

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE
RECEPTORES DA CLASSE OR EXPRESSOS NO
ÓRGÃO VOMERONASAL DE MAMÍFEROS**

***FUNCTIONAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
OR CLASS RECEPTORS EXPRESSED IN THE MAMMALIAN
VOMERONASAL ORGAN***

CAMPINAS

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

THIAGO SEIKE NAKAHARA

**“CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE
RECEPTORES DA CLASSE OR EXPRESSOS NO ÓRGÃO
VOMERONASAL DE MAMÍFEROS”**

**“FUNCTIONAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
OR CLASS RECEPTORS EXPRESSED IN THE MAMMALIAN
VOMERONASAL ORGAN”**

Este exemplar corresponde à
redação final da DISSERTAÇÃO
defendida pelo candidato

THIAGO SEIKE

NAKAHARA

e aprovada pela Comissão
Julgadora.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Papes

DISSERTAÇÃO apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção do
Título de Mestre em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética Animal e
Evolução.

DISSERTATION Presented to the Biolo-
gy Institute of the University of Campi-
nas as partial fulfillment of the require-
ments for the degree of Master, in the
area of Genetics and Molecular Biology

**CAMPINAS,
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

N145c Nakahara, Thiago Seike, 1989-
Caracterização molecular e funcional de receptores da classe OR expressos no órgão vomeronasal de mamíferos / Thiago Seike Nakahara. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Fabio Papes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Olfato. 2. Hibridação *in situ*. 3. Receptores acoplados a proteínas-G. 4. Receptores odorantes. I. Papes, Fabio, 1975-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Functional and molecular characterization of OR class receptors expressed in the mammalian vomeronasal organ

Palavras-chave em inglês:

Smell

In situ hybridization

Receptors, G-protein-coupled

Receptors, odorant

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Fabio Papes [Orientador]

Jörg Kobarg

Bettina Malnic

Data de defesa: 26-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, Março de 2014

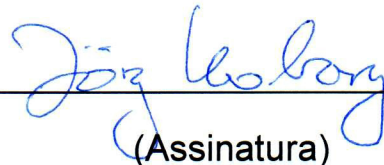
BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Fabio Papes (Orientador)



(Assinatura)

Dr. Jörg Kobarg



(Assinatura)

Profa. Dra. Bettina Malnic



(Assinatura)

Dr. José Andrés Yunes

(Assinatura)

Dra. Isabel Gerhardt

(Assinatura)

Abstract

The Olfactory System is a complex Sensorial System, comprised of some subsystems whose integration in the brain results in the appropriated interaction between animals and their environment, that is, proper behavioral or physiological answers to diverse situations to which these animals are exposed.

This System exhibits specialized features for detection of a given kind of stimuli. The Main Olfactory System detects volatile odorants in general while the Accessory Olfactory System detects pheromones. Apart from this formal distinction, recent studies have questioned this division and propose some overlap between them.

In the present study, we have investigated the expression of OR receptors in the Vomeronasal Organ whose expression level is compared to V2R Receptors (endogenous). We have isolated from these genes the Olfr692, which has the higher levels among the VNO-OR here studied and those discussed in the literature. These cells have been molecularly characterized and preliminary functional studies were also performed, searching for the possible biological functions of this Receptor, which could explain its expression in the Vomeronasal Organ.

Resumo

O Sistema Olfativo é um Sistema Sensorial complexo, composto por diversos subsistemas cuja integração no cérebro resulta na interação entre os animais e seus respectivos ambientes de maneira adequada. Essa adequação pode significar respostas comportamentais e fisiológicas distintas para situações diversas a que esses animais tenham sido expostos.

Esse Sistema exibe compartimentos especializados na detecção de estímulos de uma mesma natureza e nesse contexto, o Sistema Olfativo Principal é responsável pela detecção de odorantes voláteis em geral e o Sistema Olfativo Acessório é responsável pela detecção de feromônios. Apesar dessa divisão formal, estudos recentes questionam essa divisão e propõem sobreposição entre a função desses subsistemas.

Nesse estudo investigamos a expressão de receptores OR sendo expressos no Órgão Vomerosasal em níveis comparáveis aos receptores V2R (“endógenos”). Desses receptores, isolamos o receptor Olfr692 que possui o nível de expressão mais alto entre os OR estudados ou relatados anteriormente na literatura. As células que expressam o receptor Olfr692 foram caracterizadas molecularmente e foram feitos estudos preliminares a fim de investigar a função do receptor Olfr692 frente a possíveis funções biológicas que fossem capazes de explicar a expressão robusta de um receptor de classe OR no Órgão Vomeronasal.

Índice

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 SISTEMA OLFATIVO E SEUS SUBSISTEMAS	2
1.1.1 Sistema Olfativo Principal	3
1.1.2 Sistema Olfativo Acessório ou Vomeronasal	9
1.1.3 Órgão Septal de Masera (SOM)	12
1.1.4 Gânglio de Grueneberg	13
1.2 SEGREGAÇÃO ESPACIAL E FUNCIONAL DOS SUBSISTEMAS OLFATIVOS	14
1.3 DADOS PRELIMINARES À PROPOSIÇÃO DESTE ESTUDO.	15
2. METODOLOGIA	19
2.1 EXPOSIÇÃO DOS ANIMAIS C57BL6/J AOS ESTÍMULOS OLFATIVOS.	19
2.2 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS PARA HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i>	19
2.3 SÍNTESE DAS RIBOSSONDAS	20
2.4 HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> :	20
3. RELEVÂNCIA	25
4. OBJETIVOS	27
4.1 OBJETIVO GERAL	27
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	29
6. RESULTADOS	31
6.1 VALIDAÇÃO POR <i>REAL-TIME-PCR</i> DA EXPRESSÃO DE ORs NO VNO DE CAMUNDONGOS	31
6.2 CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> CROMOGÊNICA	33
6.3 CARACTERIZAÇÃO DOS VSNs OLFR692-POSITIVOS	39
6.3.1 Co-expressão entre receptores OR	40
6.3.2 Expressão de moléculas das vias de transdução de sinal clássicas dos OSNs e VSNs: Canais iônicos	41
6.3.3 Expressão de moléculas das vias de transdução de sinal clássicas dos OSNs e VSNs: Proteínas G	43
6.3.4 Colocalização com moléculas H2-Mv	47
6.3.5 Sobreposição com a expressão de receptores V2R	48

6.4 INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL PRELIMINAR DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS VOMERONASAIS EXPRESSANDO ORS.....	52
6.4.1 <i>Exposição a estímulos relacionados a predadores e a estímulos intraespecíficos conhecidos</i>	52
6.4.2 <i>. Os receptores OR expressos no VNO pertencem à classe I de receptores de odorantes, que detectam ácidos alifáticos</i>	54
6.4.3 <i>Ensaio de exposição a Ácidos Alifáticos utilizando o IEG Egr1</i>	58
6.4.1 <i>Ensaios de detecção de Ácidos Alifáticos pelo receptor Olfr692 em sistemas heterólogos</i>	59
6.4.2 <i>Exposição de animais a compostos presentes no leite e a odores de fêmeas lactantes</i>	62
6.5 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS DE TEMPO DE DESMAME NATURAL (NWT) PARA ESTUDAR A POSSÍVEL FUNÇÃO DOS RECEPTORES OR NA DETECÇÃO DO LEITE	64
7. DISCUSSÃO	69
7.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES OR NO ÓRGÃO VOMERONASAL	69
7.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CÉLULAS OLFR692-POSITIVAS	71
7.2.1 <i>Expressão de moléculas das vias de transdução de sinal clássicas dos OSNs e VSNs</i>	71
7.2.2 <i>Colocalização com as moléculas H2-M10</i>	72
7.2.3 <i>Sobreposição com a expressão de receptores V2R</i>	72
7.3 ESTUDOS PRELIMINARES SOBRE A FUNÇÃO DO RECEPTOR OLFR692	74
7.3.1 <i>Exposição ao Leite Como Fonte de Estímulo Olfativo</i>	76
8. CONCLUSÕES	79
9. REFERÊNCIAS	81
10. APÊNDICE	85
11. ANEXOS	87
11.1 MANUSCRITO DO ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA CELL.....	88
11.2 DOCUMENTAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	162

*À minha mãe, Silvana Aniquiário
Nakahara, in memoriam, cuja degenerescência
me serve de motivação para ultrapassar as
fronteiras do conhecimento. Que um dia um
trabalho como este traga uma solução para
sofrimentos como os que ela passou.*

Agradecimentos

Aos meus pais, Akira e Silvana, para quem a minha educação esteve como prioridade durante a maior parte de suas vidas, que quiseram, acreditaram e dedicaram parte de suas vidas para que eu pudesse ter acesso à melhor educação que eles pudessem me proporcionar e tanto conforto quanto estava à sua disposição para me oferecer.

Ao meu companheiro, Renan (Daniel), que esteve comigo ao longo dos últimos anos (nem sempre presencialmente), com quem sempre pude contar para dividir dores, angústias e dificuldades, mas também para dividir alegrias, comemorações e realizações. Tornou cada esforço mais suave, cada dificuldade mais tranquila e cada momento mais alegre. Sem a leveza do amor, viver seria um peso.

Ao meu querido amigo Marcio Ricardo de Carvalho (Marcio Sociais) (*in memoriam*), talvez a pessoa mais generosa que eu conheci. Por ter me ensinado grande parte de como ser um ser humano melhor, mais sensível e mais generoso e ao mesmo tempo ter me ensinado tanto sobre política em longas seções de “psicanapolítica” no Restaurante Universitário. Até mesmo sua perda e ensinou sobre a vida e a humanidade.

Ao meu orientador, Fabio Papes, por acreditar em mim e ter me ensinado tudo o que eu sei sobre Biologia Molecular, pelas conversas e pelas discussões sobre nossos experimentos ao longo das quais minha capacidade de forjar hipóteses e pensar mecanismos para testá-las foi extremamente estimulada. Mas gostaria de agradecer especialmente por ter sido compreensivo pelos momentos em que minha dedicação ao projeto foi inferior à ideal, já que a vida não é feita das nossas idealizações.

Aos queridos colegas de laboratório Vinícius, Fabio Conte, Felipe, Guilherme, Mateus, e especialmente à Juliana, técnica do laboratório, que além de ter sido indispensável para a manutenção do laboratório e bom andamento da pesquisa, era uma colega incrivelmente divertida, pela construção de um ambiente de trabalho agradável e divertido. Aos colegas que já não compõem nosso grupo, Felipe Beato, Leonardo Cardozo, Marcio Hirata, Renato Oliveira, Cesar, Gabriel, Laila e Natália.

Aos meus queridos amigos com quem eu sempre pude compartilhar as delícias e agruras da vida, amizades que apesar de correrem o risco de esmaecimento pela erosão do

tempo, certamente inscreveram sua importância na minha história, e, cada uma à sua maneira, me transformaram no que eu me tornei até agora. Eu amo a todos vocês e cada um de vocês teve grande importância na minha vida Denise Alves da Silva, Victor Gomes, Camila Ventura, Lucas Braga, Gabriel Oliveira, Pedro Alves, Tiago Bizarri, Mauricio Gabriel, Luiz Fernando Lemos, Miriam Porfírio, Isabela Carvalho, Erica Prates, João Paulo Nasário e Ana Paula Andrade.

Aos meus professores, que certamente contribuíram para que eu aprendesse a valorizar a educação, enquanto indivíduo, não apenas como uma oportunidade de transição social, mas também como um meio de transpor limites culturais, como um meio para compreender o mundo à nossa volta das mais diversas formas e como um meio para ter acesso à produção e divulgação da própria Ciência. Certamente vocês deram outro tom, outra fé para o meu desejo de ir mais longe e mais profundamente da busca pelo conhecimento.

Ao Prof. Dr. José Andrés Yunes, por sempre nos disponibilizar, a qualquer tempo, seu microscópio de fluorescência e à Janine, ao Paulo e ao Felipe pelo apoio técnico na utilização do microscópio confocal.

Ao CNPQ e à FAPESP, pelo financiamento que torna possível que o foco dos estudantes de pós-graduação esteja em seus respectivos estudos. Sem financiamento, pessoas como eu certamente não teriam acesso à pós-graduação.

Índice de ilustrações

Figura 1: Os subsistemas Olfativos em mamíferos: representação esquemática de uma hemicabeça de roedor representando os subsistemas componentes do sistema olfativo.	3
Figura 2: Representação esquemática do neuroepitélio sensorial.	4
Figura 3: Neurônios Sensoriais Olfativos do Sistema Olfativo Principal enviam axônios para o Bulbo Olfativo Principal.	6
Figura 4: Representação esquemática da cadeia de transdução de sinal dos OSNs que expressam receptores OR.	7
Figura 5: Populações apical e basal do VNO projetam para regiões distintas no Bulbo Olfativo Acessório e expressam conjuntos de receptores distintos.	10
Figura 6: Dados de FPKM de receptores OR em comparação com outros receptores V1R e V2R expressos no Órgão Vomeronasal.	15
Figura 7: PCR em tempo real (Real-Time PCR) revelando a expressão singular de Olfr692 no VNO.	32
Figura 8: Hibridação in situ para verificação da expressão de ORs no VNO.	36
Figura 9: Comparação entre o número de células positivas para o Receptor Olfr692 e o Receptor Olfr78.	36
Figura 10: Hibridação in situ para verificação da expressão de outros ORs no VNO.	37
Figura 11: Expressão do receptor Olfr692 do dia do nascimento à idade adulta.	38
Figura 12: Caracterização Molecular das células Olfr692-positivas quanto à colocação de receptores OR:	41
Figura 13: Caracterização molecular das células expressando ORs no VNO.	43

Figura 14: As células expressando Olfr692 no VNO não são OSNs ectopicamente localizados.	44
Figura 15: Proteínas G expressas nas células que expressam receptores OR:	46
Figura 16: Co-expressão de Olfr692 com genes M10 expressos na camada basal do VNO.	48
Figura 17: O receptor Olfr692 é co-expresso com receptores de classe C da família V2R.	49
Figura 18: Ausência de co-expressão de Olfr692 com V2Rs.	51
Figura 19: Células Olfr692-positivas não são ativadas por odor de sexo oposto ou predadores.	55
Figura 20: Árvore de genes, mostrando as relações de similaridade (ao nível de proteína) entre os membros da classe I de receptores OR.	56
Figura 21: Representação do Cromossomo 7 onde se encontra o Cluster de receptores OR de Classe I.	57
Figura 22: Receptores Olfr691, Olfr638 e Olfr569 não expressos no VNO.	58
Figura 23: Ácidos alifáticos na concentração de 100mM não são capazes de deflagrar ativação de receptores Olfr692-positivos no VNO.	59
Figura 24: Células expressando o receptor Olfr692 em ensaio heterólogo não são ativadas pelos ácidos alifáticos ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico e ácido decanoico.	60
Figura 25: A exposição de animais C57Bl6J a fêmeas lactantes causa a ativação de neurônios sensoriais no VNO.	63
Figura 26: Células Olfr692-positivas não são responsivas à exposição ao leite de camundongos:	65
Figura 27: Avaliação do tempo médio até mamada	67

Abreviaturas e Siglas

OB: Bulbo Olfatório

MOS: Sistema Olfativo Principal

MOE: Epitélio Olfativo Principal

MOB: Bulbo Olfativo Principal

OSNs: Neurônios Sensoriais Olfativos do MOE

OR: Família de Receptores Olfativos do MOE

AOS: Sistema Olfativo Acessório

AOB: Bulbo Olfativo Acessório

VNO: Órgão Vomeronasal

VSNs: Neurônios Sensoriais Olfativos do VNO

V1R: Família de Receptores Olfativos da população apical do VNO

V2R: Família de Receptores Olfativos da população basal do VNO

SOM: Órgão Septal de Maser

GG: Gânglio de Grueneberg

OMP: Proteína Marcadora do Sistema Olfativo

GC-D: Receptores acoplados à Guanilil-Ciclase D

TAAR: Receptores Associados à Traços de Aminas

1. Introdução

A comunicação química dos indivíduos com o ambiente é de extrema importância para a maioria dos organismos. Esse tipo de informação sensorial permite aos animais acessar grande variedade de informações do ambiente e consequentemente gerar respostas endócrinas e comportamentais adequadas. Para tanto, os animais, incluindo os humanos, contam com mais de um sistema de quimiodeteção: o sistema gustatório e o sistema olfativo são os dois sistemas responsáveis pela comunicação química com o ambiente.

