Justificativa	29
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
3. OBJETIVOS.....	36
4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	37
5. CONCLUSÕES	61
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
7. ANEXOS	64
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA	64

1. REFERENCIAL TEÓRICO

Muitas modificações físicas e hormonais acontecem no corpo feminino durante a gestação para abrigar o feto que se desenvolverá e formará um novo ser. Dentre essas modificações, ocorrem alterações no sistema cardiovascular, havendo um aumento de cerca de 30 a 50% no fluido extracelular e aumento de 30 a 40% no volume plasmático neste período gestacional, permitindo que os órgãos maternos - e o feto - sejam bem perfundidos (1).

A gravidez, em seu estado normal, já representa um período de estresse fisiológico ao corpo humano e, quando estas mudanças fisiológicas não ocorrem como deveriam, algumas gestantes acabam apresentando certas desordens que levam a uma má perfusão sanguínea, como o exemplo da pré-eclâmpsia (2).

1.1. Caracterização e diagnóstico da pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia pode ser considerada uma doença relativamente nova, descrita nos últimos 100 anos. Entretanto, o que hoje temos com um grave desfecho dessa doença, a eclâmpsia, já era reportada nas histórias ao redor do mundo desde escritos datados de aproximadamente 5000 anos atrás, como os Papiros Egípcios, e escritores como Sushruta, Wang Dui Me, Hipócrates, Celso e Galeno com as narrativas de convulsões nos momentos dos partos (3–6).

Com o passar do tempo, aproximadamente entre os anos de 1840 e 1843, a proteinúria foi descoberta e associada com o desenvolvimento de eclâmpsia em certas gestantes e alguns anos mais tarde (entre 1897 e 1903) a hipertensão também foi notada e associada com a eclâmpsia.

Neste ponto se percebeu que a eclâmpsia era apenas “a ponta do iceberg” (Robillard, 2017), visto que cerca de 10% das gestações apresentavam hipertensão, destas 3% evoluíam para pré-eclâmpsia e, sem intervenção médica, 1% sofria de eclâmpsia (4).

No final dos anos 80, a pré-eclâmpsia passou a ser considerada como mais do que apenas pressão elevada na gestação, e com isso grandes avanços foram realizados para definir a sua fisiopatologia.

Atualmente caracterizada por um comprometimento clínico generalizado heterogêneo, a pré-eclâmpsia é classificada em leve ou grave se manifestando clinicamente como edema, hipertensão arterial, proteinúria e outros distúrbios sistêmicos principalmente a partir da vigésima semana gestacional (7,8).

- Pré-eclâmpsia Leve: manifestada por níveis pressóricos entre 140 × 90 mmHg até 159 × 109 mmHg após 20 semanas de gestação em mulheres previamente normotensas; proteinúria (≥ 300 mg/24h); sintomas cerebrais, visuais ou digestivos como cefaleia, tonturas, visão borrada, náuseas e vômitos.
- Pré-eclâmpsia Grave: mesma manifestação clínica da pré-eclâmpsia leve acrescida de no mínimo um dos seguintes fatores: hipertensão arterial $\geq 160 \times 110$ mmHg, proteinúria ≥ 500 mg/24h, oligúria < 500 mL/24h, sintomas cerebrais, visuais ou digestivos de forma persistente, síndrome HELLP (hemólise, enzimas hepáticas elevadas e baixa quantidade de plaquetas), insuficiência renal ou hepática (creatinina sérica $\geq 1,2$ mg/dL, enzimas transaminases > 70 UI/L), trombocitopenia (plaquetas $< 100.000/\mu\text{L}$).

- Eclâmpsia: surgimento de convulsões em mulheres com pré-eclâmpsia ou com hipertensão gestacional, tanto em período anterior ao parto ou até 14 dias após o mesmo (9).

1.2. Fatores de risco para o desenvolvimento da pré-eclâmpsia

Esta síndrome ocorre em cerca de 2% a 10% das gestações, porém este índice pode aumentar para 15 a 20% quando as gestantes apresentam fatores de risco para o desenvolvimento da doença. Os fatores mais difundidos são a hipertensão crônica, diabetes pré-gestacional, gravidez múltipla ou uma história prévia de pré-eclâmpsia (10–12). Entretanto, primiparidade e história familiar de pré-eclâmpsia também são fatores que devem ser considerados, visto que primigestas com história familiar de pré-eclâmpsia tem de 2 a 5 vezes maior risco de desenvolvimento da doença do que primigestas sem o histórico (13–16).

Ferreira (2010) sugere correlações imunológicas quando apresenta que um abortamento ou uma gestação normal prévia diminui o risco para próxima gestação e que a troca de parceiro aumenta o risco da doença para múltiparas (14,15,17).

Outros fatores que devem ser considerados são os extremos da idade materna e obesidade. Mulheres obesas ou com idade menor do que 20 anos e maior do que 40 anos estão mais propensas a desenvolver pré-eclâmpsia durante a gestação (14,17,18).

Além de todos esses fatores já citados, existe ainda uma predisposição relacionada a etnia, visto que mulheres negras têm uma incidência de pré-eclâmpsia duas vezes maior do que mulheres brancas (14,18,19).

1.3. Fisiopatologia da pré-eclâmpsia

Apesar da etiologia da pré-eclâmpsia não estar bem definida, ela está primariamente associada à presença da placenta e a diminuição da perfusão desta, principalmente devido a uma má formação das artérias espiraladas maternas e ao aumento da resistência vascular (1,20).

A placenta é um órgão que começa a se desenvolver juntamente com o feto e é expulsa do útero logo após o parto. Estruturalmente ela possui um formato arredondado de aproximadamente 15 a 20 cm de diâmetro por 2 a 2,5 cm de altura, pesando cerca de 500 gramas (21).

Definida como um órgão chave para a sobrevivência fetal, ela é formada pela fusão das membranas fetais (córion viloso) com o tecido materno (decídua basal), conforme esquematizado na FIGURA 1. Desta forma, um ambiente de suporte que contém o sangue materno (espaço intervilloso) é criado, permitindo a troca de nutrientes, gases, água e metabólitos para suprir as necessidades fisiológicas do feto (22).

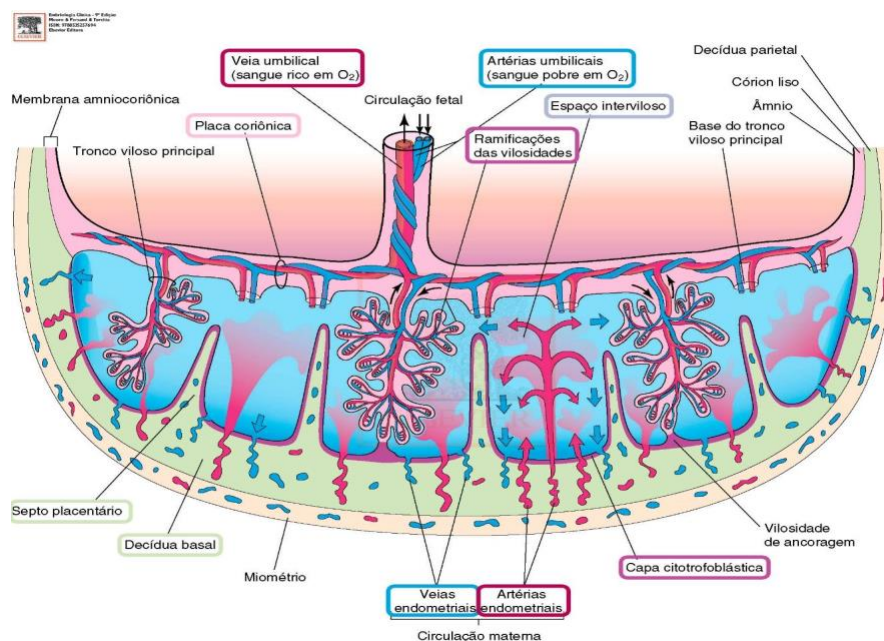


FIGURA 1: Esquema de uma placenta a termo.
Extraído de Moore, K.L. Embriologia Clínica. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

Para a correta formação estrutural da placenta é necessário que os vasos sanguíneos maternos sejam remodelados (20). As artérias espiraladas - inicialmente pequenas - são invadidas por células trofoblásticas. Isto resulta na perda das células endoteliais e das células musculares lisas de suas porções distais restando apenas uma estrutura dilatada que as ligam ao espaço intervilloso (Moore, 2012).

Na gestação normal as porções arteriais que sofrem essas modificações se tornam incapazes de responder aos estímulos para vasoconstrição, entretanto essas mudanças não ocorrem adequadamente na pré-eclâmpsia, levando ao aumento da resistência vascular e consequente hipertensão arterial (20).

Ainda que a maioria das gestantes apresente um bom desfecho clínico após a placenta ser retirada e o equilíbrio fisiológico ser restaurado, o atraso no diagnóstico da síndrome pode favorecer a evolução para a eclâmpsia, além de predispor essas mulheres a um risco extremamente elevado de desenvolver outros problemas cardiovasculares durante a vida (1,9,12).

1.4. Complicações materno-fetais

A condição clínica da pré-eclâmpsia predispõe as gestantes a uma situação bem delicada uma vez que, apesar das pesquisas, permanece enigmática e sem um tratamento específico (7,8).

Como o único tratamento definitivo para a pré-eclâmpsia é a retirada do feto - ou mais precisamente da placenta - muitas vezes de forma precoce e prematura (9,12), ela é considerada uma das principais causas de parto

premature, além de morbimortalidade materna e perinatal e restrição do crescimento intrauterino (2,9).

A evolução da pré-eclâmpsia é bastante variável, enquanto algumas pacientes podem não progredir para a forma mais grave da doença, outras apresentam essa evolução em questão de dias ou até mesmo de horas, sendo extremamente importante a monitorização contínua dessas pacientes (20).

1.5. Tratamento

As terapias atuais visam evitar a morbimortalidade tratando somente a sintomatologia apresentada, sem a existência de um medicamento de escolha para tratamento das gestantes pré-eclâmpicas (10).

Um fármaco com grande potencial de ser utilizado para controle hipertensivo na gestação é a nifedipina. Podendo ser utilizado como hipotensor, vasodilatador e tocolítico, ele atua bloqueando canais de cálcio e reduzindo a concentração de cálcio intracelular, resultando no relaxamento da musculatura vascular (23).

