

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL**

Relatório Final - Pós Doutorado

Participação dos canais para potássio ativados por cálcio nas respostas respiratórias, autonômicas e comportamentais ao CO₂/pH e na quimiossensibilidade dos neurônios do LC

Processo FAPESP nº 2021/13618-9

Bolsista: Dr. Luis Gustavo Alexandre Patrone
Supervisor: Profa. Dra. Luciane H. Gargaglioni Batalhão

**Campus de Jaboticabal – SP
Maio 2025**

1. Resumo do projeto

Múltiplos fatores estão envolvidos no processo de quimiossensibilidade dos neurônios do Locus coeruleus (LC), dentre eles reduções do pH extra e intracelular que resultam em um equilíbrio de ativação e inibição de canais iônicos presentes na membrana dos neurônios (Gargaglioni et al., 2010). Estudos prévios confirmaram a presença de canais para potássio ativados por Ca^{2+} intracelular (BK) em neurônios do LC (Willians et al., 1984; Sausbier et al., 2006; Imber et al., 2018), assim como, a presença de canais para Ca^{2+} , baseado no potencial membrana e suas oscilações devido a atividade do referido canal (Imber et al., 2012). No entanto, o mecanismo de limitação da resposta quimiossensível ao CO_2 por ativação de canais BK em neurônios do LC parece sofrer um processo de amadurecimento durante o período neonatal devido aos seguintes fatos: 1) uma maior ativação de canais para Ca^{2+} ocorre em neonatos com idade superior a 10 dias de vida (P10) (Imber et al., 2012); 2) a inibição de canais para Ca^{2+} em neonatos com idade inferior a P10 reduz a taxa de disparo dos neurônios do LC durante hipercapnia (Filosa et al., 2003), sugerindo que esses canais participam da via de aceleração da resposta quimiossensível durante a hipercapnia em neonatos com idade até P10; 3) o bloqueio dos canais BK durante a hipercapnia aumenta a frequência de disparo dos neurônios do LC em resposta ao CO_2 em ratos neonatos com idade acima de P10 (Imber et al., 2018). Esses resultados fortalecem a hipótese de um período de amadurecimento do mecanismo limitador da resposta quimiossensível à hipercapnia, durante o período neonatal, principalmente quando confrontados com os dados de Hartzler et al. (2007) no qual foi observado uma queda na magnitude da resposta quimiossensível em neurônios do LC após a idade P10, sugerindo assim que os canais para Ca^{2+} , assim como os canais BK, concomitantemente sofram um processo de desenvolvimento e multiplicação no período neonatal (Imber et al., 2018). Essa via limitadora (*Braking pathway*) pode representar um novo mecanismo para controlar o ganho da resposta quimiossensível dos neurônios à acidose hipercápnica e as alterações dessa via podem contribuir para condições patológicas, como apneia do sono e transtorno do pânico. Portanto, em vista das evidências expostas, a proposta deste estudo visa investigar a participação dos canais BK nas respostas respiratórias e metabólicas durante o desenvolvimento em condições normóxica normocápnica e hipercápnica em camundongos machos e fêmeas *Knockout* para o referido canal. Adicionalmente, com a finalidade de expandir os conhecimentos, estão sendo realizados testes locomoção e comportamento, bem como estudos eletrofisiológicos sobre a quimiossensibilidade ao CO_2 de neurônios do LC de camundongos mutantes para os canais BK.

2. Descrição das atividades do bolsista no projeto de pesquisa

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DO SUBPROJETO NESTE RELATÓRIO

2.1.1 Animais

O estudo foi realizado no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal. Os experimentos foram realizados com camundongos da linhagem C57BL/6 provenientes do Biotério de Roedores do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – FCAV/UNESP - Jaboticabal. Os animais permaneceram alojados em mini isoladores com maravalha limpa e enriquecimento ambiental (tocas e papéis) dentro de rack ventilada (Ventilife, Alesco, Monte Mor - SP) e à temperatura controlada de $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Foram submetidos a ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes acesas às 6 h e 30 min e apagadas às 18 h e 30 min). Os animais tiveram livre acesso a água e comida. Todos os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética local (CEUA – protocolo nº 9486/22 e 2139/23), estando em norma com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Os experimentos foram realizados com camundongos C57BL/6 machos e fêmeas nas idades P0-1, P6-7, P12-13, P30-31 (juvenil) e P80 (adultos) dias de vida, dos genótipos selvagem (WT), heterozigoto (HET) e *knockout* para o gene *Slo1* (BK^{KO}), gene responsável pela codificação dos canais BK (Meredith et al., 2004). Os animais mutantes parentais foram obtidos através do Dr. Dan Halm da *Wright State University*, Dayton, OH - EUA e os cruzamentos foram realizados no nosso biotério para estabelecimento da colônia, previamente ao início dos experimentos. Após o nascimento das ninhadas foram realizadas as coletas de material biológico, para o mapeamento genético e identificação dos animais, através da excisão de um dos dígitos no dia P0.

2.1.2 Genotipagem

O genótipo dos animais foi determinado por técnica de PCR utilizando DNA extraído do tecido da cauda e/ou das falanges dos animais, previamente coletadas para identificação dos mesmos no dia do nascimento (P0). Os primers utilizados para o camundongo *Slo*^{-/-} foram: banda KO - Neo 5' – 5' ATA GCC TGA AGA ACG AGA TCA GC 3', e RA 14025 3' – 5' CCT CAA GAA GGG GAC TCT AAA 3', e para a banda WT: Exon1 5'-3 – 5' TTC ATC ATC TTG CTC TGG CGG ACG 3', e WT 3'-2 – 5' CCA TAG TCA CCA ATA GCC C 3'. O programa de amplificação foi composto de 35 ciclos, cada um consistido em 2 minutos a 94°C, 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C-50°C (5x), 2 minutos a 68°C, 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C (30x), 2 minutos a 68°C, e 5 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 2%.

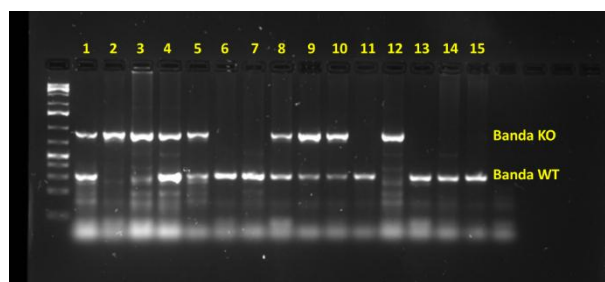


Figura 1: Foto revelação de gel de agarose de eletroforese para identificação gênica dos animais.

2.1.3 Estudos in vivo

2.1.3.1 Reflexo de mastigação e endireitamento

Os reflexos de mastigação e de endireitamento foram avaliados em neonatos P0 quatro horas após o nascimento para avaliar o controle motor perinatal. Para medir o reflexo de mastigação, um tubo de polietileno (PE-10, Clay Adams, Parsippany, NJ) foi gentilmente inserido na boca do recém-nascido por 30 s e contabilizado o número de mastigações. Para a avaliação do reflexo de endireitamento, cada filhote foi colocado em decúbito dorsal e observou-se o tempo necessário para adquirir a posição de decúbito ventral.

2.1.3.2 Determinação da ventilação em neonatos, juvenis e adultos

A ventilação pulmonar ($\dot{V}_E$) dos animais nas idades P0 a 13 foi determinada utilizando-se o método de pletismografia de corpo inteiro para neonatos (Bícego e Mortola, 2017), permitindo a utilização dos mesmos indivíduos ao longo das idades. A fim de conseguir o registro da ventilação através do sistema de pletismografia de corpo inteiro em um sistema fechado (Bartlett e Tenney, 1970), o neonato foi mantido dentro de uma câmara em um banho aquecido, chamado de ninho, à temperatura ideal de acordo com a idade (P0-1 a 37°C; P6-7 a 35°C; P12-13 a 32°C). As oscilações do volume geradas pela respiração do animal foram detectadas por outra câmara localizada fora do ninho (câmara de referência) a uma temperatura mais baixa e sem umidade (P0-1 a 27°C; P6-7 a 25°C; P12-13 a 22°C) gerando, portanto, uma oscilação na pressão dentro da câmara, possibilitando a aquisição do sinal pelo transdutor de pressão o qual estava conectado à câmara de referência. Foi colocado um sensor de temperatura na câmara do animal (T_c), assim como na câmara de referência para aferir a temperatura do ambiente. A $\dot{V}_E$ nos animais jovens (P30-31) e adultos (P80) foi medida por pletismografia de corpo inteiro em sistema fechado (Bartlett e Tenney, 1970; Patrone et al., 2023), utilizando câmaras pletismográficas de 900 mL. A oscilação de pressão devido a respiração foi monitorada por um transdutor de diferencial de pressão (TSD 160A, Biopac Systems, Santa Barbara, CA - EUA), cujo sinal foi enviado para um amplificador (DA 100C, Biopac Systems), passando por um conversor analógico-digital, e digitalizados em um computador equipado com

software de aquisição de dados (AcqKnowledge MP 100, Biopac Systems, Inc., Santa Barbara, CA - EUA). O fluxo de ar foi mantido constante durante o experimento (40 mL.min⁻¹ para P0-1, 70 mL.min⁻¹ para P6-7, 85 mL.min⁻¹ para P12-13 e de 600 mL.min⁻¹ para juvenis e adultos) por meio da bomba SS-4 (Sable Systems International, USA) acoplada ao analisador de gases (ADInstruments®, Austrália).