Destes sistemas quimiossensoriais, o sistema olfativo possui grande poder de resolução: ele é capaz de detectar uma ampla variedade de estímulos que pode ir de pequenas moléculas voláteis a peptídeos e proteínas, de odorantes relacionados à alimentação a informações sobre a presença de predadores. A maneira como a detecção desses estímulos e seu processamento se dão ainda não é completamente compreendida, mas sua importância na dinâmica de relações intra e interespecíficas tem sido apreciada nas últimas décadas.

Através do Sistema Olfativo, os indivíduos são capazes de avaliar características importantes do ambiente como presença e qualidade dos alimentos, presença de toxinas, parceiros sexuais e seus respectivos status fisiológicos e a presença de predadores. Esse sistema dota os organismos da capacidade de se comunicar quimicamente com seu ambiente e com os indivíduos que os circundam, estando envolvido na gênese de respostas endócrinas e comportamentais adequadas.

No presente trabalho, estudamos o Sistema Olfativo de camundongos, como modelo para o Sistema Olfativo de Mamíferos, já que existe alto nível de similaridade entre os sistemas olfativos de diversos animais deste grupo taxonômico, inclusive humanos. As descrições anatômicas, fisiológicas e moleculares a seguir serão sobre o sistema olfativo de roedores.

A interface sensorial do sistema olfativo está anatomicamente localizada na Cavidade Nasal. Entretanto, apesar de seus órgãos sensoriais estarem localizados anatomicamente próximos, o Sistema Olfativo não é um sistema simples ou homogêneo. Ao

contrário, ele é um sistema complexo composto por alguns subsistemas, cuja separação se dá em diversos níveis: anatômico, histológico, molecular e funcional. Seus subsistemas ocupam posições anatômicas distintas dentro da cavidade nasal e a dinâmica específica da interface sensorial difere entre um sistema e outro. Os feixes axonais provenientes desses sistemas distintos são projetados para regiões diferentes no cérebro e, com isso, podem ter um efeito diferente na interpretação dos estímulos.

1.1 Sistema Olfativo e Seus Subsistemas

O Sistema Olfativo é capaz de reconhecer dezenas de milhares de moléculas e, de distinguir entre moléculas quimicamente semelhantes. Devido a essa variedade de odorantes que os organismos são capazes de detectar e reconhecer, é esperado que exista um grande número de receptores, e, portanto a especialização dos sistemas olfativos não é surpreendente.

Por exemplo, acreditou-se por algum tempo em uma divisão abrupta entre as funções para o sistema olfativo principal, que seria responsável pela detecção de odorantes em geral e o sistema olfativo acessório ou vomeronasal, que seria responsável – exclusivamente – pela detecção de feromônios.

Os subsistemas do Sistema Olfativo serão apresentados brevemente a seguir, com ênfase para o Sistema Olfativo Principal e para o Sistema Olfativo Acessório ou Vomeronasal, em que estivemos especificamente focados para o desenvolvimento do presente estudo.

A **figura 1** mostra a cavidade nasal com todos os subsistemas até o nível do Bulbo Olfatório, e serve de guia para a localização anatômica de cada um dos subsistemas. Os subsistemas aqui apresentados são: O Sistema Olfativo Principal (MOS) tem seu epitélio e o Bulbo Olfativo representados em bege; o Sistema Olfativo Acessório ou Vomeronasal (AOS), com suas populações V1R e V2R e as regiões correspondentes do Bulbo Olfativo Acessório estão representadas em vermelho e verde, respectivamente; o Gânglio de Grueneberg (GG), representado em amarelo e o Órgão Septal de Maser (SOM) representado em azul.

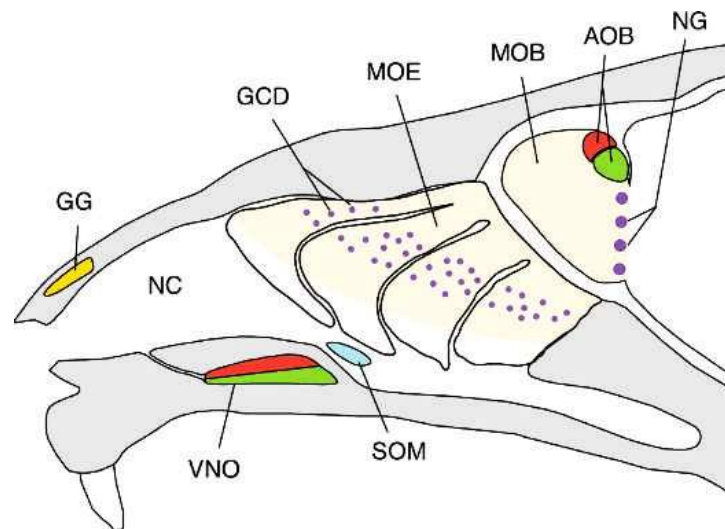


Figura 1: Os subsistemas Olfativos em mamíferos: representação esquemática de uma hemicabeça de roedor representando os subsistemas componentes do sistema olfativo. Em bege estão representados os componentes do Sistema Olfativo Principal (MOS), o Bulbo Olfativo e o Epitélio Olfativo Principal (MOE), dentro dessa região se encontram células GC-D-positivas e seus respectivos glomérulos no OB (necklace glomeruli). Em vermelho e verde estão os componentes do Sistema Olfativo Acessório ou Vomeronasal, que se tratam de duas populações distintas: V1R, que está representada em vermelho no VNO, bem como a região que recebe aferências desses neurônios no Bulbo Olfativo Acessório (AOB); em verde, está sendo representada a população V2R de Neurônios Sensoriais Vomeronasais (VSNs). Em azul observamos o Órgão Septal de Masera (SOM) e em amarelo o Gânglio de Grueneberg (GG), cuja função ainda é desconhecida. Figura retirada de (BRENNAN; ZUFALL, 2006).

1.1.1 Sistema Olfativo Principal

Anatomia

O Sistema Olfativo Principal possui três componentes principais:

- Um epitélio sensorial olfativo que reveste protuberâncias cartilaginosas chamadas turbinados na região posterior da cavidade nasal (FIRESTEIN, 2001; TIRINDELLI et al., 2009).
- O Bulbo Olfatório, para onde os neurônios sensoriais olfativos projetam prolongamentos axonais. No bulbo olfatório, existem os glomérulos olfativos, estruturas importantes para a organização da informação olfativa. As Células Mitrals formam os glomérulos, e enviam prolongamentos axonais para estações superiores de processamento do cérebro.
- Tais estações representam o terceiro componente deste subsistema Olfativo.

Histologia

O Sistema Olfativo Principal possui como estrutura de interface sensorial o Epitélio Olfativo Principal (MOE), que é um epitélio especial, pseudoestratificado composto principalmente por 3 tipos celulares distintos: Neurônios Sensoriais Olfativos, Células de Suporte, e Células Basais (**Fig. 2**). (TIRINDELLI et al., 2009). A peculiaridade deste epitélio é que devido à sua função sensorial, ele é formado não por células epiteliais, mas por neurônios sensoriais.

Os Neurônios Sensoriais Olfativos são células bipolares que projetam um único dendrito para a cavidade nasal; esse dendrito termina em um tipo de nó de onde são emitidos de 20 a 30 cílios para a cavidade nasal, que permanecem imersos em muco. Estes cílios são regiões especializadas dos neurônios olfativos, onde estão localizados os seus Receptores Olfativos, moléculas que se ligam aos odorantes para a detecção do estímulo. No polo oposto ao dendrito, a célula possui um axônio que atravessa a placa cribiforme e se dirige a estruturas chamadas glomérulos olfativos no Bulbo Olfativo (MOMBAERTS et al., 1996).

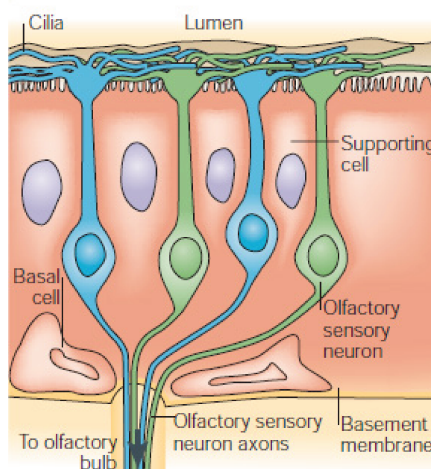


Figura 2: Representação esquemática do neuroepitélio sensorial. O epitélio sensorial olfativo é composto por 3 tipos celulares principais: os neurônios sensoriais olfativos, as células de suporte e as células basais. Os OSNs são células bipolares de onde se originam um único dendrito e um axônio. Esse dendrito se projeta para o lúmen do MOE em direção à cavidade nasal e termina em um “nó” de onde se originam 20 a 30 cílios onde são expressos os receptores olfativos (OR).
Figura Retirada de (MOMBAERTS, 2004)

As células de suporte são as responsáveis pela sustentação dos neurônios sensoriais. E as células basais são células responsáveis pela reposição neurogênica dos OSNs.

Os glomérulos olfativos são neurópilos no Bulbo Olfativo (**Fig. 3**) em que ocorrem as sinapses entre os axônios dos OSNs e os dendritos de células mitraes, que enviam a informação olfativa a regiões superiores de processamento no cérebro.

Biologia Molecular

O Sistema Olfativo Principal possui um epitélio bastante complexo, do ponto de vista celular e molecular porque possui diferentes populações de Neurônios Sensoriais. Esse sistema é o responsável pela detecção da maioria dos odorantes e já teve alguns de seus receptores deorfanizados.

As populações conhecidas de neurônios sensoriais são: os OSNs canônicos, que expressam receptores OR, OSNs que expressam GC-Ds e OSNs que expressam receptores para compostos aminados, chamados TAARs, além dos OSNs que expressam canais iônicos TRPC. Algumas dessas populações serão descritas a seguir, já que cada uma delas possui suas peculiaridades em relação à transdução de sinal e funcionalidade na medida em que cada população possui um conjunto de ligantes próprio.

OSNs canônicos

A população de OSNs Canônicos é a mais numerosa do MOE. Esses neurônios sensoriais expressam receptores OR, que são receptores metabotrópicos pertencentes à família das GPCRs de classe A. Esses receptores compõem uma família de cerca de 1200 membros e foram descritos pelos pesquisadores Richard Axel e Linda Buck, rendendo a esses pesquisadores o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina no ano de 2004 (BUCK; AXEL, 1991).

A expressão desses receptores obedece a uma lógica muito peculiar: São expressos de maneira monogênica e monoalélica no Epitélio Olfativo. Cada OSN “escolhe” um determinado receptor para expressar entre os 1200 receptores disponíveis (MALNIC et al., 1999; SERIZAWA et al., 2004). Além dessa expressão monogênica, a expressão de receptores OR em OSNs se dá de maneira espacialmente segregada no MOE: esses receptores são expressos em OSNs que ocupam zonas específicas que se distribuem dorso-

lateralmente no MOE e essa distribuição se dá obedecendo a subfamílias de ORs (VASSAR et al., 1993).

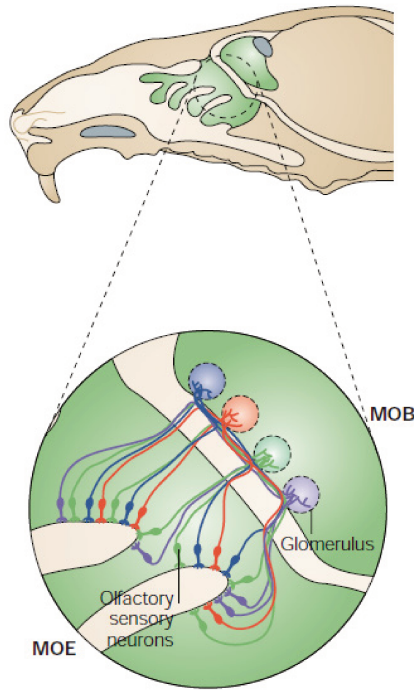


Figura 3: Neurônios Sensoriais Olfativos do Sistema Olfativo Principal enviam axônios para o Bulbo Olfativo Principal. Para cada receptor expresso no MOE existem um ou dois glomérulos olfativos no Bulbo Olfativo Principal. Cada receptor possui uma população de células que o expressam, cujos axônios coalescem àquele um ou dois glomérulos olfativos no bulbo olfatório. Figura retirada de Mombaerts 2004

Tais OSNs também expressam uma proteína G que se associa à porção intracelular do receptor e, através de uma cascata de reações específica que será descrita abaixo, transformam este evento de detecção em atividade elétrica neuronal. Uma característica interessante sobre o Sistema Olfativo é que ele expressa subunidades α específicas de proteínas G. O Sistema Olfativo Principal (MOS) expressa em seus OSNs a subunidade $G_{\alpha\text{olf}}$ (JONES; REED, 1988) e o VNO expressa outras duas subunidades distintas que serão discutidas oportunamente.