Já para o tratamento e prevenção da eclâmpsia, um dos medicamentos mais difundidos e utilizados desde 1925 é o sulfato de magnésio (24). Biologicamente, o magnésio está inserido em uma extensa variedade de reações fisiológicas e seu completo mecanismo de ação ainda não está elucidado, contudo, por ser considerado um antagonista fisiológico natural do cálcio, ele é capaz de reduzir a resistência vascular periférica. Sua aplicação é extensa pois apresenta grande eficácia no controle das crises convulsivas e ainda inibe o trabalho de parto prematuro (24). Sua maior aplicação é nos casos de gestantes com sintomas de desenvolvimento de eclâmpsia (cefaleia intensa, visão borrada

ou dor epigástrica) pois, nestes casos graves, o uso profilático anterior ao parto reduz 60% do risco de evolução para a eclâmpsia. Apesar disso, não se indica o uso rotineiro de sulfato de magnésio para gestantes que apresentam uma pré-eclâmpsia leve, pois o risco de convulsão, mesmo sem profilaxia, é muito baixo (1/200) (10).

1.6. Fatores que regulam a pressão arterial

Devido ao caráter generalizado da pré-eclâmpsia, durante alguns anos se acreditou que existia uma “toxina” circulante que afetava as diversas células endoteliais; porém, com a condução de vários estudos, muitas das moléculas foram descritas e, em um trabalho de revisão, Roberts (2013) finaliza que “agora está conclusivamente estabelecido que não há toxinas misteriosas no sangue”, descrevendo em detalhes as moléculas circulantes como fatores anti-angiogênicos, citocinas e partículas de sinciciotrofoblasto (4,6).

Apesar de essas moléculas estarem presentes inclusive nas gestações onde a pré-eclâmpsia não se manifesta, toda a resistência e alteração cardiovascular que caracteriza a gestação nos leva a observar mais cuidadosamente os fatores fisiológicos que regulam a pressão arterial, como a presença de fatores angiogênicos e anti-angiogênicos, a ação e regulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e a manutenção do tônus vascular (25).

1.6.1. Fatores angiogênicos e anti-angiogênicos

Alguns estudos relacionados a estes fatores apresentam achados clínicos que permitem realizar um diagnóstico precoce da pré-eclâmpsia, porém, visto

que não existe tratamento preventivo, a utilidade deste diagnóstico acaba sendo limitada à predição e evolução da síndrome apenas para tratamentos sintomáticos (1,26).

1.6.2. Sistema renina-angiotensina-aldosterona

Alguns estudos apontam que apesar de gestantes pré-eclâmpicas apresentarem níveis plasmáticos mais elevados de renina e aldosterona, o sistema como um todo está suprimido nesta condição clínica (1,27,28).

1.6.3. Tônus vascular

O tônus vascular é regulado majoritariamente por mediadores secretados pelas células endoteliais, como o óxido nítrico, prostaglandinas e fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF) (25,29). Como a pré-eclâmpsia está associada com aumento do tônus vascular, e defeitos na função dos canais de potássio podem levar a vasoconstrição, torna-se necessária a realização de mais estudos para esclarecer a relação deste fenômeno com a patogênese da síndrome (30–32).

Em relação à regulação do tônus vascular, os fatores derivados do endotélio merecem destaque. Eles são um grupo de diferentes fatores que, de modo geral, promovem o aumento na concentração intracelular de cálcio, a abertura dos canais de potássio ativados por cálcio (KCa) e dos canais de potássio corretores do fluxo de internalização (Kir), a hiperpolarização celular e o relaxamento da musculatura vascular (29).

Os principais EDHFs já descritos são o óxido nítrico, o íon potássio, o peróxido de hidrogênio, o peptídeo C natriurético e alguns metabólitos derivados

do ácido araquidônico, como o ácido epoxieicosatrienóico (EET), o ácido 15-hidroxi-11,12-epoxieicosatrienóico (15-H-11,12-EETA) e o ácido 11,12,15-trihidroxeicosatrienóico (11,12,15-THETA) (25). Atualmente, sabe-se que certos EDHFs são expressos de maneira constitutiva nas células vasculares endoteliais, porém alguns outros podem agir de maneira induzida (como os metabólitos 15-H-11,12-EETA e 11,12,15-THETA), contribuindo quando necessário para o relaxamento vascular e muscular (25,29).

Apesar de presente em gestantes, esta regulação através dos EDHFs aparenta estar ausente na pré-eclâmpsia (30). Devido à grande prevalência dessa condição clínica e a carência de informações sobre suas causas (20), torna-se imprescindível a realização de estudos que possam esclarecer e identificar os mecanismos envolvidos neste processo etiológico.

1.7. Canais de potássio

Nas membranas celulares existem diversos tipos de proteínas, entre elas proteínas formadoras de canais - denominadas canais iônicos - que formam minúsculos poros hidrofílicos na membrana, permitindo assim a passagem de íons devido a presença de um gradiente eletroquímico (33,34).

Os canais iônicos são seletivos, permitindo a passagem de alguns íons inorgânicos de acordo com o diâmetro, a forma do canal iônico e as cargas no seu revestimento interno. Além disso, os canais iônicos podem assumir diferentes estados conformacionais, adotando o estado fechado ou aberto, para permitir ou não a passagem dos íons (33). Dentre todos os tipos de canais iônicos conhecidos, os canais de potássio são os que apresentam o maior grupo

e a maior diversificação, incluindo várias classes estruturalmente diferentes (35,36).

1.7.1. Funções dos canais de potássio

Com a mudança da conformação dos canais e sua ativação, íons de potássio podem sair das células musculares lisas vasculares, promovendo a hiperpolarização da membrana, o relaxamento muscular e, desta forma, causar vasodilatação, aumentar o fluxo sanguíneo e diminuir a pressão sanguínea. Inversamente, a inibição destes canais leva à vasoconstrição (37,38).

Os canais de potássio ajudam a restaurar o estado de repouso após a despolarização e diminuem a excitabilidade celular pela sua ação hiperpolarizante. Sendo assim, nas células musculares lisas vasculares podemos dizer que a principal função dos canais de potássio é exercida através da regulação do potencial de membrana (39,40).

1.7.2. Regulação do tônus vascular através dos canais de potássio

O potencial de membrana das células musculares vasculares está intimamente relacionado à regulação do tônus vascular, de forma que uma pequena variação de poucos milivolts no potencial cause alterações significativas do diâmetro vascular (39).

As alterações no potencial de membrana ocorrem através da passagem de íons do ambiente intracelular para o extracelular ou vice e versa. As alterações de condutância podem ser observadas quando os canais passam de estados ativos (abertos) para inativos (fechados) e vice-versa. Como os canais de potássio estão presentes nas membranas celulares das células vasculares,

sua abertura provoca um aumento da saída de íons potássio do meio intracelular para o meio extracelular por difusão passiva, levando à hiperpolarização da membrana celular (38,41). A hiperpolarização da membrana leva ao fechamento de canais de cálcio dependentes da voltagem, reduzindo assim a entrada de íons cálcio na célula e resultando na vasodilatação pelo relaxamento vascular (39,41). De forma inversa, o fechamento de um canal de potássio causa a diminuição do potencial de repouso, com consequente abertura de canais de cálcio dependentes da voltagem, aumento da concentração de cálcio intracelular e vasoconstrição (39,42).

1.7.3. Tipos de canais de potássio

Estruturalmente os canais de potássio são transmembrana e exibem uma simetria quádrupla entre suas quatro subunidades. Cada subunidade tem seis regiões com aminoácidos hidrofóbicos que se encontram ligadas por sequências de aminoácidos de características hidrofílicas. Cada subunidade contém também um terminal amino- ou carboxilo citoplasmático (39,42,43).

As células musculares lisas vasculares expressam quatro diferentes tipos de canais de potássio que são classificados dependendo do estímulo que eles recebem para serem ativados, sendo eles:

- Canais de potássio dependentes do ATP (K_{ATP}) – respondem a alterações do metabolismo celular. São inibidos pelo aumento da concentração de ATP intracelular e ativados durante períodos de depleção de energia (44,45);
- Canal de potássio dependente da voltagem (K_v) – aumentam a sua atividade em estados de despolarização da membrana e são importantes

reguladores do potencial de membrana em resposta a estímulos despolarizantes (46);

- Canal de potássio dependente do Ca^{2+} (KCa) – respondem a alterações da concentração de cálcio intracelular regulando o potencial de membrana e são importantes no controle do tônus miogênico (39,46,47);
- Canais de potássio retificadores internos (*inward rectifier* - Kir) – regulam o potencial de membrana das células musculares vasculares quando aumentam as concentrações de potássio, hidrogênio e adenosina. Estes canais são um dos maiores subgrupos dentro do grupo de canais de potássio, estão diretamente relacionados à manutenção do potencial de membrana e à homeostase em diversos tipos celulares (34,35,39,47).

Cada uma dessas classes de canais se divide em vários tipos de acordo com as suas estruturas moleculares e cada tecido pode ter uma prevalência de alguns tipos de canais específicos (34,40,48,49). Uma vez que a ativação/inativação destes canais pode ser influenciada por inúmeros fatores, o estudo da presença e da função destes canais no tecido placentário torna-se imprescindível para auxiliar no entendimento da patogênese da pré-eclâmpsia.

1.8. Justificativa

Devido à vasodilatação promovida pelos canais de potássio e visto que uma das principais manifestações da pré-eclâmpsia está vinculada à pressão arterial elevada e má perfusão placentária, este projeto tem por finalidade analisar a expressão dos canais de potássio envolvidos na rota de ação dos EDHFs induzíveis em pacientes pré-eclâmpicas de forma a contribuir para o entendimento da relação destes fatores com a patogênese da doença.