Foram registrados a frequência respiratória (f_R) e volume corrente (V_T), sendo o último calculado por meio de uma fórmula de Drorbaugh e Fenn (1955), conforme descrito previamente (Patrone et al., 2023). A $\dot{V}_E$ foi obtida pelo produto da f_R e V_T . O volume de calibração (0,2 mL de ar) foi realizado para cada experimento através de uma seringa graduada conectada a câmara do animal. O estímulo hipercápnico foi realizado a partir de misturas gasosa, adquiridas da White Martins Gases Industriais Ltda (Osasco, SP) de 7% CO₂, 21% O₂ em N₂ balanço. Durante a realização das medidas de $\dot{V}_E$, o fluxo de ar foi interrompido e a câmara do animal permaneceu vedada por cerca de 2 min. Nos juvenis e adultos, a temperatura retal foi aferida como representativa a temperatura corporal (T_C) através de um sensor (Thermistor Pod ML 309, ADInstruments®, Austrália) inserido no cólon do animal.

2.1.3.4 Determinação da taxa metabólica

Para todas as idades experimentais, o método de calorimetria indireta (consumo de oxigênio, $\dot{V}O_2$), pela configuração *pull mode*, foi utilizado para a determinação do metabolismo pelo sistema aberto de respirometria (Mortola, 1984; Patrone et al., 2023). Uma bomba SS-4 (Sable Systems International, USA), acoplada ao analisador de gases (modelo ML206, ADInstruments®, Sydney, Austrália), foi conectada à saída da câmara do animal controlando o fluxo do gás na câmara. O gás expirado foi seco através de uma pequena coluna de dessecante (W.A. Hammond Drierite Co. Ltd, Xenia, OH, EUA) antes de passar pelo analisador. O ar foi continuamente amostrado pelo analisador de O₂ permitindo a determinação do $\dot{V}O_2$ pelo programa de aquisição de dados (PowerLab System, ADInstruments® Sidney, Austrália). O $\dot{V}O_2$ foi calculado utilizando fórmula apropriada (Koteja, 1996), conforme previamente descrito (Patrone et al., 2023).

2.1.3.5 Protocolo experimental

Participação dos canais BK no controle ventilatório e metabólico frente à hipercapnia em camundongos neonatos, juvenis e adultos

Os filhotes machos e fêmeas neonatos (P0 a P13), juvenis e adultos dos genótipos WT, HET e BK^{KO} foram colocados nas câmaras de corpo inteiro as quais foram inicialmente ventiladas com ar atmosférico (21% O₂) por um período de habituação (neonatos: 10 min; juvenis e adultos: ~40 min). Inicialmente, foram feitas duas medidas dos parâmetros ventilatórios durante normocapnia (20 min). Em seguida, os animais foram submetidos à hipercapnia por 20 min, onde a

câmara foi ventilada com uma mistura gasosa contendo 7% CO₂, 21% O₂ e equilibrada com N₂, sendo as medidas ventilatórias realizadas nos tempos 10 e 20 min. Nos neonatos, a T_C foi continuamente medida através do sensor de temperatura inserido na câmara do animal e na câmara de referência. O $\dot{V}O_2$ também foi registrado continuamente ao longo do experimento. Nos juvenis e adultos, a T_C foi inferida através da temperatura retal ao término de cada condição.

2.1.3.6 Bloqueio farmacológico sistêmico dos canais BK

Visando uma melhor compreensão sobre o papel dos canais BK no controle respiratório e metabólico ao longo do desenvolvimento, realizamos os mesmos procedimentos experimentais, conforme descritos nos itens 2.1.3.2 a 2.1.3.5, utilizando animais selvagens em diferentes idades pós-natais (0 a 80 dias), os quais foram tratados com veículo (solução salina tampão fosfato, PBS) ou bloqueador seletivo dos canais BK (Paxilina, 2,2 µg/kg – Sigma, EUA). Após serem colocados nas câmaras e o tempo de habituação, duas medidas ventilatórias e metabólicas foram obtidas em condição basal. Os animais receberam a injeção intraperitoneal (i.p.) do veículo ou bloqueador (P0: 0,06 mL; P6-7: 0,1 mL; P12-13: 0,12 mL; P30-31: 0,2 mL e P80: 0,4 mL), sendo aguardado um tempo de 10 min para absorção e ação do fármaco. Em seguida, os animais foram expostos a condição de ar ambiente ou ao gás hipercápnico (7% CO₂), sendo realizadas as medidas das variáveis ventilatórias e metabólicas nos tempos 10 e 20 min, conforme descrito previamente (item 2.1.3.5).

2.1.4 Testes comportamentais

2.1.4.1 Teste de atividade locomotora, comportamento de ansiedade e ataque de pânico induzido por CO₂

Para os testes de locomoção e ansiedade, os camundongos adultos WT, HET e BK^{KO} de ambos os sexos foram colocados individualmente no centro de uma arena de campo aberto (60 cm de largura x 60 cm de comprimento x 40 cm de altura), permitindo mover-se livremente, por 5 min a 25°C. Uma câmera de vídeo foi instalada na parte superior da plataforma e conectada a um computador permitindo o registro dos comportamentos. O software ANY-maze (Stoelting Co., EUA) foi utilizado para as análises. Os parâmetros locomotores avaliados foram: distância total percorrida e velocidade média de deslocamento. Os tempos de permanência nos quadrantes centrais (30 x 30 cm) e laterais da arena também foram quantificados para avaliar o comportamento de ansiedade dos animais.

Para os estudos de comportamento de pânico, os animais foram colocados na câmara experimental (18 cm de diâmetro x 18 cm de altura) com ar normocápnico (fluxo de 1,8 L/min) por ~45 min para habituação. Em seguida, foram registrados os comportamentos em condição de ar ambiente por 10 min. Posteriormente, os animais foram expostos a 20% de CO₂ por 15 min, para induzir respostas comportamentais de pânico, como fuga (saltos) e imobilidade (*freezing*). Um

misturador de gases (Gas mixer GSM-3, CWE Inc., EUA) foi utilizado para produzir a mistura gasosa: 21% O₂, 20% CO₂ e 59% N₂. A concentração de CO₂ no interior da câmara foi aumentada gradualmente ao longo de 12 min até atingir a concentração de 20%. Para analisar as respostas comportamentais de ataque de pânico, os experimentos foram gravados por duas câmeras (Logitech, EUA) estrategicamente posicionadas ao lado e acima da câmara experimental, permitindo a gravação do animal e de seus movimentos.

2.1.5 Estudos *in vitro*

2.1.5.1 Preparação dos slices

Camundongos fêmeas e machos adultos WT e BK^{KO} foram profundamente anestesiados com isoflurano. Os animais foram rapidamente decapitados, os encéfalos removidos e colocado em um vibratomo (Leica VT1000S, Alemanha), submergidos em solução de dissecação tamponada (aCSF em mM: 2,5 KCl, 87 NaCl, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 1,25 NaH₂PO₄, 25 glicose, 75 sucrose e 1 CaCl₂, pH ~7,45) resfriada à 4-6°C e equilibrada com 95% O₂ / 5% CO₂. Foram obtidos slices em plano coronal contendo o núcleo *Locus coeruleus* (300 µm). As fatias contendo a região do LC foram mantidas em solução de perfusão (aCSF em mM: 2,5 KCl, 125 NaCl, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 1,25 NaH₂PO₄, 10 glicose e 2 CaCl₂, pH ~7,45) à temperatura ambiente, equilibrada com 95% O₂ / 5% CO₂ até o início dos registros (~1 h após o corte).

2.1.5.2 Registro eletrofisiológico

Foram realizados registros na configuração *whole-cell patch clamp*. As pipetas foram feitas a partir de vidro de borossilicato de parede fina (diâmetro externo de 1,5 mm, diâmetro interno de 1,12 mm, Harvard Apparatus - EUA), utilizando um estirador vertical de eletrodo (modelo P97, Sutter instrument - EUA), formando uma ponta com resistência de ~5 MΩ. O capilar de vidro foi preenchido com solução interna (em mM: 130 K-gluconato, 0,4 EGTA, 1 MgCl₂, 0,3 Na₂GTP, 2 Na₂ATP e 10 HEPES, pH ~7,45 tamponado com KOH). Os slices foram colocados em uma câmara de perfusão (RC-27, Warner instruments - EUA) adaptada a um microscópio (Leica DM6 FS - Alemanha) e imobilizados com a utilização de uma grade de nylon, e continuamente perfundidos com aCSF padrão (3-5 mL.min⁻¹). As fatias foram visualizadas com a utilização de um microscópio vertical (Leica DM6 FS - Alemanha) em objetiva de 4x, utilizando uma câmera Leica CMS K3M e o software LAS X. Os neurônios do LC foram identificados através da localização bilateral adjacente ao quarto ventrículo utilizando objetiva de imersão 40x. Os experimentos foram realizados com solução de perfusão à temperatura ambiente de 25°C.