A cascata de reação mediada pela proteína $G_{\alpha\text{olf}}$ envolve a síntese de cAMP dentro das células através da ativação de uma adenilato-ciclase, que sensibiliza canais iônicos que essas células expressas chamados Canais Iônicos Sensíveis a Nucleotídeo Cíclico (CNGCs). Esses canais permitem a entrada de cálcio no neurônio sensorial, que por

sua vez desencadeia a abertura de canais de cloro (**Fig. 4**). A combinação da abertura desses dois canais é responsável pela despolarização desses neurônios e consequente transmissão da informação de detecção de um odorante para a próxima estação de processamento.

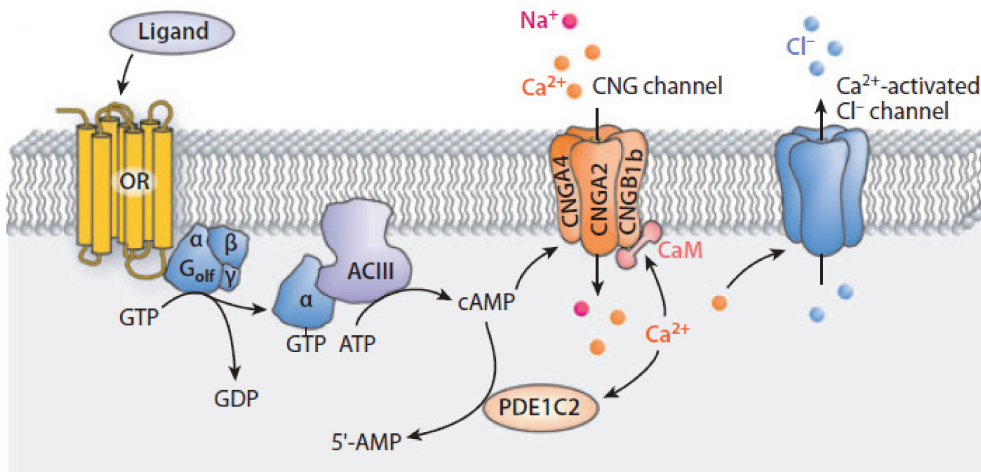


Figura 4: **Representação esquemática da cadeia de transdução de sinal dos OSNs que expressam receptores OR.** Quando ocorre a ligação do ligante ao receptor OR ocorre um desacoplamento da proteína G que ativa a Adenilil-ciclase III, causando um acúmulo de cAMP. Esse aumento causa a abertura dos canais de cálcio dependentes de nucleotídeo cíclico. O aumento da concentração de Ca^{2+} causa a abertura de canais de Cl^- ainda não identificados, causando despolarização do OSN. Figura Retirada de Mombaerts 2004

De acordo com os estudos que deorfanizaram ORs até agora, os OSNs canônicos têm por ligantes moléculas voláteis de diferentes famílias químicas (MALNIC et al., 1999; SAITO et al., 2009a; NGUYEN et al., 2012). Grande parte dos OSNs reconhece mais de um odorante. Alguns receptores OR também podem se comportar de maneira menos generalista, reconhecendo apenas um ligante (KAUPP, 2010). Entretanto, a detecção de odorantes voláteis se dá de maneira combinatorial, ou seja, um mesmo odorante é reconhecido por um conjunto de receptores, cuja codificação se dá no Bulbo Olfatório.

Esse padrão é integrado na estação superior de processamento, o Bulbo Olfatório, para onde os OSNs enviam prolongamentos axonais. Existem um ou dois glomérulos olfativos por receptor expresso no MOE e cada OSN envia um axônio especificamente para o glomérulo correspondente ao receptor que o neurônio sensorial expressa.

Cada glomérulo corresponde a um Receptor Olfativo, mas a detecção de um determinado odorante por uma combinação de receptores leva à ativação dos glomérulos olfativos correspondentes (MALNIC et al., 1999). Isso também significa que um mesmo glomérulo pode ser ativado por dois ligantes diferentes, inclusive com significados biológicos distintos. A combinação entre os glomérulos ativados e não a ativação individual de cada glomérulo é o que informa a identidade molecular do ligante.

OSNs GC-D

Além dos OSNs canônicos, existem outras populações de OSNs que não expressam receptores OR. Uma dessas populações é composta por OSNs que expressam receptores tipo GC, constituindo apenas uma pequena população dos OSNs do MOE, cerca de 0,1% dos Neurônios Sensoriais Olfativos. A maior densidade de OSNs GC-D+ se localiza nos ectoturbinaados, que são as circunvoluções externas dos turbinados, mas eles também podem ser encontrados nos endoturbinaados e no Órgão Septal de Maser (discutido no final desta introdução).

Ao invés da expressão de uma Adenilil-ciclase III e a abertura de um canal de membrana CNGA2, esses neurônios expressam uma subunidade diferente do canal de membrana CNGA, o CNGA3, sensível ao cGMP.

O ligante para os receptores GC-D são os peptídeos guanilina e uroguanilina, hormônios peptídicos presentes na urina, além disso, os receptores são também responsivos à própria urina de machos ou de fêmeas diluída e por conta desses produtos, sugere-se que sua função esteja relacionada à obtenção de informações sobre o status metabólico do indivíduo. (LEINDERS-ZUFALL et al., 2007).

Os neurônios GC-D enviam axônios para glomérulos específicos no Bulbo Olfatório, que se localizam em uma espécie de colar, em que os glomérulos se distribuem como contas (*necklace glomeruli*) que circundam a região caudal do Bulbo Olfativo (JULIFS et al., 1997).

TAARs

Outra população de OSNs é a que expressa Receptores Associados aos Traços de Aminas (TAARs), que fazem parte da família das GPCRs, mas, diferentemente dos

receptores OR, estão mais intimamente relacionados aos receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos. (LIBERLES; BUCK, 2006).

A maioria dos OSNs TAAR+ não apresenta sobreposição entre os receptores que expressam e essas células não expressam receptores OR, apesar de apresentarem expressão de proteína $G_{\alpha\text{olf}}$, o que até agora tem sido correlacionado com uma cascata de transdução baseada em cAMP, como ocorre nos OSNs canônicos. Sua distribuição se dá de maneira zonal no MOE, como ocorre com os ORs e ainda não se sabe se existem regiões preferenciais para o direcionamento axonal desses OSNs no Bulbo Olfatório.

Esses receptores constituem uma família de 9 genes e alguns deles já foram deorfanizados. Eles respondem a compostos aminados presentes na urina e respostas a esse tipo de compostos indicam que os TAARs podem funcionar como receptores de feromônios voláteis. Por exemplo, isoamilamina, o ligante para o receptor mTAAR3, foi relatado como responsável para aceleração da puberdade em fêmeas (NISHIMURA et al., 1989; LIBERLES; BUCK, 2006).

1.1.2 Sistema Olfativo Acessório ou Vomeronasal

Anatomia

O sistema Olfativo Acessório ou Vomeronasal (AOS) é composto pelo Órgão Vomeronasal, um pequeno órgão tubular que se encontra dentro do osso vômer, pelo Bulbo Olfativo Acessório e por estações superiores de processamento.

O Órgão Vomeronasal ou VNO, é um pequeno tubo oco, cujo lúmen se comunica com a cavidade nasal através de um pequeno orifício. O fluxo de ar para dentro do Órgão é controlado pelo fluxo sanguíneo de um vaso que percorre longitudinalmente o VNO.

O segundo componente do AOS é o Bulbo Olfativo Acessório, que se localiza na região posterior do Bulbo Olfativo e recebe projeções axonais dos neurônios vomeronasais. E por fim, o AOS também é composto por regiões superiores de processamento e interpretação do estímulo olfativo.

Histologia

O Órgão Vomeronasal, possui, como o MOE, um neuroepitélio sensorial, pseudoestratificado, com a mesma estrutura geral do MOE: neurônios sensoriais olfativos (VSNs), células sustentaculares (ou células de suporte) e células basais.

O Bulbo Olfativo Acessório (AOB) também possui glomérulos olfativos, entretanto, sua organização é mais complexa do que a organização glomerular do MOB. Os VSNs não projetam para um único glomérulo representante de um determinado receptor, ao contrário, exibem um padrão de organização das projeções glomerulares que é complexo e pouco conhecido (**Fig. 5**).

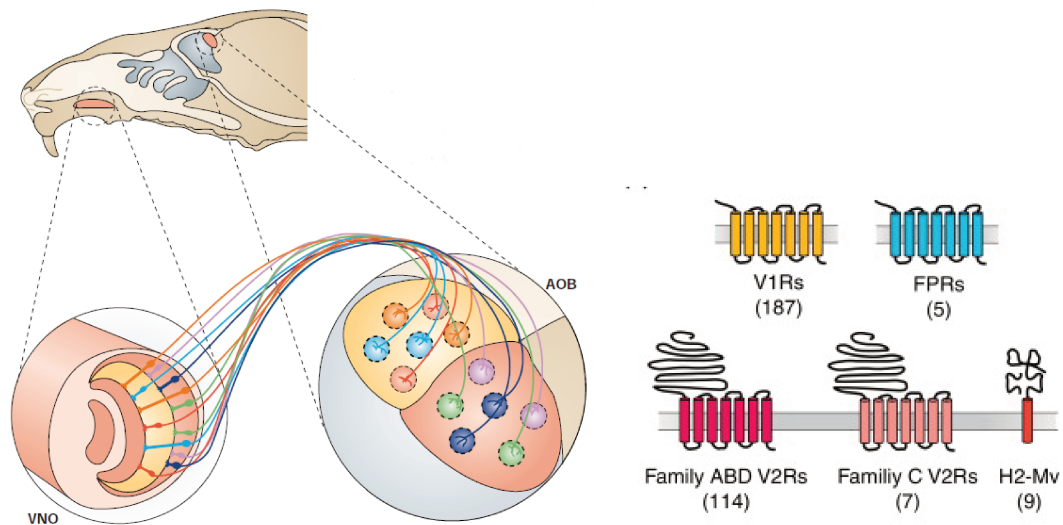


Figura 5: Populações apical e basal do VNO projetam para regiões distintas no Bulbo Olfativo Acessório e expressam conjuntos de receptores distintos. A população que ocupa a porção apical do VNO expressa receptores V1R, além de uma pequena população que expressa uma família VNO-específica de FPRs (Receptores de Peptídeos Formilados). A população da porção basal expressa receptores V2R de classes A, B ou D e expressam conjuntamente um receptor V2R de classe C e, além disso, a população basal também expressa moléculas H2-Mv, de função misteriosa.

Biologia Molecular

VSNs V1R

O Órgão Vomeronasal possui duas populações distintas de neurônios sensoriais. Uma das populações ocupa a porção apical do VNO, composta por neurônios sensoriais que expressam receptores da família multigênica V1R que possui cerca de 200 membros e, como os receptores olfativos OR, pertencem à classe A da família das GPCRs.

Os VSNs da população V1R expressam a subunidade $G_{\alpha 2}$ de proteínas G, que é um marcador específico para essa população. Diferentes dos ORs, que possuem uma especificidade menor e muitos dos receptores são responsivos a um grande número de ligantes, esses VSNs detectam moléculas voláteis com alta especificidade. Esses ligantes voláteis são moléculas presentes na urina de indivíduos da mesma espécie, que são feromônios para esses animais (LEINDERS-ZUFALL et al., 2000).

VSNs V2R

A segunda população de VSNs do Órgão Vomeronasal, que ocupa a porção basal do neuroepitélio olfativo, expressa receptores de família V2R, pertencentes à superfamília das GPCRs de classe C. Os V2Rs constituem uma família de receptores olfativos que possui cerca de 100 membros (HERRADA; DULAC, 1997).

Diferente dos receptores V1R, os receptores V2R não são expressos individualmente na população basal de VSNs do VNO; ao contrário, essa população de VSNs sempre expressa seus receptores de maneira combinatorial. Essa combinação não se dá de maneira aleatória entre os receptores, ao invés disso, um receptor de clado C (Vmn2r1 a Vmn2r7) é sempre expresso na mesma célula em que um receptor de outros clados de receptores Vomeronasais V2R (A, B ou D) (MARTINI et al., 2001).

Além de expressarem mais de um receptor em uma mesma célula, VSNs da população basal do VNO também expressam moléculas MHC de uma família especificamente encontrada em células do VNO. Ensaios in vitro demonstram que as porções extracelulares dessas moléculas interagem entre si e, mais do que isso, participam de processos de transporte de receptores e outras moléculas para a membrana citoplasmática (LOCONTO et al., 2003).

Os VSNs V2R transduzem sinal através do gene TrpC2, um canal iônico de cálcio e sódio expresso em todos os VSNs, tanto na população apical quanto na camada basal do VNO (V1Rs e V2Rs). Esses VSNs expressam a subunidade $G_{\alpha o}$ de proteínas G e apesar do mecanismo de funcionamento dessas células provavelmente ser muito próximo do mecanismo de transdução dos neurônios V1R, pouco é conhecido sobre o mecanismo de transdução dessas células.

Entre os membros dessa classe de GPCRs estão receptores metabotrópicos de Glutamato, receptores gustatórios e mesmo receptores de Ca^{2+} . Eles possuem a especificidade de possuírem uma longa cauda extracelular e, tal como o receptor de Glutamato e é provável que seus ligantes sejam moléculas hidrossolúveis. Foi demonstrado que proteínas MUP (Major Urinary Proteins) são capazes de ativar in vitro neurônios $\text{G}_{\alpha\text{o}}$ -positivos dissociados do VNO (PAPES et al., 2010; CHAMERO et al., 2012).

1.1.3 Órgão Septal de Maseira (SOM)

Anatomia

O Órgão Septal, também chamado Órgão Septal de Maseira, é composto de duas ilhas de tecido sensorial, uma de cada lado do septo nasal, posterior ao ducto Nasopalatino e anterior ao ducto nasofaríngeo. A superfície ocupada pelo SOM é bastante variável entre indivíduos e pode variar até mesmo entre suas porções contralaterais em um mesmo indivíduo (ADAMS; MCFARLAND, 1971). A posição estratégica que o órgão ocupa, na abertura do ducto nasopalatino, o coloca em uma possibilidade de captar compostos vindos da cavidade oral, quer compostos voláteis quer não voláteis (BREER et al., 2006).