Os conhecimentos gerados a partir deste projeto terão potencial para aprimorar o manejo de gestantes com pré-eclâmpsia uma vez que diferentes alvos terapêuticos poderão ser futuramente explorados para contribuir na redução da morbimortalidade materna e perinatal.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Verdonk K, Visser W, Van Den Meiracker AH, Danser AHJ. The renin-angiotensin-aldosterone system in pre-eclampsia: The delicate balance between good and bad. *Clin Sci*. 2014.
2. De Jesus GR, De Jesus NR, Dos Santos FC, Oliveira CS, Levy RA, Pôrto LCDMS, et al. Fatores angiogênicos e antiangiogênicos na fisiopatologia da pré-eclâmpsia e seu uso na prática obstétrica atual. *Rev Hosp Univ Pedro Ernesto*. 2014.
3. Robillard PY, Dekker G, Iacobelli S, Chaouat G. An essay of reflection: Why does preeclampsia exist in humans, and why are there such huge geographical differences in epidemiology? *J Reprod Immunol*. 2016.
4. Robillard PY, Dekker G, Chaouat G, Scioscia M, Iacobelli S, Hulsey TC. Historical evolution of ideas on eclampsia/preeclampsia: A proposed optimistic view of preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2017 Sep 1;123:72–7.
5. Lindheimer MD, Roberts JM, Cunningham FG. Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy. *Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy*. 2009.
6. Roberts JM, Bell MJ. If we know so much about preeclampsia, why haven't we cured the disease? *J Reprod Immunol [Internet]*. 2013;99(1–2):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2013.05.003>.
7. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. Vol. 308, *Science*. 2005. p. 1589–94.
8. C.Weel I, Romão-Veiga M, Matias ML, Fioratti EG, Peraçoli JC, Borges VT, et al. Increased expression of NLRP3 inflammasome in placentas from pregnant women with severe preeclampsia. *J Reprod Immunol [Internet]*. 2017;123(January):40–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2017.09.002>.
9. Cheng S Bin, Sharma S. Preeclampsia and health risks later in life: an immunological link. Vol. 38, *Seminars in Immunopathology*. Springer Verlag; 2016. p. 699–708.
10. Freire CMV, Tedoldi CL. Hipertensão arterial na gestação. *Arq Bras Cardiol*. 2009;93(6 supl. 1):110–78.
11. Baschat AA, Magder LS, Doyle LE, Atlas RO, Jenkins CB, Blitzler MG. Prediction of preeclampsia utilizing the first trimester screening examination. *Am J Obstet Gynecol [Internet]*. 2014;211(5):514.e1-514.e7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2014.04.018>.
12. Myatt L. Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine*. 2002;19(1):103–11.

13. Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: Systematic review of controlled studies. *Br Med J*. 2005;330(7491):565–7.
14. Ferreira GD. Atividade da via de sinalização da Akt/PKB em placenta de pacientes com pré-eclâmpsia. Vol. 9, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL; 2010.
15. Trupin L, Simon L, Eskenazi B. Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas. *Epidemiology*. 1996;7(3):240–4.
16. Walker JJ. Severe pre-eclampsia and eclampsia. *Baillieres Best Pr Res Clin Obs Gynaecol*. 2000;14(1):57–71.
17. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005;365(9461):785–99.
18. Esplin MS, Fausett M, Fraser A, Kerber R, Mineau G, Carrillo J, et al. Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *N Engl J Med*. 2001;344(12):867–72.
19. Knuist M, Bonsel G, Zondervan H, Treffers P. Risk factors for preeclampsia in nulliparous women in distinct ethnic groups: a prospective cohort study. *Obs Gynecol*. 1998;92(2):174–8.
20. Roberts JM, Escudero C. The placenta in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2012;2(2):72–83.
21. Moore K, Persaude TVN, Torchia MG. *Embriologia Clínica*. 11th ed. GEN Guanabara Koogan; 2012. 442 p.
22. Griffith OW, Wagner GP. The placenta as a model for understanding the origin and evolution of vertebrate organs. *Nature Ecology and Evolution*. 2017.
23. Bayer Schering Pharma. Bula Adalat retard - nifedipino.
24. Barbosa FT, Barbosa LT, Jucá MJ, Cunha RM da. Usos do sulfato de magnésio em obstetrícia e em anestesia. *Rev Bras Anesthesiol*. 2010.
25. Campbell WB, Gauthier KM. Inducible Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor (iEDHF): Role of the 15-Lipoxygenase-EDHF Pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014;61(3):176–87.
26. Verlohren S, Stepan H, Dechend R. Angiogenic growth factors in the diagnosis and prediction of pre-eclampsia. *Clinical Science*. 2012.
27. Nartita T, Ichihara A, Matsuoka K, Takai Y, Bokuda K, Morimoto S, et al. Placental (pro)renin receptor expression and plasma soluble (pro)renin receptor levels in preeclampsia. *Placenta* [Internet]. 2016;37:72–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2015.11.007>.

28. Verdonk K, Saleh L, Lankhorst S, Smilde JEI, Van Ingen MM, Garrelds IM, et al. Association Studies Suggest a Key Role for Endothelin-1 in the Pathogenesis of Preeclampsia and the Accompanying Renin-Angiotensin-Aldosterone System Suppression. *Hypertension*. 2015;65(6):1316–23.
29. Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: Where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(6):1215–25.
30. Gillham JC, Myers JE, Baker PN, Taggart MJ. Regulation of endothelial-dependent relaxation in human systemic arteries by SK Ca and IK Ca channels. *Reprod Sci*. 2007;14(1):43–50.
31. Kenny LC, Baker PN, Kendall DA, Randall MD, Dunn WR. Differential mechanisms of endothelium-dependent vasodilator responses in human myometrial small arteries in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Clin Sci*. 2002;103(1):67–73.
32. VanWijk MJ, Boer K, Van Der Meulen ET, Bleker OP, Spaan JAE, VanBavel E. Resistance artery smooth muscle function in pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2002.
33. Oliveira RAC de. Memória em cinética de canais para potássio ativados por cálcio em células de leydig. Universidade Federal de Pernambuco; 2003.
34. Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, et al. International union of pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev*. 2005;57(4):509–26.
35. Nascimento W do. Estudo eletrofisiológico dos canais iônicos das células-tronco mesenquimais da geleia de wharton do cordão umbilical humano. Universidade Federal do Pernambuco; 2011.
36. Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, Mckinnon D, Pardo LA, et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological Reviews*. 2005.
37. Wulff H, Castle NA, Pardo LA. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(12):982–1001.
38. Faraci FM, Heistad DD. Regulation of the cerebral circulation: Role of endothelium and potassium channels. *Physiological Reviews*. 1998.
39. Fisiologia dos canais de potássio nas células musculares lisas [Internet]. Universidade Federal Fluminense. [cited 2020 Mar 18]. p. 1–18. Available from: <http://www.webquest.uff.br/downloads/CanaisPotassio.pdf>
40. Riquelme G, De Gregorio N, Vallejos C, Berrios M, Morales B. Differential expression of potassium channels in placentas from normal and

pathological pregnancies: Targeting of the Kir 2.1 channel to lipid rafts. *J Membr Biol*. 2012.

41. Sobey CG. Potassium channel function in vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2001.
42. Rajkovic J, Djokic V, Gostimirovic M, Gojkovic-Bukarica L, Martorell M, Sharifi-Rad J, et al. Potassium channels on smooth muscle as a molecular target for plant-derived Resveratrol. *Cell Mol Biol*. 2020.
43. Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: Molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacological Reviews*. 2000.
44. Babenko AP, Aguilar-Bryan L, Bryan J. A view of Sur/Kir6.X, K_{ATP} channels. *Annu Rev Physiol*. 1998.
45. OLIVEIRA LDS. Papel Dos Canais K⁺ Atp Na Resposta Eletrofisiológica Ao Fsh E Ao Isoproterenol Em Células De Sertoli. 2011.
46. Mills TA, Greenwood SL, Devlin G, Shweikh Y, Robinson M, Cowley E, et al. Activation of KV7 channels stimulates vasodilatation of human placental chorionic plate arteries. *Placenta* [Internet]. 2015;36(6):638–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2015.03.007>.
47. Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2005;57(4):463–72. Available from: <http://pharmrev.aspetjournals.org.ezlibproxy.unisa.edu.au/content/57/4/463.short>.
48. Lorigo M, Oliveira N, Cairrao E. Clinical Importance of the Human Umbilical Artery Potassium Channels. *Cells*. 2020.
49. Li F, Xie Y, He M, Fan Y, Yang M, Wang S, et al. I_KCa and S_KCa might participate in preeclampsia through regulating placental angiogenesis. *Pregnancy Hypertens*. 2020.

3. OBJETIVOS

Para avaliar o papel dos canais de potássio na fisiopatologia da pré-eclâmpsia quando comparada à gravidez normotensa, os objetivos específicos deste projeto foram:

- a) Analisar a expressão gênica e proteica de canais de potássio ativados por cálcio (KCa) e canais de potássio corretores do fluxo de internalização (Kir) nos tecidos placentários de gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia;
- b) Mensurar os níveis de eletrólitos séricos (sódio, cálcio iônico e potássio) das pacientes em estudo;
- c) Associar os dados de expressão dos canais com os diferentes graus de pré-eclâmpsia e com os níveis séricos.

4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

**“Evaluation of the role of potassium channels in the pathophysiology of
preeclampsia”**

Érika Santana Leotério, Fernanda Bordignon Nunes, Thaís Duarte Borges de
Moura, Gisele Branchini

Artigo redigido para ser enviado para publicação na Revista “Placenta” - ISSN:
0143-4004.

***Evaluation of the role of potassium channels in the pathophysiology of
preeclampsia***

Érika Santana Leotério^{1*}, Fernanda Bordignon Nunes¹, Thaís Duarte Borges de Moura¹, Gisele Branchini¹.

1 Programa de Pós-Graduação em Patologia e Laboratório de Biofísica Celular, Molecular e Computacional, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author:

Érika Santana Leotério

Laboratório de Biofísica Celular, Molecular e Computacional, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Zip Code: 90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail address: erika.leoterio@gmail.com

Abstract

INTRODUCTION: Preeclampsia is primarily associated with the presence of placenta and decreased placental perfusion and the opening of potassium channels promotes cellular hyperpolarization and vascular muscle relaxation. So, the aim of this study was to evaluate the role of potassium channels in the pathophysiology of both normotensive pregnancy and preeclampsia, analysing the gene and protein expression of some calcium-activated potassium channels (KCa) and inward-rectifier potassium channels (Kir) in placentae.

METHODS: a blood sample and a fragment of placenta were obtained from 67 women attending at the Santa Clara Hospital Obstetric Centre for delivery. Serum electrolytic levels were measured using the selective electrode-ion technique. The placenta samples (42 controls and 25 cases) were analysed to gene and protein expression. The data were analysed by one-way ANOVA and Mann-Whitney U test, the significance index adopted was $p < 0.05$ in all statistical analyses.