Inicialmente, a pipeta foi posicionada adjacente ao soma do neurônio com auxílio de um micromanipulador (MHW-3, Narishige – Japão), e uma pressão negativa foi aplicada alcançando o valor de vedação >1 GΩ. Rapidamente, uma sucção foi aplicada para o rompimento da membrana celular. O potencial de membrana (V_m) e a frequência de disparo dos neurônios foram registrados a

partir da região do soma da célula no modo *current clamp*. Os sinais elétricos foram obtidos usando um amplificador Axopatch 200B, um conversor Digidata 1550B4 e um software Clampex P11.2 (Molecular Devices Co., EUA). Um eletrodo de Ag-AgCl₂ conectado à solução do banho serviu como o eletrodo de referência. Os dados foram filtrados a 2 kHz, amostrados a 10 kHz e salvos em um computador para serem posteriormente analisados. Os critérios para determinação de neurônios saudáveis foram o potencial de membrana em repouso estável (V_m) de -40 a -60 mV e uma taxa de disparo espontânea inferior a 4 Hz. A reversibilidade de todas as respostas eletrofisiológicas sob investigação foi verificada pelo retorno das variáveis aos valores em condição basal. V_m foi corrigido para o potencial de junção líquida (16 mV calculados a partir da equação de Henderson usando o Clampex). Os valores de capacitância da membrana (C_{ap}) para os neurônios LC foram determinados no modo *current-clamp*. Para isso, pulsos de corrente (I_{ext} , -50 a -200 pA, 800 ms) foram aplicados a partir de um potencial de membrana sem atividade de disparo (cerca de -70 mV), e a hiperpolarização resultante (10 - 20 mV) foi registrada. Para obter a constante de tempo da membrana (τ_m) e a mudança do potencial de membrana, um traço médio foi ajustado de $t = 0$ até um tempo em que a voltagem atingiu um estado estacionário com dois ou três termos exponenciais usando o algoritmo de Levenberg-Marquardt (LM) do software de análise Clampfit no pacote pClamp. O C_m foi obtido dividindo τ_m pelo coeficiente de resistência R_m (V_m/I_{ext}):

$$C_m = \tau_m / R_m = \tau_m / I_{ext} / V_m$$

Após os registros das propriedades da membrana neural, o *slice* foi banhado com solução de bloqueio sináptico, semelhante a solução de aCSF, contendo os bloqueadores DNQX (10 μ M, Hello Bio, EUA), AP-5 (50 μ M, Hello Bio, EUA), bicuculina (10 μ M, Hello Bio, EUA) e estricnina (10 μ M, Sigma, EUA).

2.1.5.3 Protocolo experimental

Após 15 min para estabilização, a frequência de disparo inicial e o V_m da célula foram registradas em condição controle (5% CO₂) por ~5 min. Em seguida, o potencial de membrana foi estabilizado com frequência de disparo próxima à 0,5 Hz, com injeções de correntes. Em seguida, para avaliar a capacitância (C_{ap}) e a resistência da membrana (R_m) do neurônio foi realizado um protocolo com hiperpolarização da membrana, com injeções de correntes negativas de 5 pA (variando de -45 à -80 mV). Ao final da realização do protocolo, foi realizado o protocolo de avaliação da quimiossensibilidade, na qual foi constituído de um registro da atividade neuronal por 5 min em solução de bloqueio sináptico contendo 5% CO₂, em seguida a célula foi exposta a solução contendo 10% CO₂ por um período de 5 min, retornando, posteriormente, a solução com 5% CO₂.

2.1.6 Análise dos dados

Os dados foram avaliados quanto ao entendimento das pressuposições da homogeneidade das variâncias e normalidades dos erros estudatizados. O software SigmaStat Versão 11 foi utilizado para as análises estatísticas. Os dados categóricos (mortalidade) foram comparados entre os grupos por meio do teste qui-quadrado. O teste de análise de variância (ANOVA) de uma via foi aplicado aos dados de massa corporal, reflexo motor e comportamento. Os dados das variáveis respiratórias e metabólicas, bem como da resposta quimiossensível neural, foram analisados por meio de teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas. Foi empregada análise paramétrica teste t para os dados de propriedades eletrofisiológicas da membrana. Em caso de diferença significativa, as médias foram comparadas pelo pós teste de Tukey com nível de 5% de probabilidade e o intervalo de confiança de 95%, sendo $p < 0,05$ considerado significativo.

2.2 RESULTADOS

2.2.1 Estudos in vivo

2.2.1.1 Taxa de mortalidade

A Tabela 1 mostra a taxa de mortalidade dos camundongos transgênicos *Slo1*. Observamos uma taxa de mortalidade mais alta nos animais BK^{KO} ($p = 0,02$), seja para as ninhadas destinadas à realização dos protocolos experimentais, assim como aquelas utilizadas para a manutenção da colônia. Além da mortalidade significativa dos animais *knockout*, as ninhadas dessa linhagem também apresentaram uma proporção maior de filhotes fêmeas em comparação com machos na maioria das ninhadas.

Tabela 1. Taxa de mortalidade de filhotes machos e fêmeas entre os genótipos selvagem (WT), heterozigoto (HET) e *knockout* (BK^{KO}).

	Taxa de mortalidade					
	MACHOS			FÊMEAS		
	WT	HET	BK ^{KO}	WT	HET	BK ^{KO}
Nascimento	4	5	3	5	8	6
Morte	1	0	1	0	0	4
Taxa (%)	25%	0	33%	0	0	66,6%*

* Diferença significativa entre animais BK^{KO} e os genótipos WT e HET.

2.2.1.2 Massa corporal

Para as medidas ventilatórias e metabólicas, os animais foram pesados em cada sessão experimental (item 2.1.3.5), possibilitando o acompanhamento do ganho de massa corporal ao longo do desenvolvimento. Os filhotes BK^{KO} apresentaram uma tendência de menor massa corporal em comparação aos animais WT e HET, sendo estatisticamente menor na idade P30 em relação ao grupo WT ($p = 0,002$) (Tabela 2).

Tabela 2. Massa corporal (g) dos animais selvagem (WT), heterozigoto (HET) e *knockout* (BK^{KO}), ao longo do desenvolvimento nas idades P0-1, P6-7, P12-13, P30-31 e P80.

Idade	Genótipo		
	WT	HET	BK ^{KO}
P0-1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2
P6-7	3,1 ± 0,3	3,1 ± 0,5	2,7 ± 1,1
P12-13	5,5 ± 0,9	5,3 ± 1,1	4,2 ± 0,3
P30-31	14,2 ± 2,7	13,0 ± 2,3	8,7 ± 1,4 [#]
P80	21,7 ± 2,7	21 ± 2,3	19,8 ± 2,2

Os valores são apresentados como média ± E.P.M. [#] Diferença significativa entre animais mutantes e o genótipo WT na mesma idade.

2.2.1.3 Reflexos motores

A Figura 2 apresenta os reflexos motores de endireitamento (A) e mastigação (B) dos animais P0 WT, HET e BK^{KO}. Os animais de ambos os sexos foram agrupados em cada genótipo. A deleção dos canais BK não resultou em alterações dos comportamentos reflexos avaliados.

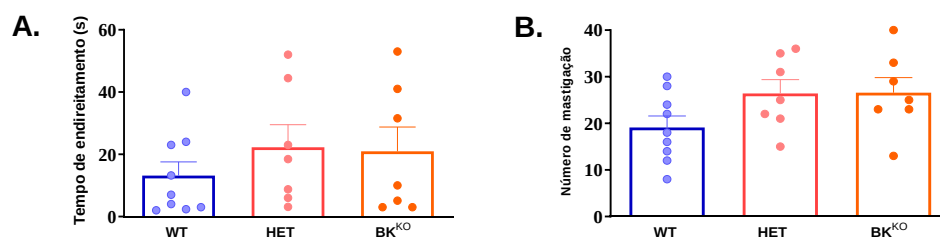


Figura 2. Reflexo de endireitamento em segundos (A) e quantificação do número de mastigações (B) de filhotes P0 WT (n=9), HET (n=7) e BK^{KO} (n=7) de ambos os sexos. Os valores são expressos como média ± E.P.M.

2.2.1.4 Avaliação da ventilação e metabolismo durante normocapnia e hipercapnia em camundongos neonatos (P0-1, P6-7 e P12-13) selvagens, heterozigotos e knockout para canais BK

Foram realizados experimentos com 32 animais, sendo 13 machos e 19 fêmeas, entre os três genótipos. As Figuras 3 e 4 apresentam os valores de ventilação ($\dot{V}_E$), volume corrente (V_T), frequência respiratória (f_R), consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) e equivalente respiratório ($\dot{V}_E / \dot{V}O_2$) de fêmeas e machos, respectivamente, para os três genótipos nas idades P0-1 (A), P6-7 (B) e P12-13 (C). São apresentados os dados em condições basais e frente a hipercapnia (7% de CO₂).

Em relação às fêmeas (Figura 3), os dados indicam que a deleção dos canais BK não altera as variáveis respiratórias e metabólicas em condições basais, em nenhuma das idades neonatais. Para todas as idades e genótipos, a exposição ao CO₂ resultou em aumento significativo da $\dot{V}_E$ em decorrência de aumento do V_T e f_R ($p < 0,001$). Entretanto, na idade P0-1, a resposta ventilatória à hipercapnia foi maior nas fêmeas do grupo HET comparado com o grupo BK^{KO} ($p = 0,04$) no tempo 10 min após início da exposição, possivelmente devido a um maior V_T (Figura 3A). Já para a idade P6-7, o grupo BK^{KO} apresentou um maior aumento da resposta ventilatória ao CO₂ em comparação com os animais WT ($p = 0,015$) e HET ($p = 0,0003$) no tempo 10 min (Figura 3B). Nas fêmeas P12-

13, o genótipo BK^{KO} apresentou uma resposta ventilatória ao CO₂ maior em comparação ao grupo HET ($p = 0,02$), em decorrência de um V_T maior ($p = 0,037$) (Figura 3C). Em relação ao metabolismo, nem a exposição ao CO₂ nem o genótipo induziram alterações no $\dot{V}O_2$.