Histologia

O Órgão Septal é composto por um epitélio sensorial olfativo e, da mesma forma que o Epitélio Olfativo Principal (MOE), possui neurônios sensoriais ciliados, além de células sustentaculares que são responsáveis pela manutenção da estrutura do epitélio e células basais. Seu epitélio olfativo possui uma a três camadas de neurônios olfativos enquanto o MOE possui cerca de 6 a 8 camadas na maior parte das regiões (WEILER, 2003).

Biologia molecular

O Órgão Septal de Maseira expressa cerca de 80 receptores OR. A grande maioria deles possui um nível de expressão abaixo daquele em que esses mesmos receptores OR são expressos no MOE. Entretanto, ocorre um enriquecimento de 11 receptores OR, cujos níveis de expressão se destacam em relação aos demais (TIAN; MA, 2004).

Cerca de metade desses neurônios (49,8%) expressam o receptor *Olf124* (*MOR256-3*) (TIAN; MA, 2004), que é um receptor responsivo a diversos compostos

(cânfora, uma cetona, acetato de amila, um éster, benzaldeído e heptanal, aldeídos e ácido octanóico, um ácido alifático (GROSMAITRE et al., 2009)

Os demais receptores possuem uma representatividade menor entre as células do SOM, mas possuem seu nível de expressão superior ao observado no MOE e estão distribuídos no epitélio da seguinte maneira: *Olfr1509 (MOR244-3)*: 12,2%; *Olfr455 (MOR0-2)*: 8%; (*MOR235-1*): 6,5%; (*MOR160-2*): 4,7%; (*MOR122-1*): 3,7%; (*MOR160-5*): 2,9%; (*MOR236-1*): 2,6%; (*MOR244-3*): 1,3%; (*MOR271-1*): 0,4%; (*MOR232-2*): 0,2%. Todos esses receptores pertencem à Classe II de receptores OR e no MOE também se encontram agrupados espacialmente na zona 4 do MOE (TIAN; MA, 2004).

1.1.4 Gânglio de Grueneberg

Anatomia

O gânglio de Grueneberg é um pequeno gânglio localizado bilateralmente na região rostro-dorsal na cavidade nasal, nas extremidades entre o septo nasal e o “teto” da cavidade nasal próximo às narinas, entretanto, não possui comunicação direta com a cavidade nasal. Existe uma discussão de que ele faça parte do nervo terminal e contra esse argumento existe o fato de não possuir síntese de hormônio luteinizante, que é característica do nervo terminal e o fato de as células serem OMP+. Suas células projetam ao longo do septo nasal e através da superfície medial do Bulbo Olfativo Principal para atingir a porção posterior do MOB caudal, próximo ao AOB (FLEISCHER et al., 2006).

Histologia

Suas células não parecem possuir dendritos proeminentes, cílios e microvilosidades, além disso, essas células se organizam em um epitélio filiforme tendo uma camada simples de células OMP-positivas sob a fina camada epitelial do vestíbulo nasal. Para comparação, os epitélios olfativos do MOE e do VNO são constituídos de epitélios pseudoestratificados, mais complexos do que as células do GG (FLEISCHER et al., 2006).

Biologia molecular

Da mesma maneira como outras células do Sistema Olfativo, as células do Gânglio de Grueneberg expressam o marcador de células olfativas OMP (Olfactory Marker Protein), que permitiram a identificação dessa população de células como possível membro

do sistema olfativo. Além disso, a maior parte das células do GG expressam o receptor *Vmn2r2* (V2R83) e as subunidades $G_{\alpha 2}$ e $G_{\alpha o}$ de proteínas G em indivíduos adultos. Em estágios pré-natais de desenvolvimento, o receptor *Olf15*, a subunidade $G_{\alpha olf}$ de proteína G e o gene para a Adenilil-ciclase III também são expressos nas células do Gânglio (FLEISCHER et al., 2006). Além desses, os Neurônios Sensoriais do GG também expressam receptores TAARs, apresentando a expressão dos receptores TAAR6 e TAAR7 em altos níveis no estágio embrionário E17.5 (cerca de 100 células por receptor) e algum nível de expressão, um pouco menor em animais adultos (cerca de 10 células por receptor) (FLEISCHER et al., 2007).

1.2 Segregação Espacial e Funcional dos Subsistemas Olfativos

Esses subsistemas olfativos são integrados no cérebro para fornecer aos animais o maior número possível de informações químicas vindas do ambiente. Cada um deles expressa um conjunto de receptores distintos e esses receptores dotam esses subsistemas da capacidade de detectar conjuntos de moléculas com significados biológicos distintos.

Por exemplo, o Sistema Olfativo Principal está relacionado à detecção de odorantes de maneira geral e o Sistema Olfativo Acessório ou Vomeronasal está relacionado à detecção de feromônios, voláteis no caso dos receptores V1R e codificados (peptídicos) no caso dos receptores V2R.

Apesar de a observação desse nível de especialização, existem populações do Sistema Olfativo Principal que ao invés de receptores de classe OR, expressam outros receptores, por exemplo, os receptores TAARs e receptores GC-D. Destes receptores, os TAARs detectam aminas biogênicas que podem desencadear comportamentos ou respostas fisiológicas nos animais, de maneira que pode ocorrer certa redundância na detecção dos estímulos que medeiam comunicação desses animais com outros da mesma espécie ou co-específicos.

No Sistema Olfativo Acessório, por outro lado, ocorre a expressão de alguns receptores de classe OR, expressos em algumas células da porção apical do VNO. Essas

células, como todos os neurônios sensoriais olfativos do VNO, expressam o canal iônico TrpC2 e, de acordo com a região em que essas células se localizam, na camada apical, expressam a subunidade $G_{\alpha 2}$ de proteína G (LEVAI et al., 2006). As células identificadas na literatura expressando receptores OR enviam projeções para o Bulbo Olfativo Acessório, como ocorre com as demais células do Sistema Olfativo Acessório; entretanto, as células que expressam o mesmo receptor no Sistema Olfativo Principal continuam enviando projeções para o Bulbo Olfativo Principal (LEVAI et al., 2006)

1.3 Dados Preliminares à proposição deste estudo.

No presente estudo, obtivemos acesso a dados de sequenciamento de mRNA do Órgão Vomeronasal de camundongos, obtidos em colaboração com o pesquisador Dr. Darren Logan, do Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, em que foi observada a expressão de receptores de classe OR em níveis de expressão comparáveis aos níveis em que receptores V2R são expressos.

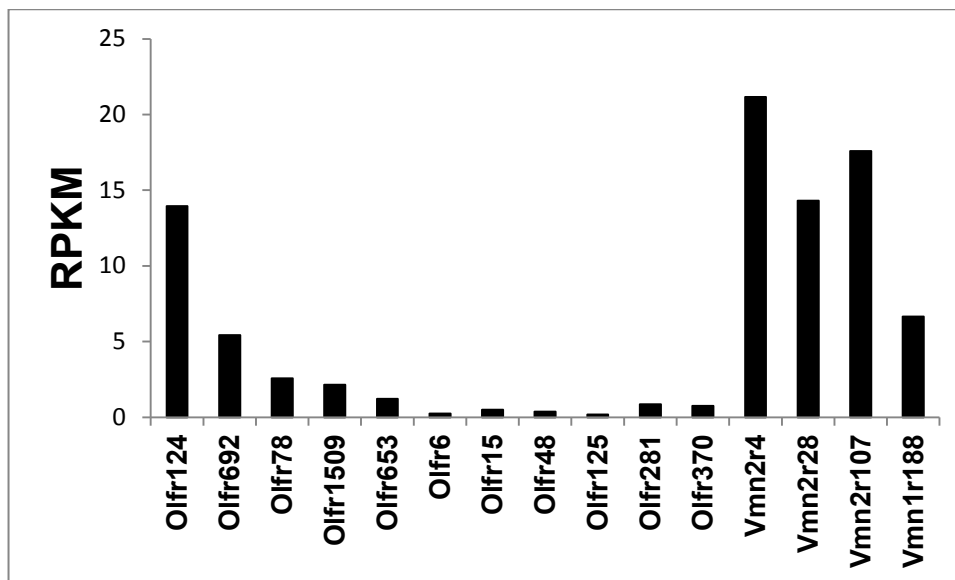


Figura 6: Dados de FPKM de receptores OR em comparação com outros receptores V1R e V2R expressos no Órgão Vomeronasal. Esses dados foram produzidos com mRNAs extraídos de 6 animais: 3 machos e 3 fêmeas, de maneira que a amostra é significativa.

Os dados extraídos dessas bibliotecas de RNA-seq mostram níveis de expressão dos receptores *Olfr124*, *Olfr692* e *Olfr1509* em níveis comparáveis aos receptores *Vmn2r4*, *Vmn2r28* e *Vmn2r107*, como exemplos de receptores V2R expressos no órgão vomeronasal.

Por exemplo, o receptor *Olf124* é expresso em um nível aproximadamente equivalente ao do receptor *Vmn2r28* (**Fig. 6**).

Esses dados não são surpreendentes pela presença de receptores OR no VNO, mas pelo nível de expressão que esses receptores OR estão representados no Órgão Vomeronasal. A expressão de receptores OR havia sido previamente relatada no VNO em (LEVAI et al., 2006), e essas células foram caracterizadas como $G_{\alpha i2}$ -positivas, OCAM-positivas, TrpC2-positivas e em particular o receptor *Olf78* envia suas projeções para o Bulbo Olfativo Acessório.

Entretanto, os receptores *Olf124*, *Olf692* e *Olf1509* não tiveram sua expressão observada por (LEVAI et al., 2006) no VNO e, inversamente, os receptores que foram identificados como sendo expressos no VNO anteriormente na literatura não estão presentes nos nossos dados de RNA-seq, exceto pelos receptores *Olf78* e *Olf653*.

Nosso interesse sobre os receptores OR expressos no Órgão Vomeronasal versou sobre a caracterização molecular dessas células, dentro de um contexto em que os neurônios sensoriais olfativos expressam moléculas em um padrão típico. Sinteticamente, OSNs canônicos expressam receptores OR que se conjugam com proteínas $G_{\alpha olf}$ e despolarizam através de canais iônicos dependentes de nucleotídeos cíclicos, CNGA. VSNs da população apical do VNO expressam receptores V1R e transduzem sinal através de uma cascata que envolve a subunidade $G_{\alpha i2}$ de proteínas G e o canal iônico TrpC2 para a despolarização no neurônio. Os VSNs da porção basal expressam, por sua vez, receptores V2R de classe C e, concomitantemente, receptores V2R de classe A, B ou D e transduzem sinal através de proteínas $G_{\alpha o}$ e o canal iônico TrpC2; além desse conjunto de moléculas também expressam moléculas MHC de uma família específica: H2-Mv, de função ainda desconhecida. Essas informações estão resumidas na **Tabela 1**.

Tabela 1: Principais marcadores de populações de Neurônios Sensoriais Olfativo versus população que expressa receptores OR no VNO

OSNs canônicos	V1R	V2R	OR+ VNO
OR+	V1R+	V2R(ABD)+	OR+
	V2RC-	V2RC+	?
Gαolf+	Gai2+	Gαo+	?
CNGA+	TrpC2+	TrpC2+	?
		M2-Mv	?

Ao longo do tempo de desenvolvimento deste projeto, investigamos as células que expressavam receptores OR a fim de determinar quais dos marcadores específicos para subpopulações de Neurônios Sensoriais Olfativos eram expressos nestas células que expressam receptores de classe OR e assim caracterizar essas células do ponto de vista molecular.

Além disso, foram feitas investigações preliminares no sentido de lançar luz sobre a função que essas células eventualmente estariam desempenhando no Órgão Vomeronasal, através de ensaios de detecção de ativação de neurônios sensoriais olfativos, combinando a exposição de animais a candidatos a estímulos *in vivo* com a hibridação *in situ* para o IEG *Egr1*, utilizado anteriormente na literatura para a identificação de células ativadas (ISOGAI et al., 2011). Esse IEG é expresso após a ativação neuronal dos VSNs e é um indicador indireto da ativação desses neurônios após exposição a um determinado estímulo olfativo.

2. Metodologia

2.1 Exposição dos animais C57Bl6/J aos estímulos olfativos.

Animais da linhagem C57BL6/J de idade entre 8 a 12 semanas foram individualizados dois dias antes da realização do experimento. No dia da exposição, em cada uma das gaiolas foi colocado o estímulo adequado, apresentados em gazes médicas para curativos desodorizadas em bomba de vácuo por 30min. Os animais foram mantidos em suas gaiolas pelo tempo de 45min e em seguida foram sacrificados por asfixia com gás carbônico e dissecados cuidadosamente com pinças tratadas contra RNases para a remoção do VNO, que é transferido imediatamente para solução fixadora (4% Paraformaldeído em 1XPBS).

2.2 Preparação das lâminas para hibridação *in situ*

Os VNOs foram fixados em fixador 4% PFA em 1x PBS overnight a 4°C para evitar a degradação dos RNAs do tecido. No dia seguinte, os órgãos foram transferidos para uma solução livre de RNases de 0,45M de EDTA em 1XPBS e incubados por 3h. Em seguida, foram transferidos para uma nova solução, 20% sacarose em 1XPBS por 3h a fim de proteger o material contra a formação de cristais de gelo que pudessem destruir a estrutura histológica do órgão durante o congelamento. Transcorridas as 3h, os VNOs foram cuidadosamente dissecados para a remoção de todos os ossículos que os envolvem. Terminada a dissecação, o VNO é seco utilizando kimwipes, transferido para moldes plásticos contendo meio de montagem (Tissue Tek) para crioproteção e em seguida, os moldes são congelados em vapor de nitrogênio líquido.

Esses moldes plásticos, que chamamos de blocos, foram, então, guardados em biofreezer (-80°C) ou transferidos para criostato e mantidos por tempo o suficiente para que sua temperatura se equilibrasse. Em seguida, cada bloco foi removido do seu respectivo molde, trimado e colado utilizando meio de montagem ao suporte do criostato. Cada bloco foi

então crio-seccionado em seções de 16µm e as seções coletadas utilizando um pincel livre de RNases em lâminas de vidro Colorfrost Plus Fischer.

2.3 Síntese das Ribossondas

As sequências dos genes sob estudo foram recuperadas do GeneBank e foram desenhados oligonucleotídeos para a amplificação dos fragmentos correspondentes à cerca de 1000pb da sequência codificadora do mRNA. Esses fragmentos foram clonados em vetor pGEM-T Easy e suas sequências confirmadas por análise de restrição e sequenciamento.