RESULTS: Specific genes and protein expression of potassium channels were compared. The gene expression of KCa 3.1 was statistically higher whilst Kir 3.4 and Kir 6.1 protein expression were significantly lower in PE group. In the serum electrolytic analysis, the difference was found on ionic calcium levels which was lower at PE group.

DISCUSSION: Despite the higher expression of the KCa3.1 channels between PE and control group placenta samples, the protein expression was similar in the two groups. We could hypothesize that the gene expression could be induced in the placenta of PE patients in response to a stimulus for the increased of KCa

expression, to reduce the vascular tonus, and, hence, reduce blood pressure, in a homeostatic regulation mechanism. Once Kir channels are enrolled in vasodilatation in response to hypoxia, the lower expression of Kir channels in placenta could be related to an enhanced vascular tone in preeclampsia.

KEYWORDS: Placenta; preeclampsia; calcium-activated potassium channel; Inward-rectifier potassium channel.

Introduction

During pregnancy the body undergoes several changes, including changes in the cardiovascular system which, when not occurring as they should, can cause some disorders in pregnant women that culminate in poor blood perfusion as seen in preeclampsia (1,2). The clinical condition of preeclampsia predisposes pregnant women to a very delicate situation since, despite research, it remains puzzling and without specific treatment (3–6). Preeclampsia is primarily associated with the presence of placenta and decreased placental perfusion, mainly due to malformation of maternal spiral arteries and increased vascular resistance (1,7). Although most pregnant women achieve a good clinical outcome after placental removal, delayed diagnosis of the syndrome may favour the progression to eclampsia and may predispose these women to an extremely high-risk of developing other problems and future cardiovascular diseases (8,9). All this cardiovascular change that characterizes preeclampsia leads us to look more closely at the physiological factors that regulate blood pressure, such as the hyperpolarizing factors derived from endothelium that generally promote the increase in intracellular calcium concentration, opening of calcium-activated potassium channels (KCa) and internalizing flow correcting potassium channels (Kir), cellular hyperpolarization and vascular muscle relaxation (10–13). The objective of this study was to evaluate the role of potassium channels in the pathophysiology of both normotensive pregnancy and preeclampsia, analysing the gene and protein expression of KCa and Kir potassium channels in placentae of pregnancy normotensive and preeclamptic women.

Materials and methods

Study population

The study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre and of the Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre Hospital. Patient consent was obtained prior to delivery and all the consent forms were signed. A questionnaire was applied to collect clinical information. In addition, the analysis of medical record was carried out to clarify some clinical information. The preeclamptic patients were classified according to the American College of Obstetricians and Gynaecologist criteria (14) and the control group enrolled patients with normotensive blood pressure during the pregnancy.

Sample collection

Placentas were collected from women who delivered at Santa Clara Hospital, and they were divided into two groups: control (C) and preeclampsia (PE). Placental tissue was cut after delivery in maternal side, taking tissues around the central villus area. The sample was rinsed with saline to remove excess of maternal blood and divided in two parts. One was quickly placed in RNAlater (Qiagen, UK) and stored at -80°C for RNA analysis, and another was formalin fixed and wax embedded for immunohistochemical analysis.

Blood samples were collected preferential before delivery, prior to any medicine administration. The samples were centrifuged for 10 minutes at 2500 x g and the serum were stored at -20°C until the electrolytic analysis.

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from placenta tissues using TRIzol reagent (Invitrogen, California, USA). RNA concentration was verified spectrophotometrically using the BioSpec-nano (Shimadzu Corporation, Japan); all the samples had an A260/A280 ratio between 1,21-2,09 and were stored at -20°C. RNA (1 ug) was then reverse transcribed using the GoScript Reverse Transcription System kit containing a mix of random primers and oligo dT (Promega, USA) in a gradient thermocycler. The conditions used to generate first-strand cDNA were 42°C (60 minutes) and 70°C (15 minutes).

Channel selection

Using the NCBI Gene database, we looked for the most expressed potassium channels in placenta, mainly among the Kir and KCa families. When compared to the others potassium channels, the most expressed at the placenta tissue were the genes KCNJ2 (Kir 2.1), KCNJ5 (Kir 3.4), KCNJ8 (Kir 6.1) and gene KCNN4 (KCa 3.1). Using the FASTA sequences, specific primers to each potassium channel were designed using the IDT Integrated DNA technologies tool. The specific sequences ordered were:

Kir2.1 - Forward 5-GAA GAG TAA AGT CCA CAC CCG-3

Kir2.1 - Reverse 5-GTG AAG ATG TCT GCG AGG TAC-3

Kir3.4 - Forward 5-TCC TGC ATA CAA ACC ACT CAG-3

Kir3.4 - Reverse 5-TGA CCC CAT CTT AAA CCA CG-3

Kir6.1 - Forward 5-AGT TCA TTC GCT TTG TCT GT-3

Kir6.1 - Reverse 5-AGA AGT GAG ATG CTG AAG GA-3

Kca3.1 - Forward 5-ACC TCC AGC TCT CAG TTA CA-3

Kca3.1 - Reverse 5-ATG GTG TCC TCT TTG TTG TC-3

Quantitative PCR

Quantitative real-time PCR (qRT–PCR) was performed using a StepOne Plus System (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) and GoTaq qPCR Master Mix (Promega, USA). After an initial denaturation step at 95°C for 10 min, amplification was performed in 50 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 40 s and extension at 72°C for 40 s. Amplification was followed by a melting curve analysis to confirm PCR product specificity. Water was used as negative controls in every amplification. All samples, conducted in duplicate, were analysed with the comparative CT method to express the genes' quantification. The experimental Ct was calculated using the algorithm enhancements provided by the equipment. The mRNA expression level of each sample was normalized to the housekeeping gene YAWHZ mRNA, chosen as explained below.

Housekeeping gene

Candidate housekeeping genes were selected from those most commonly used in the literature (15–21). Tests were performed among the HPRT1, TBP, SDHA, GAPDH, B-Actin, and YAWHZ genes.

Analysis of gene expression stability was performed using NormFinder (an application for Microsoft Excel). The program estimates both the intra- and the inter-group expression variation and calculates candidate gene stability values (22). The expression of candidate housekeeping genes was calculated from the formula 2^{-Ct} , transforming the logarithmic Ct data to a linear value (23).

NormFinder shows the candidates stability values and which has the smallest stability value is the most stably expressed gene (22,23).

Immunohistochemistry

Samples fixed in 10% formalin were processed and included in paraffin blocks. Sections (4 µm) were heated in a water bath in tris buffer (pH 9.0) for 1h at 98°C for antigen retrieval. Endogenous peroxidase was blocked using 3% H₂O₂ solution in three methanol baths for 10 min each. Protein blocking to avoid non-specific binding was performed with BSA diluted 1% in PBS for 1 h. IHC was performed on tissue histological sections using the specific antibodies: rabbit anti-human KCNN4 polyclonal antibody (CSB-PA012086ESR2HU, Cusabio Technology LLC) diluted 1:100 (2 µg/mL); rabbit anti-human KCNJ2 polyclonal antibody (CSB-PA003099, Cusabio Technology LLC) diluted 1:100 (2 µg/mL); rabbit anti-human KCNJ5: polyclonal antibody (AF9102, Affinity Biosciences) diluted 1:100 (2 µg/mL); rabbit anti-human KCNJ8 polyclonal antibody (DF9263, Affinity Biosciences) diluted 1:50 (2 µg/mL). Following the overnight incubation, samples were incubated with a goat anti-rabbit or anti-mouse secondary antibody (Dako). The reaction was visualized using DAB chromogen (Liquid Dab, K3468, Dako), for 5 min, according to the manufacturer's recommendations, followed by counter-staining with Harris hematoxylin. An evaluation of each histological slide was made, and four images of each slide were captured using an EVOS FI Auto 2 microscope (Thermo Fischer Scientific) and analysed using the ImageJ (ImageJ v1.53a; National Institute of Health). The captured images were submitted to the deconvolution analytical procedure (Ruifrok and Johnston, 2001). The final intensity of the DAB was calculated according to the formula: $f =$

255 - i, where f = final intensity of DAB and i = mean intensity of DAB obtained by the software. The intensity of DAB ranged from 0 (white, no expression) to 255 (dark brown, high expression).

Serum analysis

The samples were centrifuged for 10 minutes at 2500 x *g* and the serum were stored at -20°C until the electrolytic analysis. The analysis of Potassium, Sodium, and Calcium were performed using the ABL835 flex blood gas analyser (Radiometer, California, USA).

Statistical analysis

Significance index adopted was $p < 0.05$ in all statistical analyses. The data were analysed for correlations using Chi-square and Mann-Whitney test performed with SPSS 19.0 computational statistical package for Windows. (IBM SPSS, Armonk, NY, USA)

Results

Prior to delivery, 89 women over 18 years of age attending at the Santa Clara Hospital Obstetric Centre were recruited to participate in this research by signing the informed consent form. Of these women, 67 placentas were collected immediately after delivery. Some clinical characteristics and the condition of babies at birth were briefly assessed and reported at table 1.

Table 1: Clinical characteristics of the subjects, babies, and placenta.