Para os machos neonatos (Figura 4), em condições basais, não foram observadas diferenças nas variáveis respiratórias e metabólicas entre os genótipos. Em todas as idades neonatais e genótipos, a exposição ao CO₂ promoveu um aumento significativo nas variáveis respiratórias ($p < 0,001$). A deleção dos canais BK não resultou em diferenças estatísticas nas respostas ventilatórias ao CO₂ em nenhuma das idades pós-natais, exceto nos machos BK^{KO} de idade P12-13, que apresentaram uma $\dot{V}_E$ e V_T maior em comparação com os animais WT após 10 min de exposição ao CO₂ ($p < 0,05$) (Figura 4C). Não foram observados efeitos do genótipo sobre o metabolismo em condição de hipercapnia.

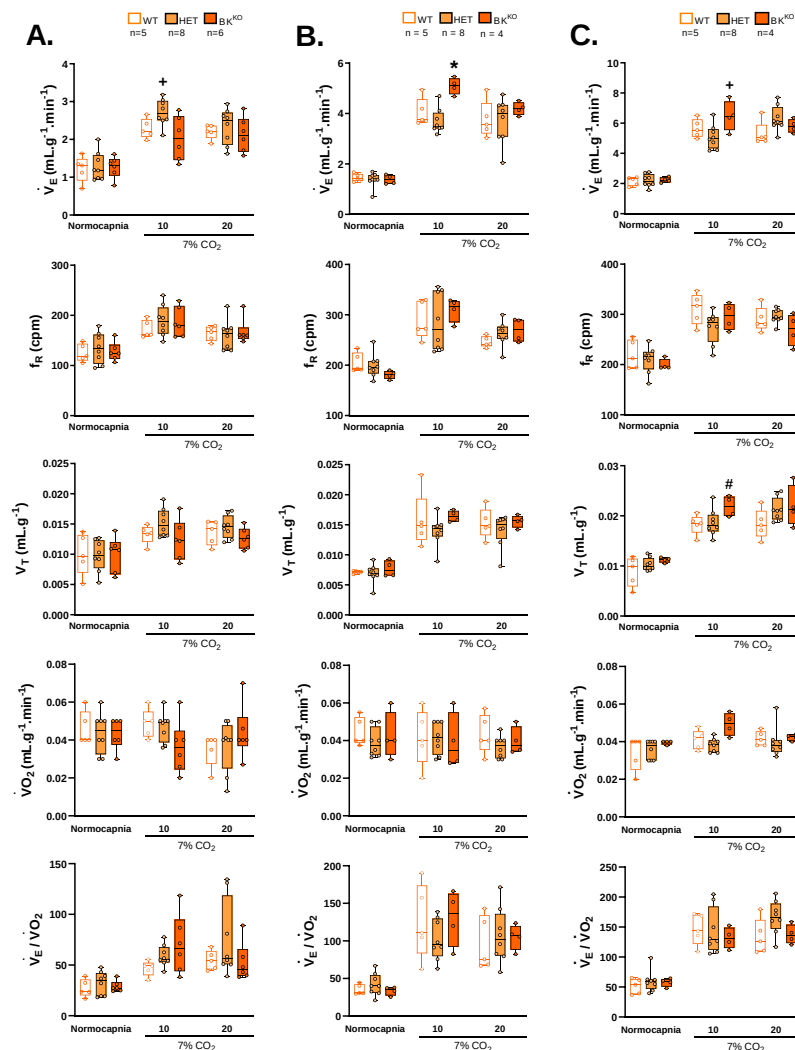


Figura 3. Ventilação ($\dot{V}_E$), volume corrente (V_T), frequência respiratória (f_R), consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) e equivalente respiratório ($\dot{V}_E / \dot{V}O_2$) de fêmeas P0-1 (A), P6-7 (B) e P12-13 (C) selvagem (WT), heterozigoto (HET) e *knockout* (BK^{KO}), em condição de ar ambiente e sob exposição hipercápnica (7% CO₂). * Diferença significativa entre o grupo BK^{KO} e os grupos WT e HET. # Diferença significativa entre o grupo BK^{KO} e WT. + Diferença significativa entre o grupo HET e BK^{KO}.

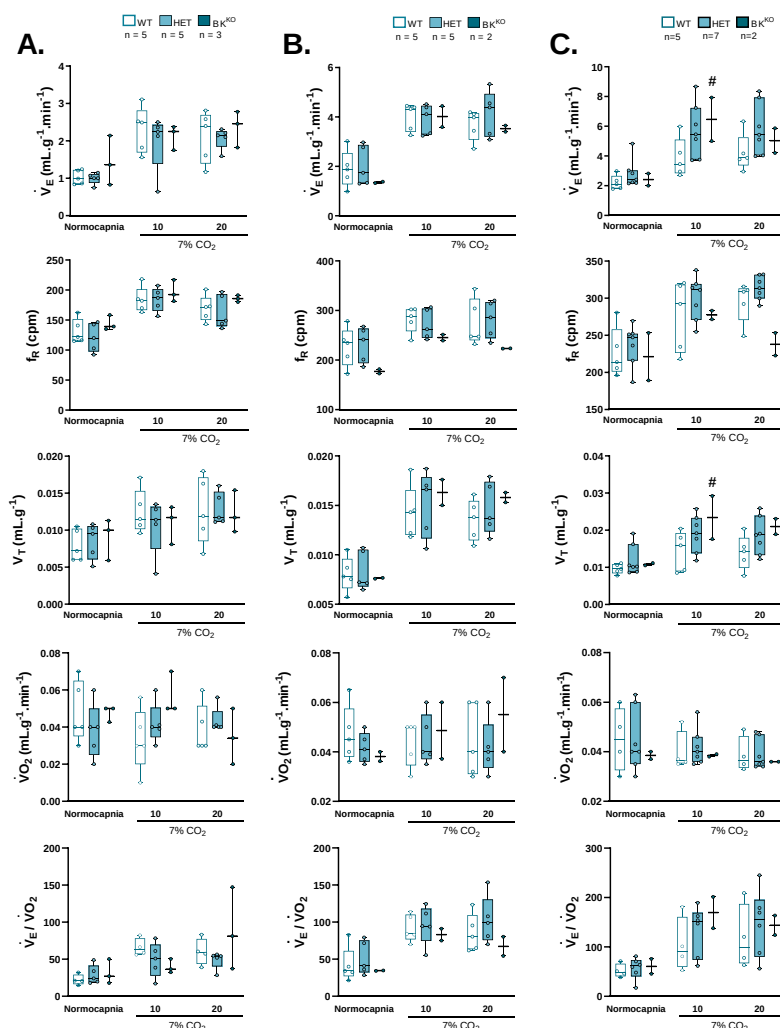


Figura 4. Ventilação ($\dot{V}_E$), volume corrente (V_T), frequência respiratória (f_R), consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) e equivalente respiratório ($\dot{V}_E / \dot{V}O_2$) de machos P0-1 (A), P6-7 (B) e P12-13 (C) selvagem (WT), heterozigoto (HET) e *knockout* (BK^{KO}), em condição de ar ambiente e sob exposição hipercápnica (7% CO₂). # Diferença significativa entre o grupo BK^{KO} e WT.

2.2.1.5 Avaliação da ventilação e metabolismo durante normocápnia e hipercápnia em camundongos juvenis (P30-31) e adultos (P80) selvagens, heterozigotos e knockout para canais BK

A Figura 5 apresenta as variáveis ventilatórias e metabólicas de camundongos fêmeas e machos na idade juvenil (A e B, respectivamente) e adulta (C e D, respectivamente) para os três genótipos sob condições normocápnicas e hipercápnicas. Durante as condições basais, não foram observadas diferenças significativas em nenhuma das variáveis entre os genótipos, tanto na idade juvenil quanto na adulta, exceto uma menor f_R nos machos juvenis BK^{KO} comparado com o grupo HET ($p = 0,019$; Figura 5B), porém não refletindo em alterações significativas na $\dot{V}_E$. A exposição ao CO₂ resultou em aumentos significativos das variáveis ventilatórias em todos os grupos e genótipos ($p < 0,001$). No entanto, especificamente nas fêmeas jovens BK^{KO}, houve um maior aumento na $\dot{V}_E$ ($p = 0,027$) e no V_T ($p = 0,014$) em comparação com o grupo WT no tempo 20 min de exposição ao CO₂ (Figura 5A). Não foram evidenciados efeitos do genótipo sobre as respostas

ventilatórias à hipercania nas fêmeas adultas, assim como nos machos em ambas as idades. Em relação ao metabolismo, os machos juvenis BK^{KO} apresentaram uma taxa metabólica elevada nos tempos 10 e 20 min de exposição ao CO₂ em comparação com os camundongos WT e HET [10 min: BK^{KO} vs WT ($p = 0,002$) e BK^{KO} vs HET ($p = 0,008$); 20 min: BK^{KO} vs WT ($p = 0,008$) e BK^{KO} vs HET ($p = 0,026$)]. Consequentemente, isso refletiu em uma redução do $\dot{V}_E / \dot{V}O_2$, o qual foi estatisticamente diferente do grupo HET ($p = 0,034$). Adicionalmente, durante hipercapnia, o grupo de fêmeas adultas BK^{KO} exibiu um $\dot{V}O_2$ maior em comparação com os grupos WT ($p = 0,014$) e HET ($p = 0,017$) no tempo de 20 min de exposição.