Os plasmídeos contendo as sequências corretas foram então linearizados com enzimas que permitissem à sequência complementar ao mRNA (cRNA) ficar contígua ao promotor de RNA Polimerases virais (SP6 ou T7).

Em seguida, esses plasmídeos linearizados foram utilizados como moldes para a síntese de sondas de RNA para hibridação *in situ* utilizando polimerases virais SP6 RNA Polimerase ou T7 RNA Polimerase. Essas sondas foram sintetizadas utilizando Uracilas marcadas com haptenos, como Digoxigenina, Fluoresceína e Dinitrofenil. Esses haptenos foram posteriormente utilizados para a imunolocalização da sonda no tecido através de técnicas cromogênicas ou fluorescentes.

2.4 Hibridação *in situ*:

O protocolo de hibridação *in situ* foi desenvolvido pelo nosso laboratório baseado no protocolo de (ISHII et al., 2004), que contou ainda com a colaboração do aluno Leonardo Minete Cardoso, que defendeu sua dissertação de mestrado em fevereiro de 2012 e sofreu modificações ao longo dos trabalhos da presente dissertação. Esse protocolo proporcionou avanços técnicos significativos para o nosso laboratório e, somado à técnica de imunohistoquímica, permitiu, além de hibridação *in situ* dupla, o desenvolvimento de uma robusta técnica de CAT-FISH que será submetida para publicação em revista especializada em técnicas de biologia molecular num futuro próximo.

Os primeiros dois dias dos protocolos de hibridação *in situ* cromogênica e fluorescente são idênticos e serão descritos a seguir. Todas as soluções do primeiro dia e os banhos de diferentes concentrações de Tampão Citrato de Sódio Salino (SSC) foram feitas em condições livres de RNAses tratadas com DEPC overnight seguida de autoclavagem e as diluições seguintes utilizaram água ultrapura (18MΩ de resistividade) livre de RNAses, a vidraria foi queimada a 200°C por 4h ou tratada com Peróxido de Hidrogênio 3% por 15min.

DIA 1 - Pré-Tratamento das seções e hibridação:

As lâminas foram secas utilizando secador por 10min, em seguida fixadas com 4%Paraformaldeído por 20min. Então foram lavadas e tratadas com HCl 0,1M por 10 min para permeabilização e tratadas por 30min com H₂O₂ 0,1% a fim de inativar peroxidases endógenas. Em seguida foram acetiladas com 1ml de Anidrido Acético em 250ml de 0,1M Trietanolamina pH 8,0 e hibridadas com solução de hibridação pré-aquecida (50% Formamida, 10% Sulfato de Dextran NaCl 600mM, RNA-transportador de levedura 200µg/ml, 0.25%SDS, 10mM Tris-HCl pH8,0, 1X Solução de Denhardt, 1mM EDTA pH 8,0) contendo sondas antissenso de RNA nas concentrações específicas, durante um período de 16h a 60°C cobertas com lamínulas de vidro.

DIA 2 - Lavagem e incubação com anticorpo:

No segundo dia, as lamínulas foram deslocadas em 5XSSC e as lâminas foram lavadas a 60°C em 2XSSC por 30min, 0,2XSSC por 20min e 0,1XSSC por 20min. Foram então transferidas para solução 0,1XSSC à temperatura ambiente e em seguida para uma solução de PBS com 0,1% Tween-20 por 10min e em seguida em tampão TN (100mM Tris-HCl pH7,5 + 150mM NaCl) por 5min duas vezes. Essas lâminas são, então, bloqueadas em tampão TNB (100mM Tris-HCl pH7,5 + 150mM NaCl + 0,05% Reagente de Bloqueio (Perkin Elmer). As lâminas foram incubadas lâminas com anticorpo cobertas com lamínula de parafilm com as seguintes concentrações de anticorpo, a depender do tratamento posterior: anti-DIG-AP (ROCHE) → 1:800; anti-FLU-AP (ROCHE) → 1:800; anti-DIG-POD (Roche) → 1:400; anti-FLU-POD (ROCHE) → 1:200; anti-DNP-rabbit Life Technologies) → 1:600; em TNB buffer a 4°C a noite inteira; 200µl/lâmina

A partir deste ponto, cada diferente versão possui um tratamento específico:

A) Marcação Cromogênica

DIA 3 - Marcação Cromogênica Simples:

As lâminas foram lavadas 6 vezes em tampão TNT (100mM Tris-HCl pH7,5 + 150mM NaCl + 0,05% Tween-20) por 5min cada, com agitação suave. Em seguida lavadas duas vezes em tampão da Fosfatase Alcalina (100mM Tris-HCl pH 9,5, 50mM $MgCl_2$, 100mM NaCl, 0,1% Tween-20) por 5min. Então foram incubadas com uma solução que mistura 1:1 (V/V) de Tampão da Fosfatase Alcalina 2X + 10% Álcool Polivinílico (Mowiol). O Tampão da Fosfatase Alcalina 2X foi filtrado e após a adição de 10%PVA, foram adicionados 6,7ul de NBT 75mg/ml e 5ul de BCIP 50mg/ml.

B) Marcação Mista

DIA 3 - Marcação 1º hapteno:

Para anticorpos que não possuem peroxidase conjugada: as lâminas são lavadas 3 vezes em tampão TNT por 8min cada, com agitação suave; em seguida, são incubadas com anti-rabbit-POD (1:200) por 1h30min em TNB, à temperatura ambiente, cobertas com lamínula de parafilm.

Para todos os marcadores: lavagem 6 vezes em TNT buffer por 5min cada, com agitação suave. Em seguida, pipetamos 100ul de tiramida-biotina (1/50 – amp. DUPLA) diluída em 1x amplification diluent (kit Perkin Elmer+0,0015% H_2O_2) que é incubada sobre as lâminas, cobertas com parafilm por 15min. Repete-se a lavagem 6 vezes em TNT buffer por 5min cada, com agitação suave Depois as lâminas foram incubadas com Streptavidina-HRP 1:100 (HRP é Peroxidase proveniente de raiz-forte (*Armoracia rusticana*)) diluída em tampão TNB por 60min no escuro. 200ul/lâmina cobertas com parafilm. Repetiu-se a lavagem 6 vezes em TNT buffer por 5min cada, com agitação suave.

Em seguida, incubamos as lâminas em tiramida-alexa555 (Invitrogen) (1/100) diluída em 1x amplification diluent (TSA Amplification kit Life Technologies+0,0015% H_2O_2) por 15min no escuro cobertas com lamínulas de parafilm. 100ul/lâmina. Repete-se a lavagem 6 vezes em TNT buffer por 5min cada, com agitação suave e para o passo de

imunodeteção seguinte, as lâminas são bloqueadas por 3h com TNB. Por último, as lâminas são incubadas overnight com anticorpos anti-DIG-AP ou anti-FLU-AP (ambos na diluição 1:800) em tampão TNB, cobertas com lamínulas de parafilm, a 4°C.

DIA 4 - Marcação 2º hapteno (DIG ou FLU):

As lâminas são lavadas 6 vezes em TNT buffer por 5min cada, com agitação suave e em seguida, lavadas duas vezes em tampão da fosfatase alcalina 5min/cada. E então foram incubadas com uma solução que mistura 1:1 (V/V) de Tampão da Fosfatase Alcalina 2X + 10% Álcool Polivinílico (Mowiol). O Tampão da Fosfatase Alcalina 2X foi filtrado e após a adição de 10%PVA, foram adicionados 1,34µl de NBT 75mg/ml e 1ul de BCIP 50mg/ml por cada mililitro da solução.

C) Dupla marcação Fluorescente:

DIA 3 - Marcação 1º hapteno:

(A incubação com anti-rabbit-POD se aplica ao hapteno DNP):

As lâminas são lavadas 3 vezes em tampão TNT por 8min cada, com agitação suave; em seguida, são incubadas com anti-rabbit-POD (1:200) por 1h30min em TNB, à temperatura ambiente, cobertas com lamínula de parafilm. Repete-se a lavagem 6 vezes em TNT buffer por 5min cada, com agitação suave. Em seguida, pipetamos 100µl de tiramida-biotina (1/50 – amp. DUPLA) diluída em 1x amplification diluent (kit Perkin Elmer+0,0015% H₂O₂) que é incubada sobre as lâminas, cobertas com parafilm por 15min. Repete-se a lavagem 6 vezes em TNT buffer por 5min cada, com agitação suave. Depois as lâminas foram incubadas com Streptavidina-HRP (1:100) diluída em tampão TNB por 60min no escuro. 200µl/lâmina cobertas com parafilm. Repete-se a lavagem 6 vezes em TNT buffer por 5min cada, com agitação suave.

Em seguida, incubamos as lâminas em tiramida-alexa555 (Invitrogen) (1/100) diluída em 1x amplification diluent (TSA Amplification kit Life Technologies+0,0015% H₂O₂) por 15min no escuro cobertas com lamínulas de parafilm. 100µl/lâmina. Repete-se a lavagem 6 vezes em TNT buffer por 5min cada. Em seguida, incubadas em 3% H₂O₂ em 1XPBS por 1h e em 0,1M HCl+0,9%NaCl por 15min a temperatura ambiente para a inativação da Peroxidase conjugada ao anticorpo secundário.

Repete-se a lavagem 6 vezes em TNT buffer por 5min cada, com agitação suave e as lâminas são incubadas com solução de **streptavidina 0,1mg/ml por 1h (em TNB) 100µl/lâmina**; as lâminas são, então, lavadas 3 vezes em TNT buffer por 10min cada, com agitação vigorosa; e em seguida as lâminas são incubadas com **biotina 2mM (0,5mg/ml) por 1h (em TNT) 100µl/lâmina**, esses passos têm como objetivo bloquear os sinais intermediários de Biotina e Tiramida dos passos anteriores de detecção. Foi repetida a lavagem das lâminas 3 vezes em TNT buffer por 10min cada, com agitação vigorosa. Em seguida elas foram bloqueadas por 1h30 em TNB e incubadas com anticorpo anti-segundo hapteno na concentração adequada (ver Dia 2).

DIA 4 - Marcação FLU:

Para anticorpos que não possuem peroxidase conjugada: as lâminas são lavadas 3 vezes em tampão TNT por 8min cada, com agitação suave; em seguida, são incubadas com anti-rabbit-POD (1:200) por 1h30min em TNB, à temperatura ambiente, cobertas com lamínula de parafilm.

Para todos os marcadores: lavagem 6 vezes em TNT buffer por 5min cada, com agitação suave. Em seguida, pipetamos 100µl de tiramida-biotina (1/50 – amp. DUPLA) diluída em 1x amplification diluent (kit Perkin Elmer+0,0015% H₂O₂) que é incubada sobre as lâminas, cobertas com parafilm por 15min. Repete-se a lavagem 6 vezes em TNT buffer por 5min cada, com agitação suave. Depois as lâminas foram incubadas com Streptavidina-HRP (1:100) diluída em tampão TNB por 60min no escuro. 200µl/lâmina cobertas com parafilm. Repete-se a lavagem 6 vezes em TNT buffer por 5min cada, com agitação suave.

Em seguida, incubamos as lâminas em tiramida-alexa555 (Invitrogen) (1/100) diluída em 1x amplification diluent (TSA Amplification kit Life Technologies+0,0015% H₂O₂) por 15min no escuro cobertas com lamínulas de parafilm. 100µl/lâmina. Depois disso as lâminas foram Contra-coradas com TO-PRO-3 na diluição de 1:500 em PBS por 30min no escuro (500ul/lamina), lavadas 2 vezes em PBS 1x por 5min cada, com agitação suave e por fim foram montadas com ProLong Gold (Invitrogen) e lamínulas de vidro e guardadas a -20°C até o momento da visualização.

3. Relevância

O sistema nervoso é um dos sistemas biológicos mais complexos e menos compreendidos. Esse sistema é responsável pela manutenção e controle de vários processos fisiológicos dos animais: controle do metabolismo, apetite, funcionamento de outros sistemas e órgãos, geração de mecanismos de defesa, ritmos circadianos e reprodução. Além disso, ele é responsável pela interface dos animais com seu ambiente e com outros animais da mesma espécie e de espécies distintas, mediando relações etológicas complexas.

Um dos componentes principais do sistema nervoso são os sistemas sensoriais, capazes de detectar estímulos do meio e levar a padrões de ativação cerebral, que resultam em comportamentos apropriados. Diferente de outros sistemas sensoriais, pouco é conhecido sobre como ocorre a codificação das moléculas que o sistema olfativo detecta, para prover o animal com informação de significado e relevância biológica.

Dentro desse contexto, ainda não são conhecidas todas as populações de neurônios sensoriais olfativos, e várias descobertas foram realizadas na última década dentro deste tópico. Em particular, muitos estudos recentes levaram à descoberta de ligantes capazes de serem detectados pelo sistema olfativo. Assim, a relevância desse projeto é a de lançar luz sobre alguns aspectos da fisiologia do sistema olfativo, através da caracterização de neurônios do VNO que expressam receptores não expressos neste órgão de forma canônica, buscando verificar se se trata de uma nova população de células presente no sistema olfativo acessório ou vomeronasal. Dado que esse subsistema olfativo é necessário para a detecção de moléculas de comunicação entre indivíduos da mesma espécie ou de outras espécies (através da detecção de cairomônios), uma população de células expressando ORs em meio às células V2R pode ter grande relevância biológica, intermediando possivelmente algum aspecto imprescindível da biologia dos animais que as possuem.

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

O principal objetivo deste projeto é compreender a função dos receptores OR no órgão olfativo sensorial vomeronasal (VNO). Os receptores que foram estudados neste projeto possuem a peculiaridade de serem expressos fora do epitélio olfativo principal, onde outros membros da mesma família estão normalmente localizados. Embora sua expressão no VNO já tenha sido documentada na literatura (LEVAI et al., 2006), o nível de expressão e o número de células expressando os receptores estudados neste projeto é muito maior do que o reportado anteriormente e compatível com o número de células que expressam receptores vomeronasais canônicos. Deste modo, as células expressando o receptor definem uma nova população de VSNs, possivelmente com função distinta dos neurônios que expressam receptores vomeronasais usuais.