Parameter	Control group	PE group	p-value
Age (years)	27.5 (SD=5.057)	26.92 (SD=7.670)	0.739
Gestational age (weeks)	39.04 (SD= 1.55)	36.19 (SD= 3.40)	0.000
Allergy	19.00% (8)	8% (2)	0.300
Smoker	7.10% (3)	0% (0)	0.326
Ex-smoker	11.90% (5)	8% (2)	0.24
Other drugs	4.80% (2)	4% (1)	1.000
Alcohol	11.90% (5)	4% (1)	0.459
Diabetes before pregnancy	0.00% (0)	8% (2)	0.136
Screened for diabetes	26.20% (11)	12% (3)	0.222
Continuous medications	14.30% (6)	36% (9)	0.079
Oxytocin in labor	45.2% (19)	24% (6)	0.140
Magnesium sulphate	-	80% (20)	
BD: Temperature (°C)	36.197 (SD= 0.51)	36.309(SD=0.45)	0.391
BD: RF	20.18 (SD= 1.23)	20.09 (SD= 1.95)	0.812
BD: CF	85.05 (SD=14.35)	89.61 (SD=18.84)	0.290
BD: SBP (mmHg)	118.37 (SD=13.70)	138.74 (SD=17.27)	0.000
BD: DBP (mmHg)	69.82 (SD=9.65)	77.04 (SD=12.935)	0.016
AD: Temperature (°C)	36.21 (SD=0.56)	36.02 (SD=0.67)	0.227
AD: RF	19.56 (SD=0.867)	20.04 (SD=1.899)	0.251
AD: CF	79.05 (SD=11.71)	85.25 (SD=15.14)	0.070
AD: SBP (mmHg)	117.68 (SD=16.25)	119.46 (SD=25.84)	0.735

AD: DBP (mmHg)	66.93 (SD=11.94)	68.08 (SD=10.38)	0.694
Sex baby			0.801
Male	50% (21)	56% (14)	
Female	50% (21)	44% (11)	
Birth Conditions			0.054
Vigorous newborn	95.2% (40)	76% (19)	
Hypotonic newborn	4.8% (2)	20% (5)	
Extreme Prematurity	0% (0)	4% (1)	
Apgar 1'	8.48 (SD= 1.018)	7.92 (SD=1.681)	0.096
Apgar 5'	9.02 (SD=0.269)	8.92 (SD= 1.681)	0.563
Baby weight (g)	3224.4 (SD= 304.84)	2884.0 (SD= 985.50)	0.300
Placenta weight (g)	584.56 (SD= 105.84)	573.67 (SD=219.04)	0.821

BD: Before Delivery; AD: After Delivery; RF: respiratory frequency; CF: cardiac frequency; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; SD: standard deviation; g: grams.

The results of PCR cycle threshold were converted to analyse the genes expression of specific potassium channels KCa 3.1, Kir 2.1, Kir 3.4 and Kir 6.1. Specific genes expression was compared between the Control and PE groups. The results are listed at Table 2 and Figure 1, which show the gene expression. The protein expression of the potassium channels was analysed using the immunohistochemical techniques. The images captured in each histological slide were analysed and compared between groups (Figure 2 and Table 2).

Table 2: Specific gene and protein expression.

	Gene expression			Protein expression		
	Control group	PE group	p-value	Control group	PE group	p-value
KCa 3.1	4.17 (SD= 6.78)	6.87 (SD=6.75)	0.010	71.44 (SD= 8.09)	69.88 (SD=6.55)	0.636
Kir 2.1	2.20 (SD= 2.39)	2.05 (SD= 2.09)	0.756	47.80 (SD= 5.21)	51.04 (SD= 7.71)	0.038
Kir 3.4	2.33 (SD= 3.06)	2.18 (SD= 2.32)	0.658	70.99 (SD= 6.79)	64.82 (SD= 6.81)	0.001
Kir 6.1	2.87 (SD= 4.20)	3.29 (SD= 3.10)	0.061	50.38 (SD= 12.14)	40.60 (SD= 8.02)	0.001

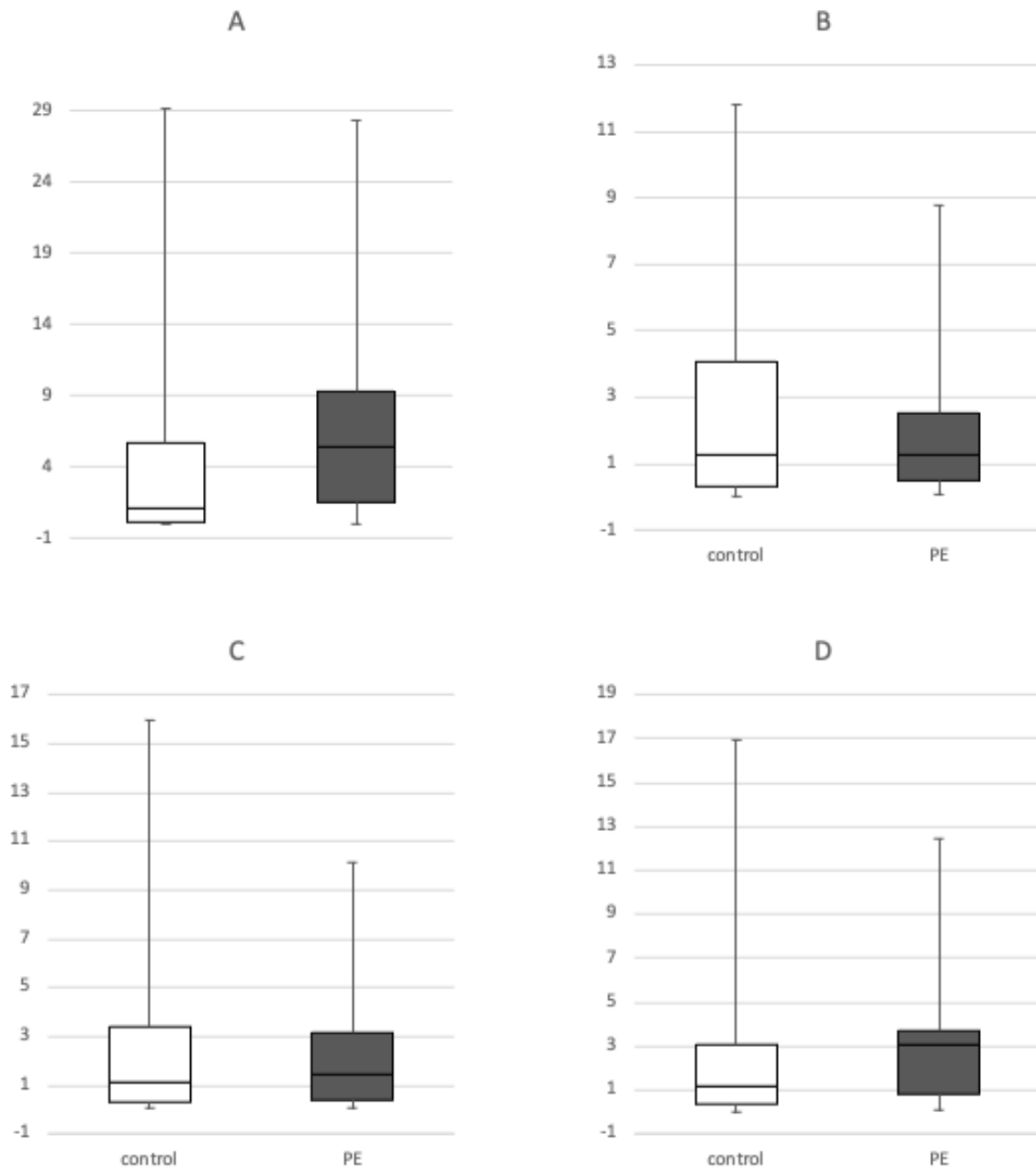


Figure 1: Gene expression of potassium channels in placentas of preeclampsia (PE) and normotensive women (control group). The graphs show the median and interquartile range of PE (n = 25) and Control (n = 41) of the relative gene expression of (A) Kca 3.1, (B) Kir2.1, (C) Kir 3.4 and (D) Kir 6.1. Mann-Whitney U test, $p < 0.05$.

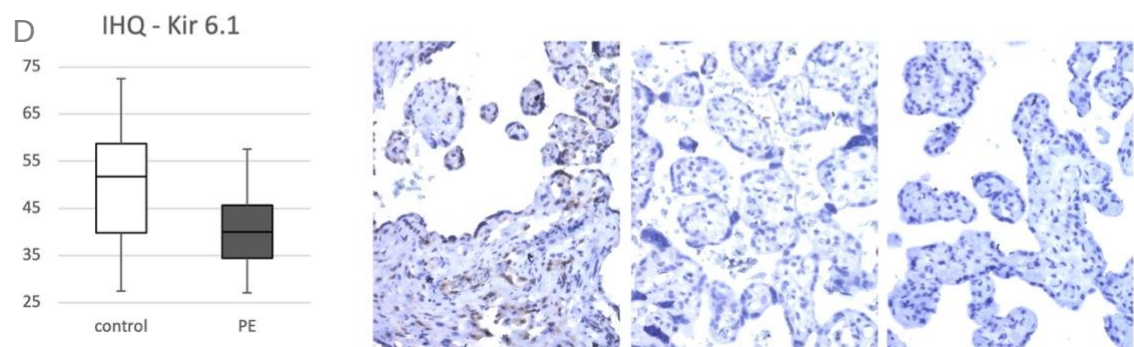
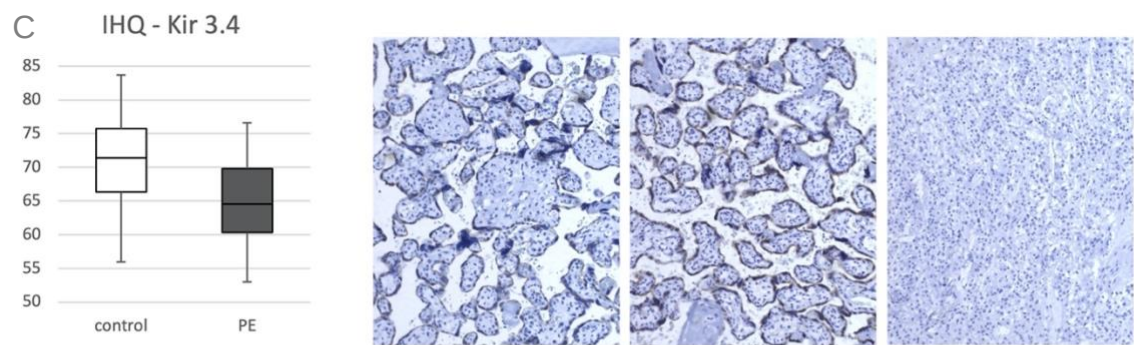
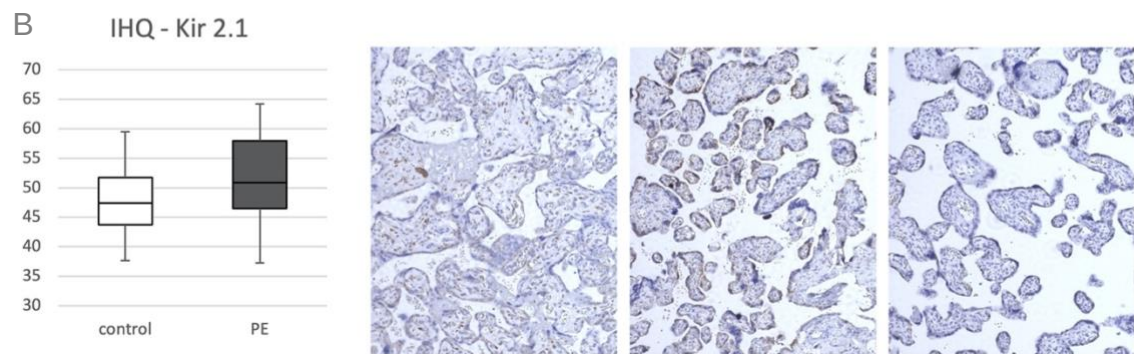
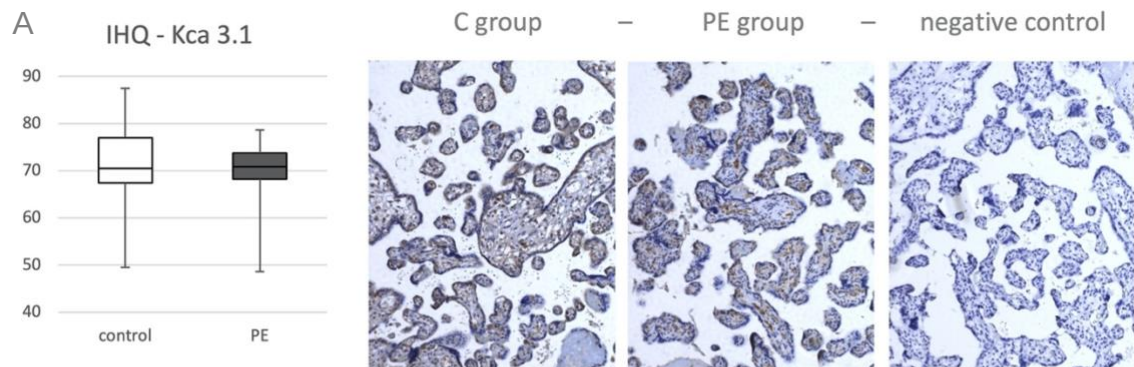