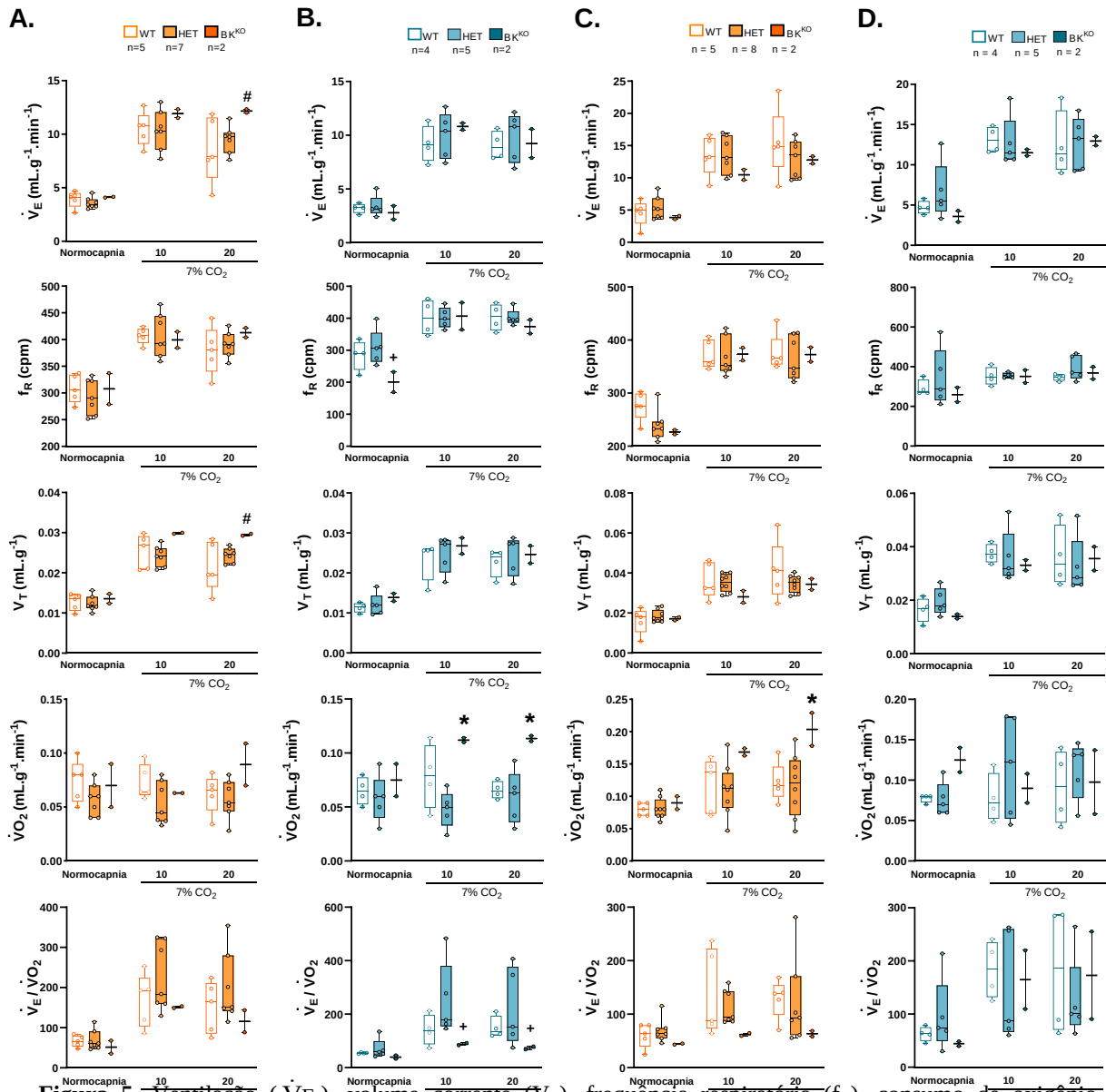


Figura 5. Ventilação ($\dot{V}_E$), volume corrente (V_T), frequência respiratória (f_R), consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) e equivalente respiratório ($\dot{V}_E / \dot{V}O_2$) de fêmeas juvenis (A) e adultas (C) e machos juvenis (B) e adultos (D) selvagem (WT), heterozigoto (HET) e *knockout* (BK^{KO}), em condição de ar ambiente e sob exposição hipercápica (7% CO₂). * Diferença significativa entre o grupo BK^{KO} e os grupos WT e HET. # Diferença significativa entre o grupo BK^{KO} e WT. + Diferença significativa entre o grupo BK^{KO} e HET.

2.2.1.6 Efeito do bloqueio sistêmico dos canais BK sobre a ventilação e metabolismo basal de neonatos P12-13

Em relação ao protocolo experimental de bloqueio farmacológico sistêmico dos canais BK, devido ao número reduzido de animais por grupo até o momento, este relatório apresenta os dados parciais em condição basal para animais fêmeas e machos na idade P12-13. A Figura 6 apresenta as variáveis respiratórias e metabólicas dos neonatos previamente e após receber o tratamento i.p. do veículo ou bloqueador (paxilina 2,2 µg/kg). Os dados preliminares demonstram que o bloqueio sistêmico dos canais BK não resultou em alterações basais das variáveis ventilatórias e metabólicas dos neonatos P12-13 de ambos os sexos, embora haja uma tendência de redução da f_R nas fêmeas tratadas com o bloqueador, aparentemente compensada pelo aumento do V_T (Figura 6A).

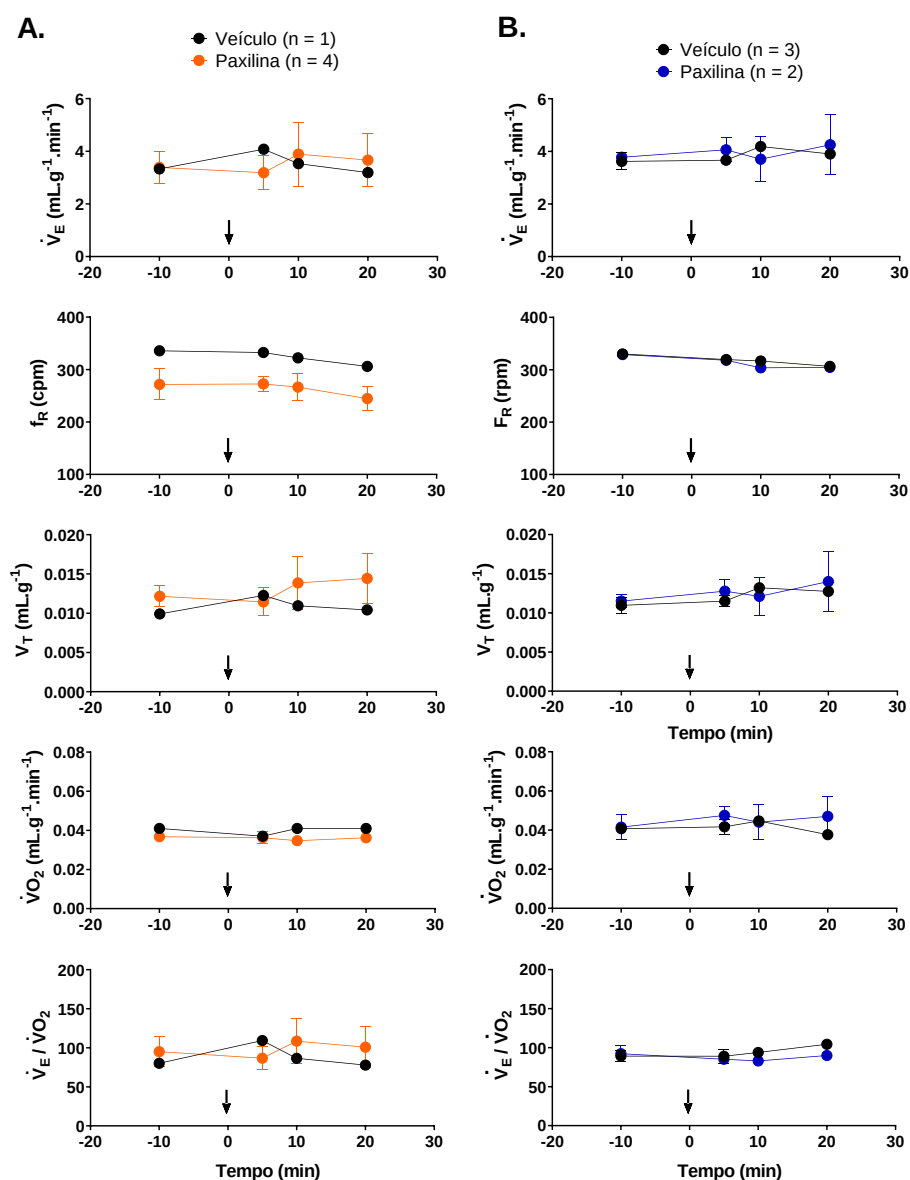


Figura 6. Ventilação ($\dot{V}_E$), frequência respiratória (f_R), volume corrente (V_T), consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) e equivalente respiratório ($\dot{V}_E / \dot{V}O_2$) de neonatos fêmeas (A) e machos (B) P12-13 tratados por via intraperitoneal (i.p.) com veículo (PBS) ou com bloqueador dos canais BK (paxilina, 2,2 µg/kg) em condição de ar ambiente. A seta indica o momento da injeção.