4.2 Objetivos Específicos

(1) determinar o perfil espacial, temporal (ao longo do desenvolvimento pós-natal) e quantitativo da expressão dos receptores Olfr124, Olfr692 e Olfr1509, em comparação com outros ORs não expressos no VNO e com receptores VR expressos neste órgão;

(2) determinar a lógica molecular da expressão de ORs no VNO; por exemplo, é de interesse conhecer se ocorre co-expressão com outras classes de receptores olfativos (por exemplo, membros da família V2R, encontrados em neurônios da camada basal do VNO), co-expressão com moléculas MHC do sistema olfativo, com proteínas G ou com o canal iônico TrpC2, essencial para a função dos VSNs;

(3) dar passos rumo à identificação do ligante para o receptor Olfr692, altamente expresso neste órgão; de posse do ligante, poderíamos testar hipóteses acerca da função biológica do receptor em questão;

(4) investigar a organização genômica e os promotores dos genes *OR* expressos no VNO, em comparação com outros genes *OR* não-expressos neste tecido; serão avaliados a estrutura gênica, posição no genoma e organização na tentativa de desvendar a expressão não-usual dos ORs aqui estudados.

5. Estratégia Experimental

O presente estudo teve como principal objetivo caracterizar molecular e funcionalmente a expressão de receptores OR no Órgão Vomeronasal. Para a caracterização molecular, a estratégia utilizada foi a obtenção de sondas complementares aos genes sob estudo e realização de 1) hibridação *in situ* para os receptores no VNO e 2) hibridação *in situ* dupla para os receptores e moléculas marcadoras do sistema olfativo.

Para a caracterização funcional das células expressando Olfr692, ou seja, para as tentativas de identificação do ligante e consequentemente a ativação dessas células, foi realizada a exposição a candidatos a ligantes com subsequente hibridação *in situ* dupla utilizando sonda para o receptor sob estudo e para o gene de expressão imediata (IEG) *Egr1*, com a finalidade de identificar ativação neuronal nas células OR.

A utilização do IEG *Egr1* para a identificação da ativação dessas células mediante ligantes proporciona duas informações importantes: a) se essas células são funcionais, ou se elas possuem um mecanismo de ativação celular que também culmine na expressão do IEG e b) qual é o ligante para esse receptor.

6. Resultados

6.1 Validação por *Real-Time-PCR* da expressão de ORs no VNO de camundongos

Uma técnica importante e poderosa foi desenvolvida recentemente e tem sido utilizada para identificar o perfil de expressão gênica de uma determinada amostra de células e tecidos, que é a utilização de sequenciamento de nova geração para o sequenciamento do mRNA dessas amostras. Essa nova tecnologia permite obter dados para todos os genes expressos no tecido e lança a possibilidade de identificação da expressão gênica de uma maneira inédita, já que não depende de um conhecimento *a priori* da expressão desses genes, sua clonagem e dados anteriores sobre sua expressão em uma determinada amostra.

Para o sistema olfativo, esse tipo de sequenciamento foi realizado e as bibliotecas resultantes do RNA-seq foram obtidas em colaboração com o Wellcome Trust Sanger Institute. O primeiro passo a partir do acesso aos dados de sequenciamento de RNA do VNO foi confirmar os dados de RNA-seq para os genes sob estudo. Para tanto, foram realizados, ainda em colaboração com o Wellcome Trust Sanger Institute, experimentos de Real-Time PCR, utilizando cDNA de VNOs utilizados para a confecção das bibliotecas de RNA-seq.

A primeira versão dos nossos experimentos de *Real-Time* PCR confirmaram os dados de RNA-seq em um nível de expressão relativo bastante semelhante ao obtido nas nossas bibliotecas (barras verdes da **Fig. 7**). Entretanto, experimentos preliminares de hibridação *in situ* não confirmaram a expressão de receptores OR *Olf124* e *Olf1509* utilizando sondas complementares ao mRNA desses receptores (cRNA).

Para resolver a discordância entre os dados, foi feita uma nova dissecção do VNO, mais cautelosa e que removeu com cuidado vestígios de outros tecidos circundantes, a fim de evitar qualquer contaminação da amostra biológica com células provenientes de outros tecidos ou órgãos sensoriais. Por exemplo, o VNO está conectado ao Septo Nasal em que o Órgão Septal reside, de modo que dissecções pouco cuidadosas do primeiro poderiam resultar em contaminação com células do órgão septal. A partir desse novo mRNA foi obtida uma nova amostra de cDNA que, então serviu de molde para um novo PCR em Tempo Real,

desta vez confirmando os dados preliminares dos experimentos de hibridação *in situ*, demonstrando uma expressão não significativa dos receptores *Olfr124* e *Olfr1509* e um alto nível de expressão do receptor *Olfr692* (barras azuis na **Fig. 7**). Os experimentos de *Real-Time* PCR, foram realizados em colaboração com o Dr. Darren Logan, do Wellcome Trust Sanger Institute.

Esses experimentos confirmaram a ausência de expressão dos genes *Olfr124* e *Olfr1509* no VNO e, em contrapartida, comprovaram a expressão do receptor *Olfr692* neste órgão (**Fig. 7**).

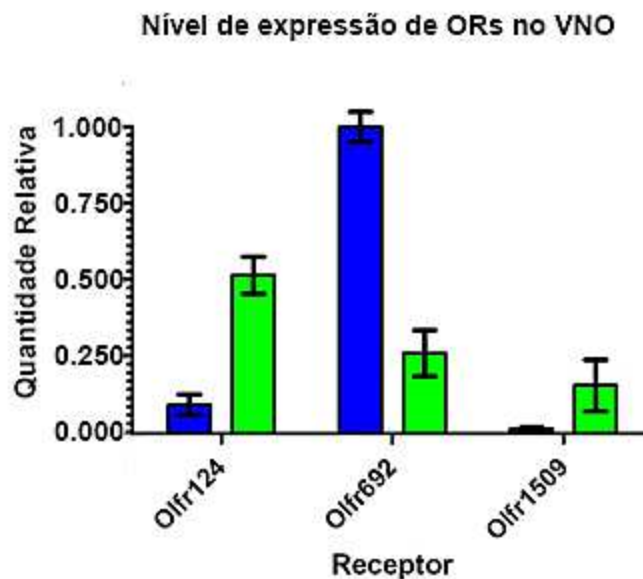


Figura 7: PCR em tempo real (Real-Time PCR) revelando a expressão singular de *Olfr692* no VNO. Neste experimento de PCR quantitativo em tempo real, normalizado pela expressão do receptor *Olfr692*, foram comparados os níveis de expressão dos genes *Olfr124*, *Olfr692* e *Olfr1509*, utilizando sondas e primers específicos para cada gene. Foi utilizada tecnologia TaqMan, para maior especificidade na detecção dos genes da família multigênica OR. As barras em azul representam os dados obtidos a partir de RNA total extraído do VNO cuidadosamente dissecado dos ossos e peças cartilagíneas circundantes, enquanto as barras verdes representam a mesma análise comparativa na amostra de RNA total de VNO utilizada para a construção das bibliotecas de RNAseq. Estes dados demonstram que a expressão de *Olfr124* e *Olfr1509* de fato não acontece no VNO, e provavelmente houve contaminação com transcritos do órgão septal de Maseira na preparação de RNA original, que foi obtida por dissecação menos cuidadosa do VNO. Experimentos realizados em 4 réplicas biológicas, com 3 triplicatas técnicas. Barras representam SEM.

6.2 Confirmação dos Resultados Obtidos por Hibridação *in situ* Cromogênica

O próximo passo da nossa caracterização foi a realização de experimentos de hibridação *in situ* utilizando sonda para o receptor *Olfr78* (cuja expressão no VNO foi documentada na literatura), além de *Olfr124* e *Olfr1509*, para confirmar a presença ou ausência de sua expressão no VNO. Para o desenho adequado de sondas de hibridação *in situ*, as sondas foram desenhadas em fragmentos das sequências que foram submetidas à análise no BLAST contra o genoma de camundongos e seus transcritos. A resposta para esses alinhamentos trouxe diversos pontos de identidade entre regiões conservadas entre os receptores OR, entretanto, essa identidade se encontra localizada em pequenas regiões. Embora os níveis de similaridade ultrapassem, em alguns casos, 80%, ela não é suficiente para ocorrer cross-hibridação devido ao seu caráter pontual.

Quanto ao receptor *Olfr692*, apesar da validação de sua expressão observada nos dados de RNA-seq, esses resultados não davam informação sobre a origem histológica-celular da expressão do receptor. Embora fosse razoável supor que esse receptor fosse expresso em VSNs, era necessário confirmar essa suposição e, além disso, a hibridação *in situ* poderia nos dar uma informação quantitativa mais precisa: o número de células em que esse receptor era expresso.

A expressão do receptor *Olfr692* foi confirmada consistentemente no VNO em diversos experimentos, tanto através de hibridação *in situ* cromogênica como de hibridação *in situ* fluorescente (**Fig. 8**). Nestes experimentos, foi encontrada a expressão do receptor *Olfr692* em uma subpopulação definida de células no VNO, dispersas ao longo do epitélio sensorial (**Fig. 8A**). A julgar pela intensidade da coloração arroxeada, fica aparente que o nível de expressão por célula do gene *Olfr692* é bastante elevado (**Fig. 8A**), comparável ao nível de expressão por célula de outros genes de receptores expressos no VNO (**Fig. 8C**).

Além disso, fica claro que o número de células expressando o gene *Olfr692* é semelhante em todos os cortes analisados de um mesmo animal (vários painéis na **Fig. 8A**), comparativamente, a expressão do gene *Olfr78* está presente em número inferior de células

em relação ao gene *Olfr692* (**Fig. 8B**), cuja expressão limitada em apenas algumas células do neuroepitélio já foi descrita por outros grupos (LEVAI et al., 2006).

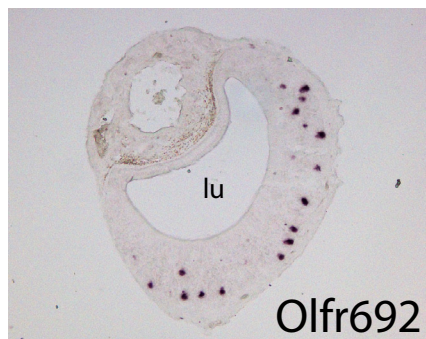
Desta forma, a expressão do gene *Olfr692* desponta como numericamente notável (10-15 células por corte de 16µm; **Fig. 8A**); comparativamente, uma sonda capaz de reconhecer 10 membros do clado A4 de receptores V2R (**Fig. 8C**) leva à marcação de cerca de 5 vezes mais células que a sonda para o gene *Olfr692*, sugerindo que o número de células expressando o receptor OR *Olfr692* é igual ou maior que o número de células expressando um receptor do tipo V2R, já tradicionalmente descrito no VNO.

Contabilizando as células positivas para o receptor *Olfr692*, obtivemos uma média de 12 células por corte, enquanto que para o receptor *Olfr78* observamos, em média 3 células positivas por corte (**Fig. 9**). Desta forma, observamos uma expressão para o receptor *Olfr692* 4 vezes maior do que a expressão do receptor *Olfr78*, previamente relatada na literatura (LEVAI et al., 2006).

Quanto aos genes *Olfr124* e *Olfr1509*, também altamente expressos em nossas bibliotecas de RNA-seq do VNO, sua expressão não foi confirmada por técnicas de hibridação *in situ* cromogênica e fluorescente, confirmando nossos dados de *Real-Time* PCR (**Fig. 8**). Ainda assim, para eliminar qualquer sombra de dúvidas, prosseguimos com a investigação desses genes por hibridação *in situ*, empreendendo esforços para eliminar qualquer problema técnico nos laboriosos e complexos experimentos de hibridação.

Outros parâmetros foram testados para inúmeras variáveis, como temperatura de hibridação, temperatura das lavagens pós-hibridação, concentração de sonda e amplificação de sinal. Mesmo nestes casos, não houve detecção inequívoca de expressão para estes dois genes no VNO. Além disso, as mesmas sondas resultaram na detecção inequívoca de células quando testadas sobre cortes do Epitélio Olfativo Principal (MOE) (**Fig. 10A e C**), confirmando que a ausência de marcação no VNO não se tratava de problema experimental e ou no desenho das nossas sondas.

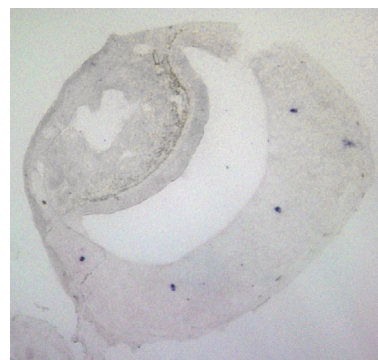
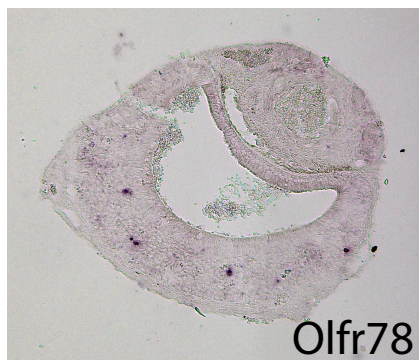
A



B



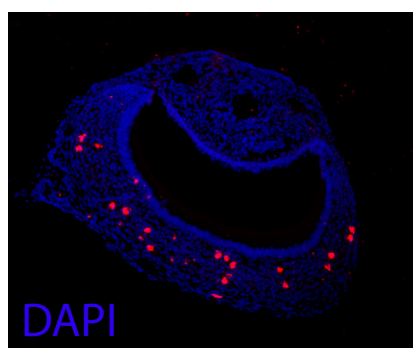
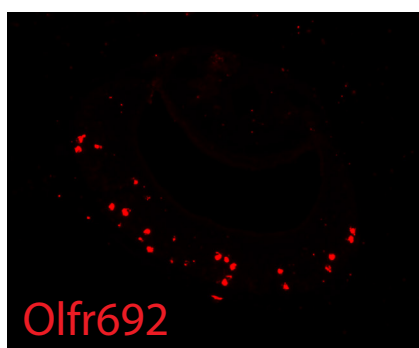
C



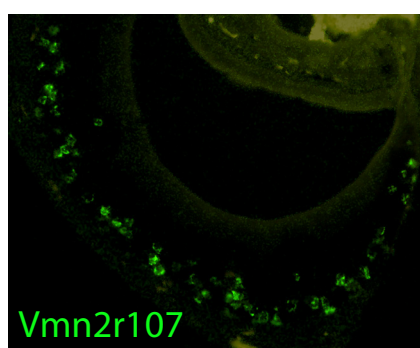
D



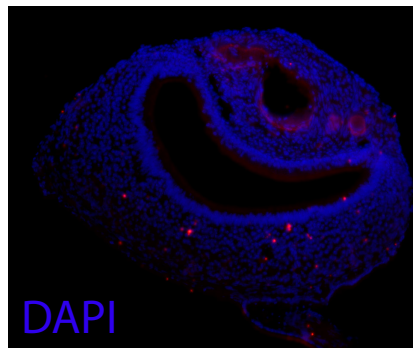
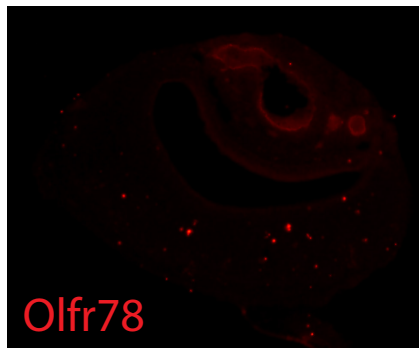
E