Figure 2: IHC detection of potassium channels in placentas of preeclampsia women (PE) and normotensive (control group). Each histological slide was analysed using the ImageJ software. Intensity of DAB stain (brown areas) was generated by image deconvolution. The graphs show the median and interquartile range of PE (n = 25) and Control (n = 42) of protein expression of (A) KCa 3.1, (B) Kir 2.1, (C) Kir 3.4 and (D) Kir 6.1. Mann-Whitney U test, $p < 0.05$. Each channel also has representative images of negative control, PE and control groups.

A blood sample was collected prior to delivery to measure the serum electrolytic levels at the pregnancy stage using the selective electrode-ion technique. Serum values of Sodium, Potassium and ionic Calcium are expressed at Table and Figure 3.

Table 3: serum electrolytic levels compared between groups.

Parameters (mEq/L) Median (P25 – P75)	Control Group	PE Group	p-value
Sodium	137.0 (135.3 – 138.0)	138.0 (135.5 – 139.0)	0.221
Potassium	4.0 (3.7 – 4.3)	4.0 (3.8 – 4.2)	0.674
Ionic Calcium	3.9 (3.7 – 4.2)	3.8 (3.4 – 4.1)	0.046

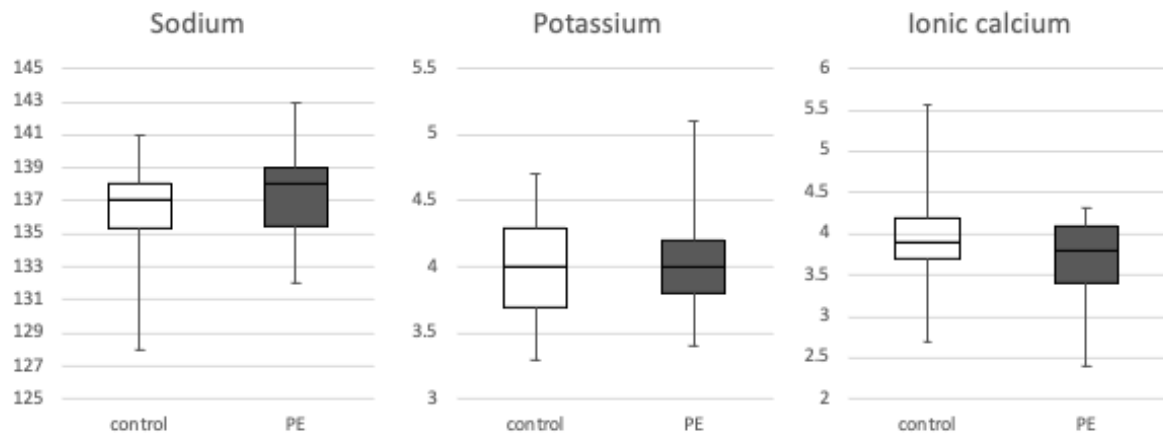


Figure 3: Serum electrolytic levels in blood sample of preeclampsia women (PE) and normotensive (control group). The graphs show the median and interquartile range of PE (n = 25) and Control (n = 41) of (A) Ion Sodium (B) Ion Potassium (C) Ionic Calcium. Mann-Whitney U test, $p < 0.05$.

Discussion

Potassium channels play a crucial role in maintaining membrane potential. Inhibition of potassium channels causes membrane depolarization and then contraction of smooth muscles, while the activation leads to membrane hyperpolarization and subsequently, relaxation (12,13). The inward-rectifier potassium channels (Kir) is a ubiquitous channel that is expressed in many tissues. The Kir are characterized by the internal rectification property, which is described as the ability to allow large internal currents and smaller external currents. They are responsible for regulating several processes, including cellular excitability, vascular tone, heart rate, renal salt flow, and insulin release. Kir channels are important in maintaining the membrane potential at rest and in controlling excitability (24–27). There are seven Kir channel subfamilies that can

be classified into four functional groups: classical Kir channels (Kir2.x) are constitutively active, G protein-gated Kir channels (Kir3.x) are regulated by G protein-coupled receptors, ATP-sensitive K⁺ channels (Kir6.x) are tightly linked to cellular metabolism, and K⁺ transport channels (Kir1.x, Kir4.x, Kir5.x, and Kir7.x). The channels of family Kir 2.x are constitutively active and exhibit strong inward rectification. They contribute to the establishment of highly negative resting membrane potential and long-lasting action potential plateau in various cells. The G Protein-Gated Kir Channels (Kir3.x) can be activated by intracellular GTP (GTPi) in the presence of agonist or by intracellular GTPγS even in the absence of agonist. This can occur in cell-free, inside-out membrane patches in a “membrane-delimited” manner, suggesting that channel opening is triggered by membrane-bound G proteins. K_{ATP} channels were first identified in cardiac myocytes. They are also found in pancreatic β-cells, skeletal muscle, vascular smooth muscle, and neurons. In the inside-out membrane patch, K_{ATP} channels open spontaneously. Thus, the K_{ATP} channels should be classified together with the classical Kir2.x channels that have constitutive activities. The channels were proposed to be associated with cellular metabolism and membrane electrophysiology (28). Kir channels promote vasodilatation in response to hypoxia, so Zhu and colleagues have proposed that an enhanced uterine vascular tone during pregnancy mediated by hypoxia could occur by the inhibition of Kir channels through protein kinase C (PKC) (29). We observed lower protein levels of two types of Kir channels in the placenta from PE group, Kir 3.4 and Kir 6.1, while Kir 2.1 was expressed in higher levels, compared to control group. Thus, this prevalent lower expression could be related to an increasing in the vascular tone of the placental vessels in preeclampsia.

The other channel type explored in this study was the KCa. Ion calcium enters the cell through a voltage-independent Calcium channel, increasing the intracellular Calcium concentration. Calcium acts as an intracellular second messenger and it is involved in skeletal muscle contraction, excitation-contraction coupling in cardiac and smooth muscle, and activation of protein kinases and enzyme phosphorylation (30,31). Once the opening of KCa channel is dependent on the calcium ion, the increase of intracellular calcium concentration causes the KCa opening, leading to a K⁺ efflux, and, hence, to a hyperpolarization of the cell membrane. Therefore, KCa 3.1 downregulation might lead to the increased blood pressure, through increased vascular tonus, and impaired placental angiogenesis that are observed in preeclampsia (32,33). Also, the reduced amount of calcium present in the cell affects the opening of the channels and their functionality (34). We didn't observe differences in protein expression of the KCa 3.1 channels between PE and control group placenta samples; however, the gene expression was higher in the PE group. We could hypothesize that the gene expression could be induced in the placenta of PE patients in response to a stimulus for the increased of KCa expression, in an attempt to reduce the vascular tonus, and, hence, reduce blood pressure, in a homeostatic regulation mechanism.

Additionally, the cytosolic calcium levels are directly affected by serum calcium levels, with the cytosolic ionized calcium concentration being maintained within the micromolar range (< 1/1000 of the serum concentration) (35–37). The serum electrolytic analysis showed that ionic calcium levels are lower at PE group, but within the considered normal range. Nonetheless, each minimal variation in the electrolyte levels could affect the gene expression regulation, but it will not

necessarily be reflected in an increase in protein levels, once the cells have many post-transcription regulation mechanisms.

According to Choi (2013 and 2019), endothelial dysfunction is associated with KCa 3.1.3 dysfunction and contributes to the development of hypertension in preeclampsia. The endocytosis and transportation processes of KCa 3.1 may be accelerated via superoxide-mediated pathways in preeclampsia, which contributes to the increased levels of gene expression of this channel in an attempt to compensate for the greater internalization and degradation of the KCa protein in preeclampsia (31,32,38).