2.2.2 Estudos comportamentais

2.2.2.1 Participação dos canais BK sobre a atividade locomotora, comportando de ansiedade e ataque de pânico induzido por CO₂ em camundongos adultos

A Figura 7 mostra o envolvimento dos canais BK na atividade locomotora de camundongos adultos, fêmeas (A) e machos (B), em condições de ar ambiente. Os dados preliminares indicam que a mutação nos canais BK não alterou o comportamento locomotor em ambos os sexos, pois não houve efeito do genótipo sobre a distância percorrida nem sobre a velocidade média de deslocamento em ambos os sexos. Em relação ao comportamento de ansiedade nas fêmeas (C) e nos machos (D), os dados obtidos até o presente indicam uma tendência ($p = 0,06$) de redução do tempo de permanência na periferia e aumento na região central da arena em fêmeas BK^{KO}, em comparação com os genótipos WT e HET. Nos machos, no entanto, o tempo de permanência nas regiões da arena não diferiu entre os genótipos. Os comportamentos de *freezing* e saltos induzidos por condição panicogênica (20% CO₂) foram quantificados em fêmeas (E) e machos (F) adultos dos três genótipos. Nas fêmeas, a mutação dos canais BK resultou em uma redução do número de saltos em comparação com o grupo WT ($p = 0,006$), sem efeitos sobre o comportamento de *freezing*. Em machos, os dados preliminares mostraram um aumento significativo no tempo de permanência em comportamento de *freezing* no genótipo HET em comparação com os animais WT ($p = 0,04$), sem efeitos do genótipo sobre o comportamento de fuga.

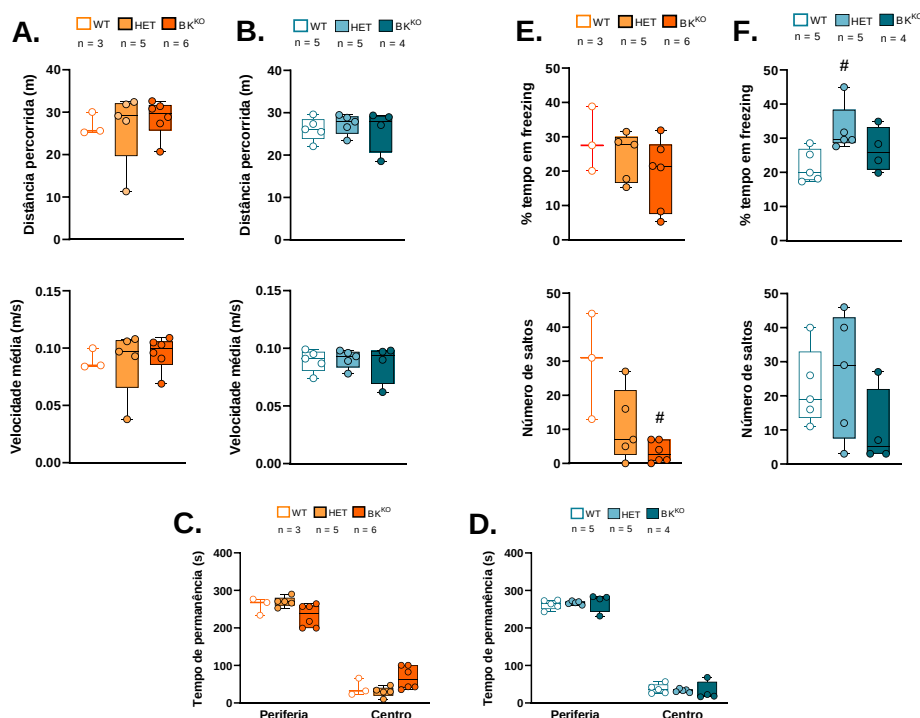


Figura 7. Distância total percorrida e velocidade média de deslocamento (A: fêmeas; B: machos) e tempo de permanência nas zonas periférica e central da arena de campo aberto (C: fêmeas; D: machos) em condições de ar ambiente, porcentagem de tempo em *freezing* e número de saltos induzidos por condição panicogênica (20% CO₂) (E: fêmeas; F: machos) de camundongos adultos selvagem (WT), heterozigoto (HET) e *knockout* (BK^{KO}). # Diferença significativa em relação ao grupo WT.

2.2.3 Estudos *in vitro*

2.2.3.1 Participação dos canais BK sobre as propriedades da membrana e quimiossensibilidade ao CO₂ dos neurônios do Locus coeruleus de camundongos adultos

A Figura 8 apresenta as propriedades da membrana dos neurônios do LC em condições basais, bem como a resposta quimiossensível ao CO₂/pH, de camundongos fêmeas (A e C) e machos (B e D) adultos para os genótipos WT e BK^{KO}. Os dados indicam que a deleção do canal iônico não afetou as propriedades da membrana em condições basais em ambos os sexos.

Quanto à resposta quimiossensível ao CO₂/pH, no grupo WT, 4 das 6 células registradas em fêmeas aumentaram a taxa de disparo em 10% CO₂ ($p = 0,02$), enquanto 2 foram insensíveis ao estímulo. No grupo BK^{KO}, 4 das 7 células também aumentaram a taxa de disparo ($p = 0,01$), 2 foram não responsivas, e 1 reduziu sua atividade. Até o momento, os dados sugerem que a deleção dos canais BK não afeta a magnitude da resposta quimiossensível dos neurônios do LC em fêmeas. No grupo de machos WT, 7 das 13 células registradas aumentaram a taxa de disparo em resposta a 10% CO₂ ($p = 0,04$), enquanto 3 foram não responsivas e outras 3 reduziram a atividade. Nos machos BK^{KO}, 7 das 12 células registradas também aumentaram a taxa de disparo durante o estímulo hipercápnico ($p < 0,001$); 3 células não responderam e 2 reduziram a atividade frente ao CO₂. A deleção dos canais BK, no entanto, levou a um aumento significativo na magnitude da resposta quimiossensível ao CO₂/pH ($p = 0,02$), com uma elevação na taxa de disparo de 75% nos neurônios dos WT e 340% nos BK^{KO}.

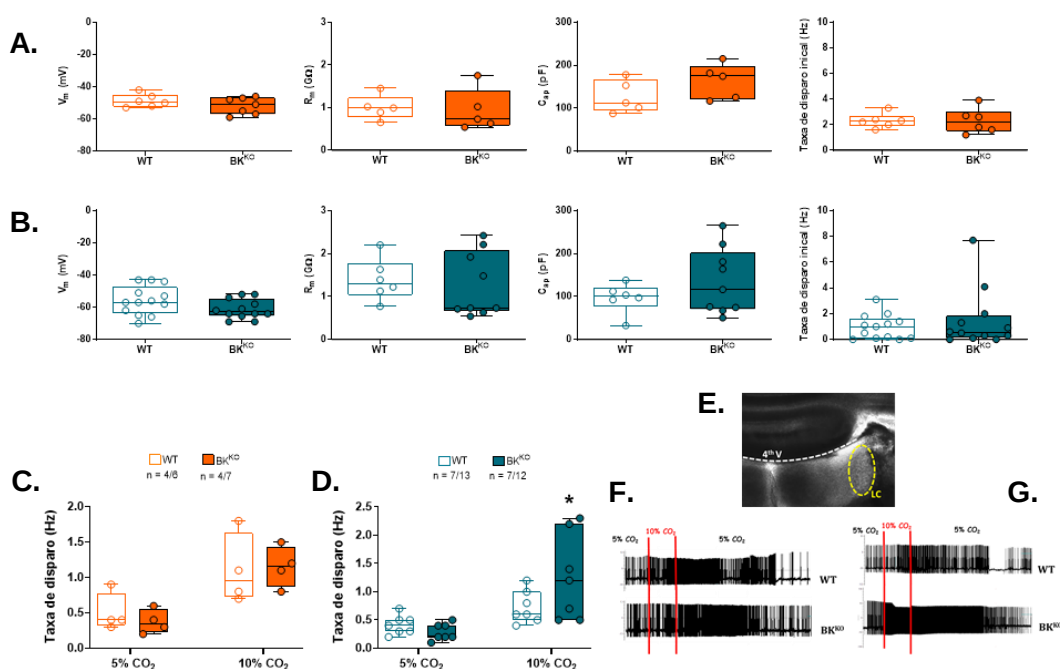


Figura 8. Potencial de membrana em repouso (V_m), resistência da membrana (R_m), capacitância (Cap) e taxa de disparo inicial dos neurônios do Locus coeruleus (LC) de fêmeas (A) e machos (B) adultos selvagem (WT) e *knockout* (BK^{KO}) durante condição basal. Taxa de disparo dos neurônios do LC de camundongos WT e BK^{KO} fêmeas (C) e machos (D) adultos em condição basal (5% CO₂) e durante condição de acidose hipercápnica (10% CO₂). Foto representativa do *slice* contendo a região do LC em objetiva de 4x (E). Registro representativo de células do LC para fêmeas (F) e machos (G) durante condição basal e exposição ao CO₂ para animais WT e BK^{KO}. * Diferença significativa em relação ao grupo WT na mesma condição experimental.