F



G



H

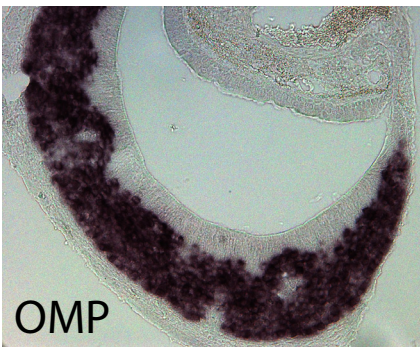


Figura 8: Hibridação in situ para verificação da expressão de ORs no VNO. Hibridação com revelação cromogênica, mostrando a expressão dos receptores Olfr692 no VNO (A) e no MOE (B) e receptor Olfr78 (C) no epitélio vomeronasal de camundongos C57Bl/6J machos de 3 meses de idade. Note a quantidade significativa de células expressando o receptor Olfr692, se comparado à população de células expressando todos os receptores do clado A4 de V2Rs (D). Resultado semelhante pode ser observado na detecção fluorescente de Olfr692 (E) ou Olfr78 (G), se comparado à detecção com a sonda para Vmn2r107, que reconhece apenas 3 receptores do clado A8 de V2Rs (F). A sonda OMP é utilizada como controle positivo (H), marcando todo o epitélio vomeronasal. lu: lúmen

Uma vez que conseguimos observar de maneira consistente a expressão do receptor *Olfr692* em animais adultos, com um número de células compatível com o de um receptor V2R, surgiram questões importantes sobre o comportamento do *Olfr692* enquanto receptor. Nos ativemos à expressão do receptor ao longo do desenvolvimento dos animais. Os receptores V2Rs possuem expressão sustentada ao longo do desenvolvimento, isto é, eles são expressos desde antes do nascimento (HERRADA; DULAC, 1997) e continuam expressando os mesmos receptores até a idade adulta. A partir deste racional, prosseguimos com a análise da expressão temporal de *Olfr692* em VNOs coletados de indivíduos de várias idades (P0, P10, P20, P30, P60) (**Fig. 11**). Dada a constância na expressão de receptores V2R ao longo do desenvolvimento dos indivíduos, utilizamos o receptor *Vmn2r69* como controle para comparação com o receptor *Olfr692*, conforme apresentado na **figura 9 (F-J)**.

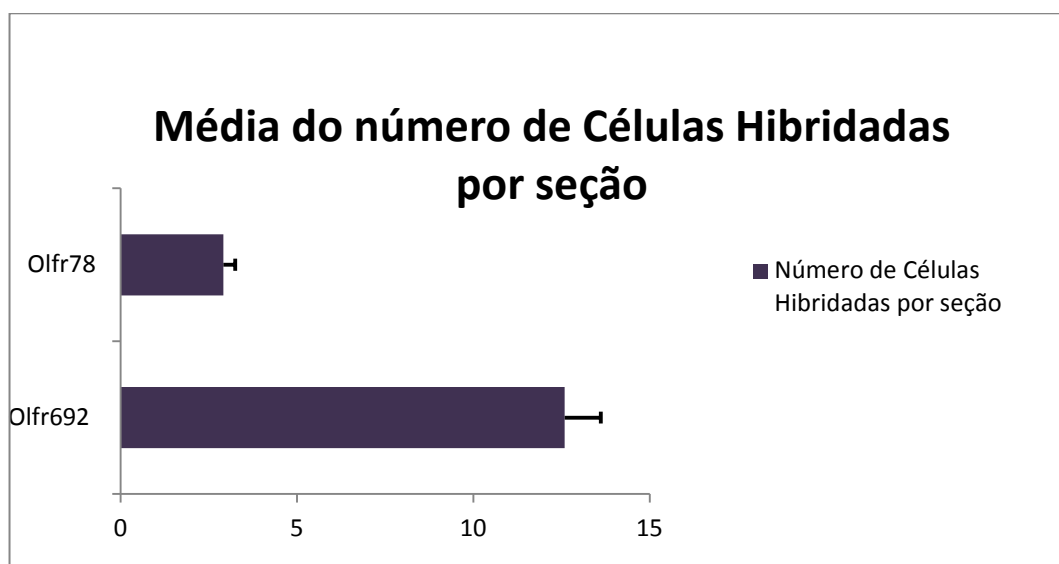


Figura 9: Comparação entre o número de células positivas para o Receptor Olfr692 e o Receptor Olfr78. As células foram contabilizadas de pelo menos 11 cortes por sonda de receptor. Barras representam Erro Padrão da Média.

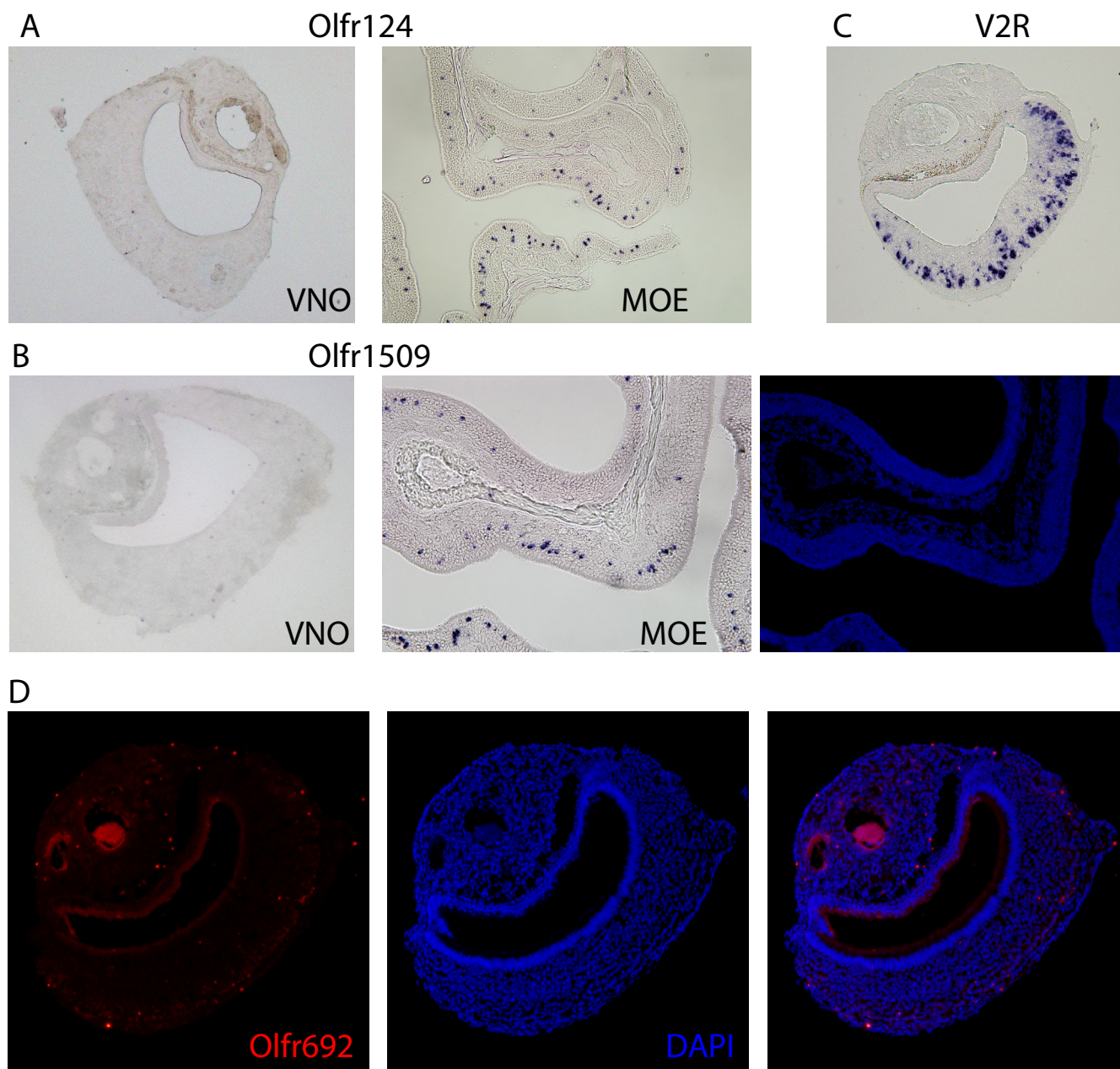


Figura 10: Hibridação in situ para verificação da expressão de outros ORs no VNO. Hibridação com revelação cromogênica, denotando a ausência de expressão dos receptores Olfr124 (A) e Olfr1509 (C) no epitélio do VNO de camundongos C57Bl/6J machos de 3 meses de idade. As sondas utilizadas são funcionais, pois há detecção eficiente destes receptores no MOE. Os VNOs estão íntegros, pois há detecção eficiente de V2Rs no tecido (B). Resultado semelhante pode ser observado na detecção fluorescente de Olfr124 (D). Os painéis em azul indicam coloração nuclear com o corante DAPI. Fotomicrografias de fluorescência em microscópio confocal Leica TCS.

A expressão de Olfr692 apresenta um padrão peculiar de expressão ao longo do desenvolvimento, presente em pequeno número de células em animais P0, P10 e P20 (uma ou duas células marcadas por corte), expressão um pouco maior em animais P30 (algumas células esparsas) e alta expressão a partir da idade P60 (população numerosa, com dez ou mais células por corte) (**Fig. 11A-E**). Para fins de comparação, observar a expressão do receptor Vmn2r69 (família V2R) que é sustentada ao longo de todas as idades analisadas (**Fig. 11F-J**).

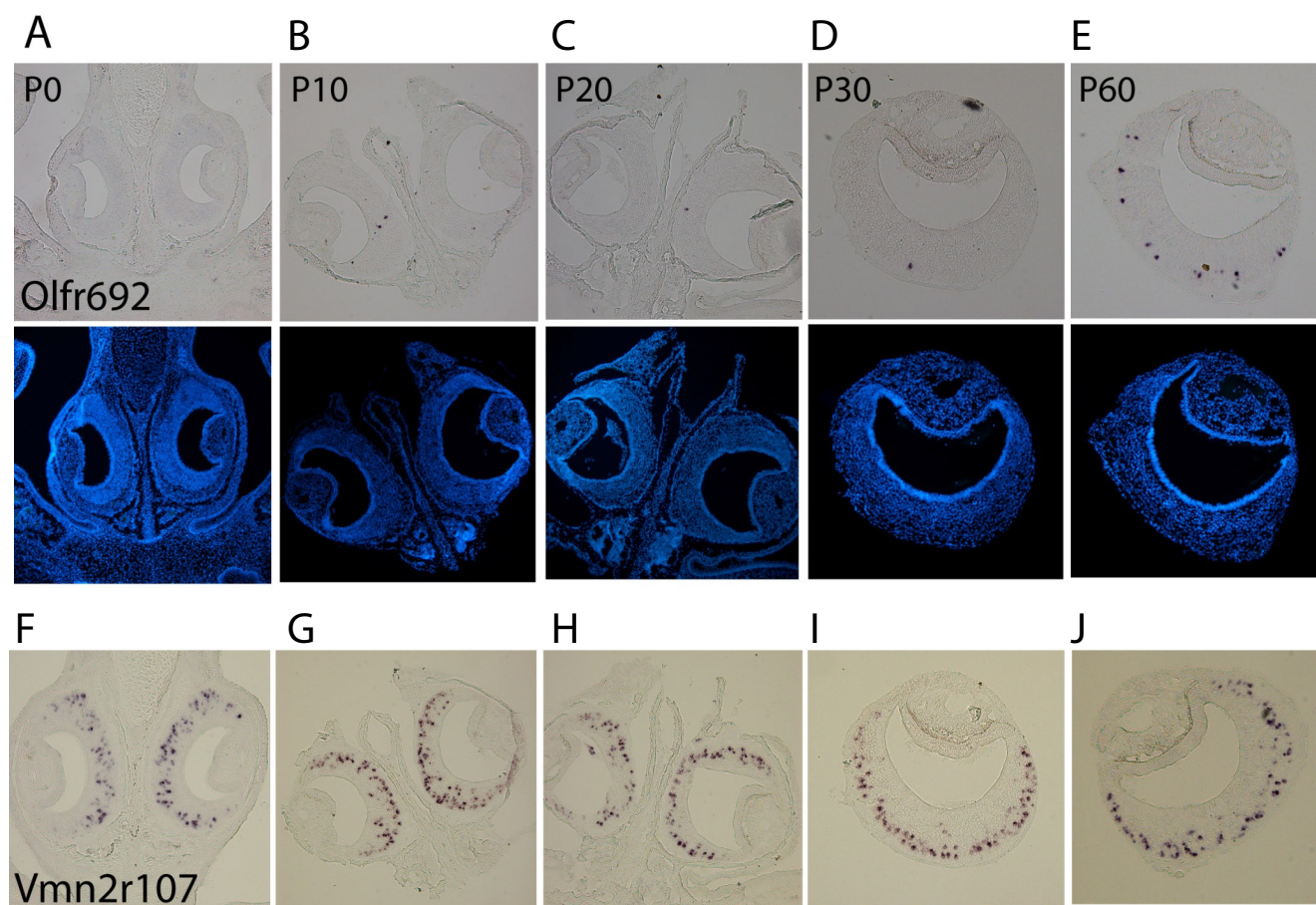


Figura 11: Expressão do receptor Olfr692 do dia do nascimento à idade adulta. Hibridação in situ cromogênica para os receptores Olfr692 (A a E) e Vmn2r69 (F a J) ao longo de diversas idades. A expressão do receptor Olfr692 ocorre em apenas uma ou duas células por VNO em P0 (A), P10 (B), P20 (C) e P30 (D), e é de cerca de dez células em P60 (E). Esses mesmos animais tiveram a expressão do receptor Vmn2r69 analisada em comparação, a expressão desse V2r é aproximadamente constante ao longo da vida do animal.