Under physiological conditions, the ability of potassium channels to respond to depolarization induced by pressure and vasoactive molecules helps maintain the balance between vasoconstriction and relaxation of small arteries. Changes in the function of these channels have been associated with a variety of diseases that affect the vasculature, including preeclampsia. The differences, in this case, may be related to different experimental conditions, use of cells from different vascular beds or degree of disease in which the experiments were carried out. Regardless of the cause, this indicates that a single mechanism is not responsible for all the remodelling in potassium channel function during a pathological condition. Given the diverse population of potassium channels in small artery vascular smooth muscle, additional approaches are needed to discover and integrate the specific contribution of each subunit to the regulation of membrane potential and vascular tone. Future studies should also address in more detail the differences in potassium channel function between different vascular beds in the same individual. A better understanding of how inflammation and oxidative stress, which are common processes in many diseases, affect the activity of

these channels in native cells is also needed. Therefore, more research is needed to fully assess the regulatory mechanisms underlying the altered activities of these channels in preeclampsia and (28) these channels appear to be great targets for future studies looking for the pathogenesis and therapeutics of preeclampsia.

1. Verdonk K, Visser W, Van Den Meiracker AH, Danser AHJ. The renin-angiotensin-aldosterone system in pre-eclampsia: The delicate balance between good and bad. *Clin Sci*. 2014.
2. De Jesus GR, De Jesus NR, Dos Santos FC, Oliveira CS, Levy RA, Pôrto LCDMS, et al. Fatores angiogênicos e antiangiogênicos na fisiopatologia da pré-eclâmpsia e seu uso na prática obstétrica atual. *Rev Hosp Univ Pedro Ernesto*. 2014;13(3).
3. Robillard PY, Dekker G, Iacobelli S, Chaouat G. An essay of reflection: Why does preeclampsia exist in humans, and why are there such huge geographical differences in epidemiology? *J Reprod Immunol*. 2016.
4. Robillard PY, Dekker G, Chaouat G, Scioscia M, Iacobelli S, Hulsey TC. Historical evolution of ideas on eclampsia/preeclampsia: A proposed optimistic view of preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2017 Sep 1;123:72–7.
5. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. Vol. 308, *Science*. 2005. p. 1589–94.
6. C.Weel I, Romão-Veiga M, Matias ML, Fioratti EG, Peraçoli JC, Borges VT, et al. Increased expression of NLRP3 inflammasome in placentas from pregnant women with severe preeclampsia. *J Reprod Immunol* [Internet]. 2017;123(January):40–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2017.09.002>.
7. Roberts JM, Escudero C. The placenta in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2012;2(2):72–83.
8. Cheng S Bin, Sharma S. Preeclampsia and health risks later in life: an immunological link. Vol. 38, *Seminars in Immunopathology*. Springer Verlag; 2016. p. 699–708.
9. Myatt L. Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine*. 2002;19(1):103–11.
10. Campbell WB, Gauthier KM. Inducible Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor (iEDHF): Role of the 15-Lipoxygenase-EDHF Pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014;61(3):176–87.

11. Dogan MF, Yildiz O, Arslan SO, Ulusoy KG. Potassium channels in vascular smooth muscle: a pathophysiological and pharmacological perspective. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 2019.
12. Rajkovic J, Djokic V, Gostimirovic M, Gojkovic-Bukarica L, Martorell M, Sharifi-Rad J, et al. Potassium channels on smooth muscle as a molecular target for plant-derived Resveratrol. *Cell Mol Biol*. 2020.
13. Lorigo M, Oliveira N, Cairrao E. Clinical Importance of the Human Umbilical Artery Potassium Channels. *Cells*. 2020.
14. American College of Obstetricians, Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. In: *Obstetrics and gynecology*. 2013.
15. De Sousa ARS, Staff AC, Johnsen GM, Weedon-Fekjær MS, Størvold GL. Evaluation of four commonly used normalizer genes for the study of decidual gene expression. *Placenta*. 2016.
16. Li Y, Lu H, Ji Y, Wu S, Yang Y. Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in placental tissues from intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Placenta*. 2016.
17. Li Y, Ye F, Hu Y, Lu WG, Xie X. Identification of suitable reference genes for gene expression studies of human serous ovarian cancer by real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 2009.
18. Carnahan MN, Veazey KJ, Muller D, Tingling JD, Miranda RC, Golding MC. Identification of cell-specific patterns of reference gene stability in quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction studies of embryonic, placental and neural stem models of prenatal ethanol exposure. *Alcohol*. 2013.
19. Steinhäuser CB, Wing TT, Gao H, Li X, Burghardt RC, Wu G, et al. Identification of appropriate reference genes for qPCR analyses of placental expression of SLC7A3 and induction of SLC5A1 in porcine endometrium. *Placenta*. 2017.
20. Vega-Sanchez R, Arenas-Hernandez M, Vazquez-Perez JA, Moreno-Valencia Y, Gomez-Lopez N. Evaluation of reference genes for expression studies in leukocytes from term human pregnancy. *Placenta*. 2015.
21. Fu J, Bian L, Zhao L, Dong Z, Gao X, Luan H, et al. Identification of genes for normalization of quantitative real-time PCR data in ovarian tissues. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2010.
22. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time

quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004.

23. Moura AC de, Lazzari VM, Agnes G, Almeida S, Giovenardi M, Veiga ABG da. Transcriptional expression study in the central nervous system of rats: what gene should be used as internal control? *Einstein (Sao Paulo)*. 2014;12(3):336–41.
24. Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, et al. International union of pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev.* 2005;57(4):509–26.
25. Riquelme G, De Gregorio N, Vallejos C, Berrios M, Morales B. Differential expression of potassium channels in placentas from normal and pathological pregnancies: Targeting of the Kir 2.1 channel to lipid rafts. *J Membr Biol.* 2012.
26. Raychaudhuri SK, Wulff H, Raychaudhuri SP. KCa3.1^{-/-} Mice Do Not Develop CIA: Regulatory Role for KCa3.1 in Autoimmune Arthritis. *Journal of Cellular Physiology.* 2016.
27. Ohya S, Kito H. Ca²⁺-activated K⁺ channel KCa3.1 as a therapeutic target for immune disorders. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2018.
28. Hibino H, Nanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev.* 2010;90(1):291–366.
29. Zhu R, Xiao D, Zhang L. Potassium Channels and Uterine Vascular Adaptation to Pregnancy and Chronic Hypoxia. *Curr Vasc Pharmacol.* 2013;11(5).
30. Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JCP. Rheological and Physiological Consequences of Conversion of the Maternal Spiral Arteries for Uteroplacental Blood Flow during Human Pregnancy. *Placenta.* 2009.
31. Li F, Xie Y, He M, Fan Y, Yang M, Wang S, et al. IKCa and SKCa might participate in preeclampsia through regulating placental angiogenesis. *Pregnancy Hypertens.* 2020.
32. Choi S, Kim JA, Na HY, Kim JE, Park S, Han KH, et al. NADPH oxidase 2-derived superoxide downregulates endothelial KCa3.1 in preeclampsia. *Free Radic Biol Med [Internet]*. 2013;57:10–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.009>.
33. Köhler R, Kaistha BP, Wulff H. Vascular KCa-channels as therapeutic targets in hypertension and restenosis disease. *Expert Opinion on*

Therapeutic Targets. 2010.

34. Li F, He M, Xie Y, Wu Y, Yang M, Fan Y, et al. Involvement of dysregulated IKCa and SKCa channels in preeclampsia. *Placenta* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2019 Nov 8];58:9–16. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143400417310093?via%3Dihub>
35. Grgic I, Eichler I, Heinau P, Si H, Brakemeier S, Hoyer J, et al. Selective blockade of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel suppresses proliferation of microvascular and macrovascular endothelial cells and angiogenesis in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005.
36. Brähler S, Kaistha A, Schmidt VJ, Wölfl SE, Busch C, Kaistha BP, et al. Genetic deficit of SK3 and IK1 channels disrupts the endothelium-derived hyperpolarizing factor vasodilator pathway and causes hypertension. *Circulation*. 2009.
37. Li F fan, He M zhou, Xie Y, Wu Y yuan, Yang M tao, Fan Y, et al. Involvement of dysregulated IKCa and SKCa channels in preeclampsia. *Placenta*. 2017;58:9–16.
38. Choi S, Kim JA, Oh S, Park MH, Cho GJ, Suh SH. Internalization and Transportation of Endothelial Cell Surface KCa2.3 and KCa3.1 in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Oxid Med Cell Longev*. 2019.

5. CONCLUSÕES

As análises comparativas entre o grupo de gestantes normotensas e de pré-eclâmpsia não puderam ser estratificadas em níveis de pré-eclâmpsia leve e grave devido ao baixo índice de manifestação grave durante o período do estudo, apesar disso, a avaliação gênica e proteica dos canais de potássio analisados nesse estudo nos mostra que a expressão proteica dos canais Kir 3.4 e Kir 6.1 nos tecidos placentários se apresentou significativamente diminuída enquanto a expressão gênica do KCa 3.1 está elevada na situação clínica da pré-eclâmpsia.

Entre os canais avaliados, os resultados apontam o KCa como um alvo para estudos futuros em busca da patogênese e possível terapêutica da pré-eclâmpsia, visto sua grande importância na regulação da pressão arterial e presença levemente diminuída nas gestantes com pré-eclâmpsia, mesmo com um aumento da expressão gênica.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Inicialmente o projeto previa a realização do isolamento e cultivo celular das artérias espiraladas para a realização de análises eletrofisiológicas. Ao iniciar a parte prática e coleta das amostras, percebemos que seria inviável isolar células de artérias espiraladas a partir da placenta, visto que este tipo celular estaria presente quase que exclusivamente no leito placentário. Para coletar amostra do leito placentário, seria necessário proceder com uma biópsia da parede uterina. Como esse procedimento seria mais invasivo e sem indicação clínica para o momento do parto, optamos por desenvolver os outros pontos do projeto e deixar esse suspenso, com possibilidade da técnica ser desenvolvida em outro projeto, passando por nova aprovação nos comitês de ética pertinentes.

Como as análises celulares não poderiam ser realizadas, pensamos em agregar uma nova técnica ao projeto, avaliando a presença de metabólitos do ácido araquidônico já descritos como fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF). Essa análise seria de grande valor ao projeto pois alguns estudos estimam que esses EDHFs que podem atuar de maneira induzida aparentam estar ausentes na pré-eclâmpsia. Para essas análises seria necessário o uso da técnica de HPLC, e mesmo com o equipamento a disposição nos laboratórios da Universidade, o custo para a realização da técnica ficou extremamente alto, visto que o projeto não possuía nenhum tipo de financiamento para a aquisição das colunas e dos reagentes necessários. No entanto, este objetivo continua em aberto no projeto e, tão logo houver verba

disponível para compra de insumos, procederemos com as avaliações dos EDHFs.