2.3 DISCUSSÃO

O uso de camundongos *knockout* para canais BK (BK^{KO}) tem fornecido uma abordagem importante para estudar os efeitos da ausência desses canais no controle respiratório, metabólico e comportamental. No entanto, a criação e manutenção deste modelo animal apresentou desafios, visto a menor viabilidade dos filhotes BK^{KO} na fase neonatal (Tabela 1), o que limitou o número de indivíduos disponíveis para os experimentos, influenciando a representatividade amostral dos resultados obtidos. Estudos anteriores observaram altas taxas de mortalidade em filhotes *knockout* (Meridith et al., 2004; Halm et al., 2017), atribuídas a dificuldades de alimentação, o que pode justificar a menor massa corporal dos filhotes BK^{KO} , observado no presente estudo (Tabela 2).

Embora estudos anteriores tenham relatado a ocorrência de quadros de ataxia em camundongos BK^{KO} (Sausbier et al., 2004), não observamos alterações nos reflexos de mastigação ou de endireitamento no presente relatório (Figura 2), assim como os resultados de locomoção não diferiram entre genótipos (Figura 7A e B). De acordo com Knaus et al. (1996), apesar da ampla expressão dos canais BK no SNC, esses canais parecem desempenhar um papel modesto na função encefálica normal, o que sugere que sua atuação se torne mais relevante em situações de estresse, como indicado por evidências de que os canais BK promovem aumento da sobrevivência neural em condições isquêmicas.

Nesse contexto, os dados parciais do presente relatório indicam que a ausência dos canais BK não altera os parâmetros ventilatórios e metabólicos em condições normocápnicas ao longo do desenvolvimento pós-natal em ambos os sexos (Figura 3, 4 e 5). Da mesma forma, o bloqueio farmacológico sistêmico dos canais BK em neonatos P12-13 também não promoveu alterações respiratórias e metabólicas em condições basais (Figura 6). Estudos prévios demonstraram que os canais BK podem desempenhar um papel na regulação do ritmo respiratório (Bissonete, 2002). O bloqueio desses canais com ChTX resultou em um sutil aumento da frequência de disparo do nervo frênico em preparações *in situ* contendo o tronco encefálico de camundongos P20-25 (Busselberg et al., 2003). Por outro lado, o bloqueio desses canais com iberitoxina (Zhao et al., 2006) ou TEA (Onimaru et al., 2003) em preparações tronco encefálico-medula espinhal de ratos e camundongos neonatos resultou em uma leve diminuição da f_R . Esses achados sugerem que os canais BK podem influenciar a f_R de forma distinta, dependendo do tipo de preparação experimental. No presente estudo, utilizando modelos *in vivo* de camundongos BK^{KO} , não observamos efeitos sobre os parâmetros respiratórios ou metabólicos em condições normocápnicas, corroborando nossos achados anteriores, nos quais a microinjeção intra-LC de paxilina não resultou em alterações ventilatórias durante condições basais (Imber et al., 2018).

Durante o desenvolvimento neonatal em roedores, os canais BK exibem um perfil de expressão dinâmico em vários tecidos, incluindo o sistema nervoso, onde desempenham um papel crucial na excitabilidade celular e na função sináptica (Contet et al., 2016). Assim, os canais BK demonstram ter um papel relevante no desenvolvimento da quimiossensibilidade, dado a existência de um período crítico no desenvolvimento pós-natal em que a sensibilidade ao CO_2 é particularmente suscetível a variações (Putnam et al., 2001; 2004; Davis 2006; Bavis e Mitchell, 2008; Wong-Riley et al., 2019). Nesse sentido, os dados do presente relatório indicam que a deleção do canal BK parece intensificar a resposta ventilatória hipercápnica, especialmente em fêmeas nas idades P6-7, P12-3 e na fase juvenil. Em machos juvenis e fêmeas adultas, o efeito mais pronunciado foi observado na taxa metabólica. Esses dados sugerem que esses canais atuam como um importante mecanismo regulador da quimiossensibilidade, especialmente durante o período neonatal, quando o controle ventilatório ainda está em maturação, exercendo um mecanismo de “freio”, limitando a resposta ventilatória ao CO_2 . Esses resultados vão ao encontro de estudos anteriores, o qual têm demonstrado a participação dos canais BK no controle ventilatório de forma idade dependente, onde animais com idade $<P10$ apresentam uma quimiossensibilidade dos neurônios do LC significativamente maior quando comparado com animais $>P10$ (Gargaglioni et

al., 2010; Imber et al., 2018). Essa resposta parece ser decorrente do aumento da expressão de canais BK em neurônios do LC, o qual aumenta progressivamente nas primeiras semanas de vida, limitando a resposta quimiossensível ao CO₂, desempenhando um papel protetor ao reduzir a atividade neuronal excessiva (Imber et al., 2018).

A maioria dos efeitos da deleção do canal BK na ventilação foi observada de P6-7 até o estágio juvenil, principalmente em fêmeas. Isso pode estar relacionado à diferente expressão dos canais durante o desenvolvimento. De fato, os padrões de expressão dos canais BK mudam ao longo do desenvolvimento inicial, sugerindo que seu papel na regulação da excitabilidade pode ser dependente do desenvolvimento (MacDonald et al., 2006). Em relação aos efeitos do sexo, estudos anteriores demonstram que a expressão dos canais BK é maior no hipocampo de ratas fêmeas em P0, P2, P4, P6 e P8 (Hunsberger e Mynlieff, 2020). Curiosamente, o 17β-estradiol pode ativar diretamente os canais BK, assim como aumentar a expressão da subunidade β1 do canal BK, resultando em aumento da atividade do canal por meio da desmetilação do DNA (Valverde et al., 1999). Portanto, a modulação dos canais BK parece ser sexo dependente, como também observado no presente estudo. Entretanto, para uma conclusão mais assertiva, precisamos aumentar o número amostral de ambos os grupos experimentais.

Os resultados referentes aos estudos eletrofisiológicos indicam que os canais BK não possuem papel tônico sobre as propriedades da membrana dos neurônios do LC de camundongos fêmeas e machos (Figura 8A e B). No entanto, a resposta quimiossensível ao CO₂ dos neurônios do LC de machos BK^{KO} foi significativamente maior (~340%) quando comparado com células de animais controles (~75%) (Figura 8D). Esse resultado corrobora com trabalhos prévios onde foi evidenciado uma redução da quimiossensibilidade dos neurônios do LC com o aumento da expressão de canais BK, o que foi revertido com a utilização de bloqueador farmacológico (Imber et al., 2018). Curiosamente, embora preliminar, essa diferença na resposta quimiossensível ao CO₂ dos neurônios do LC não foi observada para as fêmeas (Figura 8C), reforçando que atuação dos canais BK pode ser influenciada pelo sexo. Adicionalmente, observamos que a resposta quimiossensível das fêmeas WT parece ser maior se comparada com os machos WT, o que reforça a existência de diferenças dependentes do sexo no LC (Gargaglioni et al., 2010). No entanto, para uma conclusão sólida sobre a participação desses canais na resposta quimiossensível de fêmeas adultas é necessário aumentar o número de células registradas em ambos os grupos (WT e BK^{KO}).

Em relação a expressão de comportamentos de ansiedade, os dados obtidos pelos testes comportamentais demonstram que a deleção dos canais BK não resultou em indivíduos com grau de ansiedade aumentado (Figura 7C e D). Adicionalmente, os comportamentos desencadeados por ataques de pânico (20% CO₂) não foram potencializados pela mutação (Figura 7E e F), mas pelo contrário, fêmeas BK^{KO} apresentaram uma redução de saltos frente a condição panicogênica, demonstrando que a ausência dos canais BK leva ao fenótipo de redução da resposta de fuga relacionada ao pânico, resultando em resposta panicolítica. Embora evidências demonstram que desordens como ataques de pânico estão associados a anormalidades respiratórias, incluindo uma sensibilidade aumentada ao CO₂ (Nardi et al., 2009; Wemmie, 2011), a mutação geral dos canais BK pode não ser característica para o acometimento de distúrbios fisiopatológicos, como ataques de pânico. No entanto, a disfunção do canal em núcleos específicos envolvidos no controle da respiração e do comportamento, como o LC, pode ter um impacto mais direto sobre esses comportamentos. Com isso, propomos a realização de um estágio de pesquisa no exterior (BEPE) no Laboratório do Dr. Russell Ray, da *Baylor College of Medicine* (Houston, EUA), com início no primeiro semestre de 2025, onde utilizaremos uma linhagem de camundongos com a deleção dos canais BK especificamente nos neurônios do LC e avaliaremos os efeitos sobre o controle respiratório e a susceptibilidade aos ataques de pânico.

2.4 DIFICULDADES ENCONTRADAS

O principal fator limitante para o progresso dos experimentos foi a baixa porcentagem de animais mutantes por ninhada (cerca de 25%), além dos elevados índices de aborto e mortalidade pós-natal. O projeto como um todo é ambicioso, visto que múltiplos protocolos experimentais estão sendo executados simultaneamente, o que exige uma grande quantidade de animais para a execução dos experimentos, para que assim possamos ter uma conclusão mais robusta sobre a participação dos canais BK no controle ventilatório e nas disfunções associadas a fisiopatologias. Vale ressaltar também que, nos primeiros anos de execução do projeto temático, a implementação da colônia e a instalação e padronização do *setup* de eletrofisiologia influenciaram o progresso dos experimentos.

2.5 REFERÊNCIAS

- Bartlett, D. Jr., Tenney, S.M. 1970. Control of breathing in experimental anemia. *Respir Physiol.*, 10384-95.
- Bavis, R.W., Mitchell, G.S. 2008. Long-term effects of the perinatal environment on respiratory control. *J. Appl. Physiol.*, 104, 1220-1229.
- Bícego, K.C., Mortola, J.P. 2017. Thermal tachypnea in avian embryos. *J. Exp. Biol.*, 220, 4634-4643.
- Bissonnette, J.M. 2002. The role of calcium-activated potassium channels in respiratory control. *Respir Physiol Neurobiol*, 131, 145-153.
- Büsselberg, D., Bischoff, A.M., Richter, D.W. 2003. A combined blockade of glycine and calcium-dependent potassium channels abolishes the respiratory rhythm. *Neuroscience* 122, 831-841.
- Contet, C. 2016. BK Channels in the Central Nervous System. 1. ed. Elsevier Inc., 128.
- Davis, S.E, Solhied, G., Castillo, M., Dwinell, M., Brozoski, D., Forster, H.V. 2006. Postnatal developmental changes in CO₂ sensitivity in rats. *J. Appl. Physiol*, 101, 1097-1103.
- Drorbaugh, J.E., Fenn, W.O. 1955. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics*, 16, 81-87.
- Filosa, J.A., Putnam, R.W. 2003. Multiple targets of chemosensitive signaling in locus coeruleus neurons: role of K⁺ and Ca²⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284, 145-155.
- Gargaglioni, L.H., Hartzler, L.K., Putnam, R.W. 2010. The locus coeruleus and central chemosensitivity. *Respir Physiol Neurobiol*, 173(3), 264-273.
- Halm, S.T., Bottomley, M.A., Almutairi, M.M., Di Fulvio, M., Halm, D.R. 2017. Survival and growth of C57BL/6J mice lacking the BK channel, *Kcnma1*: lower adult body weight occurs together with higher body fat. *Physiol Rep*, 5, e13137.
- Hartzler, L., Dean, J.B., Putnam, R.W. 2007. Effects of hypercapnic acidosis on action potential properties of locus coeruleus neurons from the neonatal rat. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21, 6.
- Hunsberger, M.S., Mynlieff, M. 2020. BK potassium currents contribute differently to action potential waveform and firing rate as rat hippocampal neurons mature in the first postnatal week. *J Neurophysiol*, 124, 703-714.
- Imber, A.N., Putnam, R.W. 2012. Postnatal development and activation of L-type Ca²⁺ currents in locus ceruleus neurons: implications for a role for Ca²⁺ in central chemosensitivity. *J Appl Physiol* (1985), 112(10), 1715-1726.
- Imber, A.N., Patrone, L.G.A., Li, K.Y., Gargaglioni, L.H., Putnam, R.W. 2018. The role of Ca²⁺ and BK channels of Locus coeruleus (LC) neurons as a brake to the CO₂ chemosensitivity response of rats. *Neurosci.*, 381, 59-78.
- Knaus, H.G., Schwarzer, C., Koch, R.O., Eberhart, A., Kaczorowski, G.J., Glossmann, H., Wunder, F., Pongs, O., Garcia, M.L., Sperk, G. 1996. Distribution of high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in rat brain: targeting to axons and nerve terminals. *J Neurosci*, 16, 955-963.
- Koteja, P. 1996. Measuring energy metabolism with open-flow respirometric systems: which design to choose? *Funct. Ecol.*, 10, 675-677.
- MacDonald, S.H., Ruth, P., Knaus, H.G., Shipston, M.J. 2006. Increased large

- conductance calcium-activated potassium (BK) channel expression accompanied by STREX variant downregulation in the developing mouse CNS. *BMC Dev Biol*, 6, 37.
- Meredith, A.L., Thorneloe, K.S., Werner, M.E., Nelson, M.T., Aldrich, R.W. 2004. Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel. *J Biol Chem*, 279, (35), 46-52.
- Mortola, J.P. 1984. Breathing pattern in newborns. *J Appl Physiol.*, 56, 1533-1540.
- Nardi, A.E., Freire, R.C., Zin, W.A. 2009. Panic disorder and control of breathing. *Respir Physiol Neurobiol.*, 167(1), 133-143.
- Onimaru, H., Ballanyi, K., Homma, I. 2003. Contribution of Ca^{2+} -dependent conductances to membrane potential fluctuations of medullary respiratory neurons of newborn rats in vitro. *J Physiol*, 552, 727-741.
- Patrone, L.G.A., Ferrari, G.D, da Silva, R. M., Alberici, L.C, Lopes, N.P., Stabile, A.M., Klein W., Bícigo, K.C., Gargaglioni, L.H. 2023. Sex-and age-specific respiratory alterations induced by prenatal exposure to the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 in rats. *Br. J. Pharmacol.*, 180, 1766-1789.
- Putnam, R.W. 2001. Intracellular pH regulation of neurons in chemosensitive and nonchemosensitive areas of brain slices. *Respir Physiol*, 129, 37-56.
- Putnam, R.W., Filosa, J.A., Ritucci, N.A. 2004. Cellular mechanisms involved in CO_2 and acid signalling in chemosensitive neurons. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287, 1493-1526.
- Sausbier, M., Hu, H., Arntz, C., Feil, S., Kamm, S., Adelsberger, H., Sausbier, U., Sailer, C.A., Feil, R., Hofmann, F., Korth, M., Shipston, M.J., Knaus, H.G., Wolfer, D.P., Pedroarena, C.M., Storm, J.F., Ruth, P. 2004. Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca^{2+} -activated K^{+} channel deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 9474-9478.
- Sausbier, U., Sausbier, M., Sailer, C.A., Arntz, C., Knaus, H.G., Neuhuber, W., Ruth, P. 2006. Ca^{2+} -activated K^{+} channels of the BK-type in the mouse brain. *Histochem Cell Biol*, 125, 725-741.
- Valverde, M.A., Rojas, P., Amigo, J., Cosmelli, D., Orio, P., Bahamonde, M.I., Mann, G.E., Vergara, C., Latorre, R. 1999. Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science*, 285, 1929-1931.
- Wemmie, J.A. 2011. Neurobiology of panic and pH chemosensation in the brain. *Dialogues Clin Neurosci.*, 13(4), 475-483.
- Williams, J.T., North, R.A., Shefner, S.A., Nishi, S., Egan, T.M. 1984. Membrane properties of rat locus coeruleus neurones. *Neuroscience*, 13, 137-156.
- Wong-Riley, M.T.T., Liu, Q., Gao, X. 2019. Mechanisms underlying a critical period of respiratory development in the rat. *Respir Physiol Neurobiol*, 264, 40-50.
- Zhao, M.G., Hülsmann, S., Winter, S.M., Dutschmann, M., Richter, D.W. 2006. Calcium-regulated potassium currents secure respiratory rhythm generation after loss of glycinergic inhibition. *Eur J Neurosci*, 24, 145-154.

3. Avaliação do impacto das atividades do bolsista sobre o andamento do projeto

A participação do pós-doutor Luis Gustavo Patrone no progresso do *subprojeto 4.4* do presente Projeto Temático está sendo de grande importância devido à sua experiência consolidada em técnicas de eletrofisiologia e experimentos *in vivo* com neonatos. Sua atuação na implementação da colônia dos animais mutantes, bem como na instalação do aparato experimental de eletrofisiologia foi de notória relevância. Além disso, teve papel ativo no desenvolvimento e progresso de outros subprojetos do Temático, auxiliando no treinamento dos alunos, na instrução das análises de dados, redação de relatórios, bem como na participação de divulgação científica em eventos nacionais e internacionais. O bolsista dará continuidade aos protocolos experimentais em andamento, bem como no suporte teórico, técnico e científico aos colegas do laboratório.

4. Plano de Gestão de Dados

Os dados apresentados no presente relatório são parte de um Projeto Temático, sendo assim, todos os dados obtidos, bem como planilhas de análises e registros das variáveis serão colocados em uma plataforma de armazenamento de dados online (Google Drive-Gargaglioni's Lab) para a preservação das informações e dados, assim como para o compartilhamento dos mesmos com os membros da equipe envolvidos no Projeto Temático. Adicionalmente, os dados serão preservados no Repositório Institucional Unesp de acesso aberto no tipo Plano de Gestão de Dados (<http://hdl.handle.net/11449/236702>), em acordo com a política da instituição, para futuramente serem disponibilizados publicamente.

5. Apreciação do desempenho do bolsista pelo Coordenador do Projeto de Pesquisa

A bolsista apresentou uma participação ativa e dedicação nas atividades desenvolvidas no laboratório, auxiliando os alunos em diversos protocolos experimentais decorrentes do Projeto Temático, proporcionando assim um bom andamento do projeto até o momento.