7. ANEXOS

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do papel dos canais de potássio na fisiopatologia da pré-eclâmpsia.

Pesquisador: Gisele Branchini

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 80436817.9.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.452.746

Apresentação do Projeto:

Durante a gestação, o corpo feminino passa por diversas mudanças, tanto físicas como hormonais, para abrigar o feto que se desenvolverá e formará um novo ser. Dentre essas mudanças que ocorrem com o corpo feminino estão alterações no sistema cardiovascular. A gravidez, em seu estado normal, já representa um período de estresse fisiológico ao corpo humano, e quando estas mudanças fisiológicas não ocorrem como deveriam algumas gestantes acabam apresentando certas desordens que levam a uma má perfusão sanguínea, como o exemplo da pré-eclâmpsia que é uma das principais causas de morbimortalidade materna e perinatal, parto pré-maturo e restrição do crescimento intrauterino. A condição clínica da pré-eclâmpsia predispõe a gestante à uma situação bem delicada uma vez que, apesar das pesquisas, permanece enigmática e sem um tratamento específico. Apesar da etiologia da pré-eclâmpsia não estar bem definida, ela está primariamente associada à presença da placenta e a diminuição da perfusão desta, principalmente devido a uma má formação das artérias espiraladas maternas e ao aumento da resistência vascular. A placenta é um órgão que começa a se desenvolver juntamente com o feto e é expulsa do útero logo após o parto. Para a correta formação estrutural

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 2.452.746

da placenta é necessário que os vasos sanguíneos maternos sejam remodelados. As artérias espiraladas - inicialmente pequenas - são invadidas por células trofoblásticas e começam a ter suas porções distais dilatadas, perdendo as células endoteliais e as células musculares lisas, restando apenas uma estrutura flácida que está ligada no espaço intervilo. Na gestação normal, as porções arteriais que sofrem essas modificações se tornam incapazes de responder aos estímulos para vasoconstrição, entretanto essas mudanças não ocorrem adequadamente na pré-eclâmpsia, causando um aumento da resistência vascular e consequente hipertensão arterial. Ainda que a maioria das gestantes consegue um bom desfecho clínico após a placenta ser retirada e o equilíbrio fisiológico ser restaurado, o atraso no diagnóstico da síndrome pode favorecer a evolução para a eclâmpsia (caracterizada por convulsões) além de predispor essas mulheres a um risco extremamente elevado de desenvolver outros problemas cardiovasculares durante a vida. Como o único tratamento definitivo para a pré-eclâmpsia é a retirada do feto - ou mais precisamente da placenta - muitas vezes de forma precoce e prematura, as terapias atuais visam evitar a morbimortalidade materna e perinatal tratando a sintomatologia apresentada, sem a existência de um medicamento anti-hipertensivo de escolha para tratamento das gestantes pré-eclâmpicas. Toda esta resistência e alteração cardiovascular que caracteriza a gestação e principalmente a pré-eclâmpsia nos leva a observar mais cuidadosamente os fatores fisiológicos que regulam a pressão arterial neste seletivo grupo como por exemplo a presença de fatores angiogênicos e anti-angiogênicos, a ação e regulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, e a manutenção do tônus vascular. Em relação à regulação do tônus vascular os fatores derivados do endotélio merecem destaque. Eles são um grupo de diferentes fatores que de modo geral promovem o aumento na concentração intracelular de cálcio, abertura dos canais de potássio ativados por cálcio (KCa) e dos canais de potássio corretores do fluxo de internalização (Kir), hiperpolarização celular e relaxamento da musculatura vascular. O projeto tem como objetivo avaliar o papel dos canais de potássio na fisiopatologia da pré-eclâmpsia leve e de pré-eclâmpsia grave, comparada à gravidez

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 2.452.746

normotensa. Para tanto será analisada a expressão gênica e proteica de canais de potássio ativados por cálcio (KCa) e canais de potássio corretores do fluxo de internalização (Kir) nos tecidos placentários, mensurado os níveis de potássio sérico das pacientes, mensurados os níveis dos fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF): ácido 15-hidroxi-11,12-epoxieicosatrienóico (15-H-11,12-EETA) e ácido 11,12,15-trihidroieicosatrienóico (11,12,15-THETA) no soro e no tecido placentário das pacientes; serão isoladas e cultivadas células arteriais musculares lisas e células endoteliais placentárias, analisando a expressão gênica e proteica de canais de potássio cálcio-ativados (KCa) e canais de potássio corretores do fluxo de internalização (Kir) nessas células, avaliando a alteração do potencial elétrico das células em resposta ao tratamento com sulfato de magnésio e nifedipina, comparando as respostas das células provenientes dos três grupos experimentais. Trata-se de um estudo transversal comparativo e um estudo experimental in vitro. As placentas serão oriundas de mulheres com idade superior a 18 anos, em atendimento obstétrico para parto no Serviço de Obstetrícia do Hospital Santa Clara, parte do Complexo Hospitalar da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA) que concordarem em assinar o TCLE. Serão realizadas análises da expressão gênica dos canais de potássio das placentas de mulheres portadoras de pré-eclâmpsia e normotensas. Será avaliada expressão e localização proteica pela técnica de Western Blot. Para avaliação da localização celular dos canais em estudo, será realizada a técnica de imuno-histoquímica. O potássio sérico será dosado do soro e mensurado a partir da técnica de eletrodo íonseletivo. A dosagem sérica dos fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio será realizada por cromatografia gasosa associada a espectrofotometria de massa (GC/MS). Serão isoladas e cultivadas células endoteliais placentárias e células arteriais musculares lisas. As células em cultivo serão submetidas à extração de RNA e proteínas de modo a verificar a expressão gênica e proteica dos canais de potássio nos diferentes tipos celulares, conforme as técnicas descritas acima. Além disso, as células receberão tratamento com sulfato de magnésio e nifedipina, em doses

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 2.452.746

e tempos a serem padronizados, e terão seu potencial elétrico mensurado, de modo a comparar a resposta das células de cada grupo experimental.

A descrição da amostra será realizada através da estatística descritiva. A normalidade das variáveis será avaliada através do teste Shapiro-Wilk. A

comparação das variáveis quantitativas será pela análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas com post-hoc de Bonferroni para

comparação intragrupos. E na comparação intergrupos através do teste t de Student para amostras pareadas. Caso as variáveis em estudo não

apresentem distribuição normal, serão utilizados os testes estatísticos não paramétricos correspondentes. O índice de significância adotado será de

$p < 0,05$ em todas as comparações. Os dados serão analisados pelo pacote estatístico computacional SPSS para Windows, versão 18.0.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o papel dos canais de potássio na fisiopatologia da pré-eclâmpsia leve e de pré-eclâmpsia grave, comparada à gravidez normotensa.

Objetivo Secundário:

-Analisar a expressão gênica e proteica de canais de potássio ativados por cálcio (KCa) e canais de potássio corretores do fluxo de internalização (Kir) nos tecidos placentários;

-Dosar os níveis de potássio sérico das pacientes;

-Mensurar os níveis dos fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF): ácido 15-hidroxi-11,12-epoxieicosatrienóico (15-H-11,12-EETA) e ácido 11,12,15-trihidroieicosatrienóico (11,12,15-THETA) no soro e no tecido placentário das pacientes;

-Associar os dados de expressão dos canais com os diferentes graus de pré-eclâmpsia e com os níveis séricos de potássio e dos fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio;-Isolar e cultivar células arteriais musculares lisas e células endoteliais placentárias;

-Analisar a expressão gênica e proteica de canais de potássio cálcio-ativados (KCa) e canais de potássio corretores do fluxo de internalização (Kir) nas células em cultivo;

-Avaliar a alteração do potencial elétrico das células em resposta ao tratamento com sulfato de magnésio e nifedipina, comparando as respostas das células provenientes dos três grupos experimentais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 2.452.746

Os riscos decorrentes da participação no projeto são moderados. O sangue será retirado por um profissional especializado. Pode ocorrer a formação de um hematoma temporário devido à coleta de sangue. A equipe irá indicar medidas preventivas para que não ocorra a formação do hematoma. Caso ocorra, será indicada uma orientação médica para agilizar o processo de melhora do hematoma. O profissional que estará acompanhando as pacientes estará treinado e habilitado para fornecer informações referentes à pesquisa. Os resultados serão divulgados de maneira agrupada, sem a identificação dos indivíduos que participam do estudo.

Benefícios:

No futuro, essas características que estão sendo estudadas poderão auxiliar no melhor entendimento do desenvolvimento da pré-eclâmpsia e facilitar o diagnóstico e tratamento desta doença. Em relação aos resultados das análises feitas nas amostras de sangue e dos tecidos coletados, eles não trarão benefícios diretos para as participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo transversal comparativo e experimental in vitro

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos apresentados de modo adequado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nada a declarar.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1037544.pdf	22/11/2017 00:55:37		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_preeclampsia.pdf	22/11/2017 00:54:25	Gisele Branchini	Aceito
Outros	anuencia_servico_obstetricia.pdf	22/11/2017 00:53:35	Gisele Branchini	Aceito
Outros	anuencia_lab_fisiologia_translacional.pdf	22/11/2017 00:53:17	Gisele Branchini	Aceito
Outros	anuencia_lab_fisiologia_comport.pdf	22/11/2017	Gisele Branchini	Aceito

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 2.452.746

Outros	anuencia_lab_fisiologia_comport.pdf	00:53:00	Gisele Branchini	Aceito
Outros	anuencia_lab_biomol.pdf	22/11/2017 00:52:39	Gisele Branchini	Aceito
Outros	anuencia_lab_analisesclinicas.pdf	22/11/2017 00:52:24	Gisele Branchini	Aceito
Outros	termo_entrega_relatorios.pdf	22/11/2017 00:51:53	Gisele Branchini	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_preeclampsia.pdf	22/11/2017 00:48:31	Gisele Branchini	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	22/11/2017 00:44:51	Gisele Branchini	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 21 de Dezembro de 2017

Assinado por:

Julia Fernanda Semmelmann Pereira Lima
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br