6.3 Caracterização dos VSNs Olfr692-positivos

Uma vez confirmada a expressão do receptor *Olfr692* em indivíduos adultos e observado o controle da expressão do receptor sob estudo de uma forma peculiar ao longo do desenvolvimento dos indivíduos, foi iniciada uma fase de caracterização molecular das células Olfr692-positivas. Esta fase de experimentos teve por objetivo analisar a expressão de inúmeras moléculas nas células OR-positivas no VNO, com o intuito de verificar se correspondem de fato a uma nova população de células sensoriais do sistema olfativo. O racional por trás desta sequência de experimento foi que, se identificássemos a expressão de um conjunto de marcadores moleculares diferente dos perfis moleculares reportados para outras populações de neurônios olfativos já conhecidos, teríamos fortes indícios de que as células que expressam ORs no VNO se tratam mesmo de uma população sensorial distinta, podendo ter relevância funcional *in vivo*. Ao contrário, se identificássemos os mesmos tipos de marcadores já conhecidos em outras populações sensoriais, a expressão de ORs no VNO não definiria uma nova população, diminuindo nossa confiança de que se tratam de células funcionalmente distintas.

Conforme descrito na Introdução, no MOE, OSNs canônicos expressam, além de receptores OR, a enzima Adenilil Ciclase III, o canal iônico *CNGA* e proteínas $G_{\alpha olf}$. Existem ainda outras populações que expressam receptores *TAAR* e moléculas GC-D. Por outro lado, no Órgão Vomeronasal, existem duas populações conhecidas: uma população apical que expressa receptores V1R, o canal iônico *TrpC2* e a subunidade $G_{\alpha 12}$ de proteína G, e uma população que expressa receptores V2R, o canal iônico *TrpC2* e a subunidade $G_{\alpha o}$ de proteína G. Também são expressas no VNO moléculas de função ainda não totalmente elucidada, a saber, moléculas de MHC da família H2-Mv (também conhecida como família M10, com os membros *H2-M10.1*, *H2-M10.2*, *H2-M10.3*, *H2-M10.4*, *H2-M10.5* e *H2-M10.6*).

As moléculas descritas acima participam da cadeia de transdução de sinal ou são marcadores para os respectivos neurônios sensoriais e, portanto, nossa investigação incluiu a análise da expressão de algumas delas, que serão listadas a seguir:

- CNGA
- $G_{\alpha olf}$
- TrpC2

- Gao
- Gai2
- M10.2
- M10.5
- M10.6

Além disso, foi de interesse verificar se os genes OR expressos no VNO o fazem de maneira monogênica, ou seja, se cada célula vomeronasal OR-positiva expressa apenas um ou vários tipos de receptores OR. Estes experimentos serão descritos no próximo item, seguido da avaliação da expressão dos marcadores listados acima.

6.3.1 Co-expressão entre receptores OR

Uma vez que a expressão do receptor *Olfr692* foi confirmada tanto por *Real-Time* PCR como por hibridação *in situ* cromogênica e fluorescente, prosseguimos para a próxima fase, de caracterização molecular das células que expressam o receptor *Olfr692*. Para tanto, testamos se os receptores de classe OR são expressos da mesma forma que nos OSNs (Neurônios Sensoriais Olfativos) canônicos do MOE.

No MOE, a expressão de receptores OR ocorre de maneira monogênica (MALNIC et al., 1999; SERIZAWA et al., 2004), isto é, apenas um alelo OR, entre os cerca de 2800 disponíveis no genoma, é expresso por um dado OSN. Após o comprometimento do neurônio sensorial olfativo com a expressão de seu receptor, não ocorre troca do receptor expresso (LOMVARDAS et al., 2006). O primeiro passo da caracterização molecular das células *Olfr692*-positivas foi determinar se esse tipo de comprometimento com a expressão de um único receptor também ocorre no VNO.

Caso a expressão de ORs no VNO não fosse monogênica, poderíamos sugerir que a expressão do receptor *Olfr692* ocorre ao acaso, em virtude de um tipo de regulação pouco precisa. Neste caso, o padrão de expressão diferiria muito da expressão funcional de ORs no MOE, que ocorre de maneira monogênica e monoalélica, sugerindo que a expressão de ORs no VNO poderia ser desregulada ou mesmo não funcional.

Primeiramente, comparamos a expressão dos dois receptores OR expressos em níveis similares no VNO, *Olfr692* e *Olfr78*. Através de hibridação *in situ* dupla, combinando

sondas para ambos os ORs expressos no VNO, foi concluído que cada um destes receptores não é co-expresso com o outro OR (**Fig. 12**), suportando a ideia de expressão monogênica.

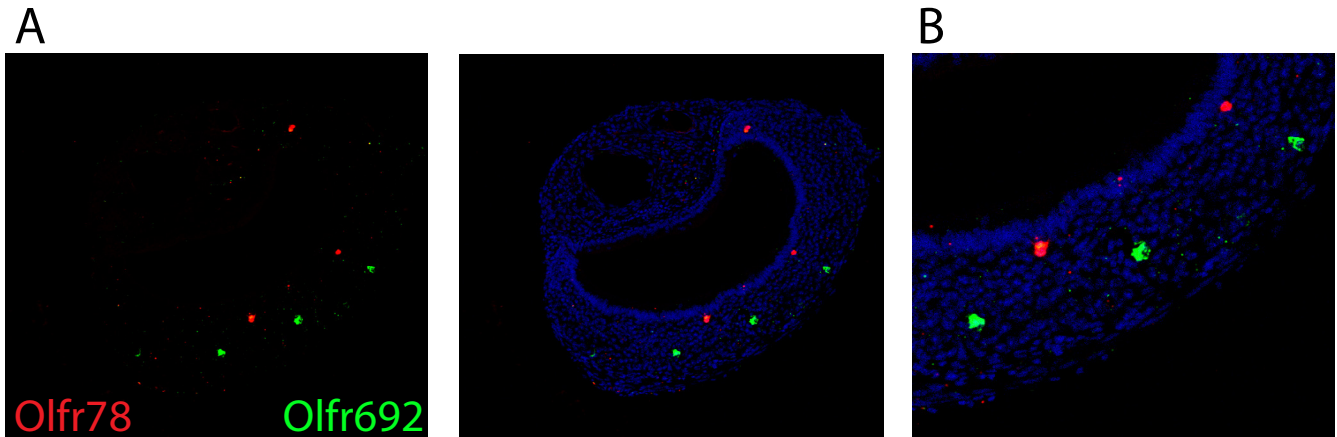


Figura 12: Caracterização Molecular das células Olfr692-positivas quanto à colocação de receptores OR: (A) Células expressando Olfr692 (verde) não co-expressam Olfr78 (vermelho), mostrado em detalhe em B. Micrografias de fluorescência em experimentos de hibridação *in situ* fluorescente com revelação contendo amplificação dupla de sinal.

6.3.2 Expressão de moléculas das vias de transdução de sinal clássicas dos OSNs e VSNs: Canais iônicos.

Os experimentos acima sugerem que não ocorre sobreposição entre a expressão de diferentes ORs no VNO. Em seguida, foram realizados experimentos combinando a marcação para *Olfr692* e outros genes e marcadores expressos no sistema olfativo, como, por exemplo, o canal iônico *TrpC2* (**Fig. 13**). Este canal é essencial para o funcionamento do VNO e a ausência de sua expressão funcional no VNO causa a interrupção do funcionamento dos VSNs e consequentemente a perda de comportamentos estereotipados dependentes do VNO (STOWERS et al., 2002; KIMCHI et al., 2007; CHAMERO et al., 2007; PAPES et al., 2010).

Uma vez que a expressão de *TrpC2* define molecularmente os VSNs, em oposição à expressão do canal iônico *CNGA* nos OSNs do MOE, a investigação da expressão destas moléculas nas células expressando ORs no VNO é fundamental para definir sua identidade molecular. Além disso, esta investigação poderia revelar a maneira pelas qual estes neurônios, se funcionais, poderiam realizar a transdução de sinal. Para as células *Olfr692*-

positivas, o canal TrpC2 poderia ser uma alternativa de ao CNGA como canal iônico responsável pela despolarização no neurônio.

O resultado deste primeiro experimento foi a colocalização entre o sinal do receptor *Olfr692* e o gene *TrpC2* no VNO (**Fig. 13**), que pode ser vista em detalhe no epitélio sensorial do órgão vomeronasal (**Fig. 13C**).

Entretanto, o canal iônico *TrpC2* também é expresso no MOE. Desta forma, idealizamos a possibilidade de que o canal *TrpC2* seja sempre expresso com receptores *Olfr692*, mesmo no MOE. Utilizamos as mesmas sondas, para o experimento de hibridação *in situ* em uma amostra crio seccionada de MOE, mas não observamos colocalização entre a expressão do receptor *Olfr692* e o canal *TrpC2* neste tecido (**Fig. 14**). Isto indica que a identidade molecular dos neurônios vomeronasais que expressam ORs não é a mesma dos OSNs canônicos, sugerindo uma significância funcional.

Apesar de ter sido confirmada a expressão do canal *TrpC2* em células *Olfr692*-positivas no VNO, este experimento não descarta a possibilidade de o canal CNGA, encontrado em OSNs que expressam este receptor no MOE, também seja co-expresso nas células *Olfr692* do VNO. Desta forma, foram realizados experimentos de hibridação *in situ* para CNGA no VNO. Nestes experimentos, não foi observada a expressão do canal CNGA no VNO utilizando sonda para o mRNA da subunidade CNGA2 do canal; como controle positivo, utilizamos a mesma sonda para experimentos de hibridação *in situ* de seções de MOE, onde nossa sonda foi validada, detectando marcação generalizada no epitélio olfativo principal (**Fig. 14**).

Estes dados apontam que as células OR-positivas do VNO expressam *TrpC2*, como outros VSNs, e não expressam CNGA, como OSNs canônicos, sugerindo que se tratam de fato de uma nova população sensorial no VNO.

6.3.3 Expressão de moléculas das vias de transdução de sinal clássicas dos OSNs e VSNs: Proteínas G.

Uma vez determinada a co-expressão entre o receptor *Olfr692* e o canal iônico *TrpC2*, prosseguimos com a caracterização dessas células, desta vez utilizando como marcadores as proteínas G. Dado que receptores olfativos pertencem às GPCRs, eles acoplam com proteínas G; quando ocorre ligação do ligante, ocorre uma mudança conformacional que causa seu desacoplamento para efetuar função sinalizadora sobre o próximo estágio da cascata de reações que culminam na ativação do neurônio sensorial.

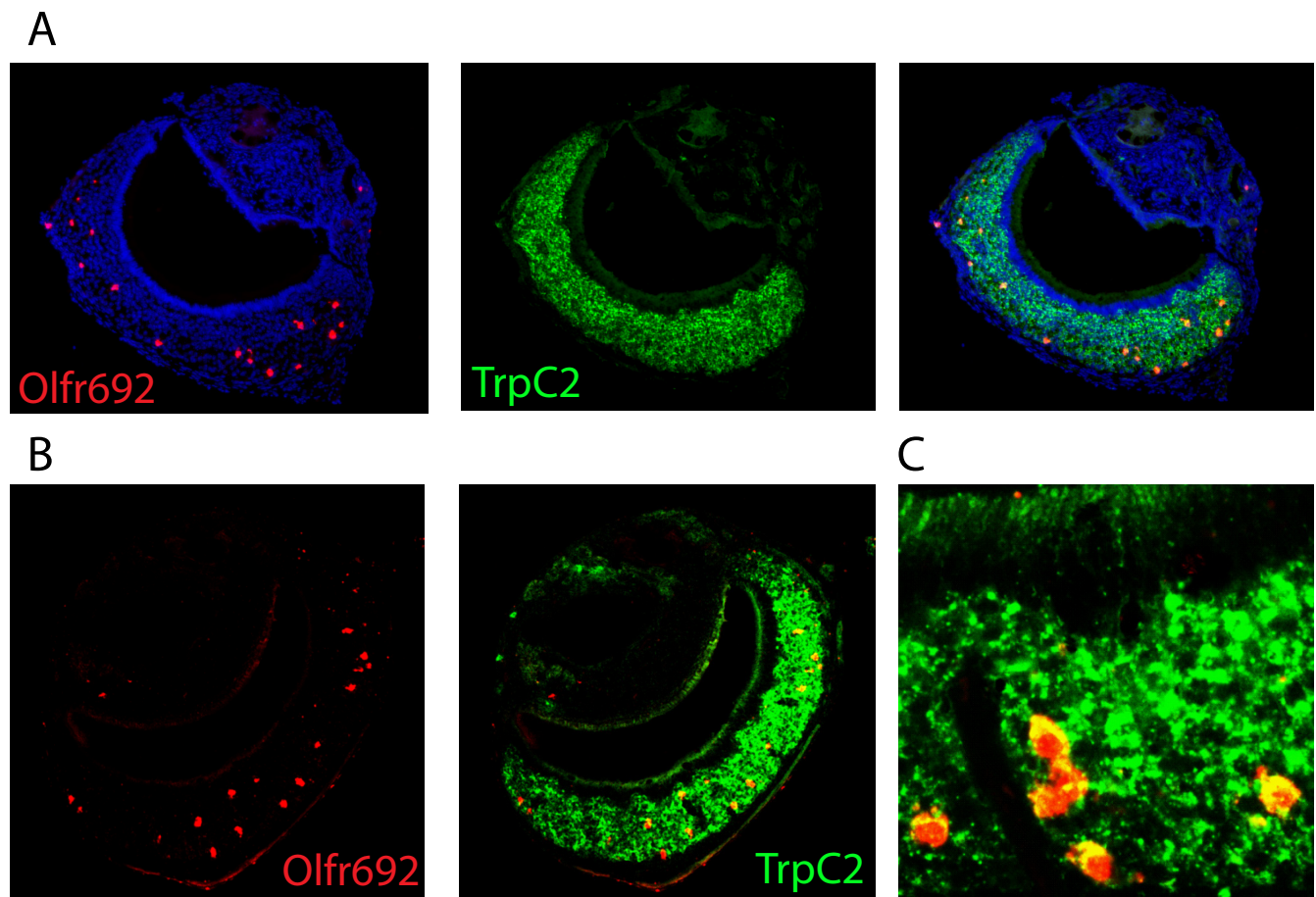


Figura 13: **Caracterização molecular das células expressando ORs no VNO. Células que expressam *Olfr692* são *TrpC2*-positivas (detalhe em C).** Micrografias de fluorescência em experimentos de hibridação *in situ* fluorescente com revelação contendo amplificação dupla de sinal.

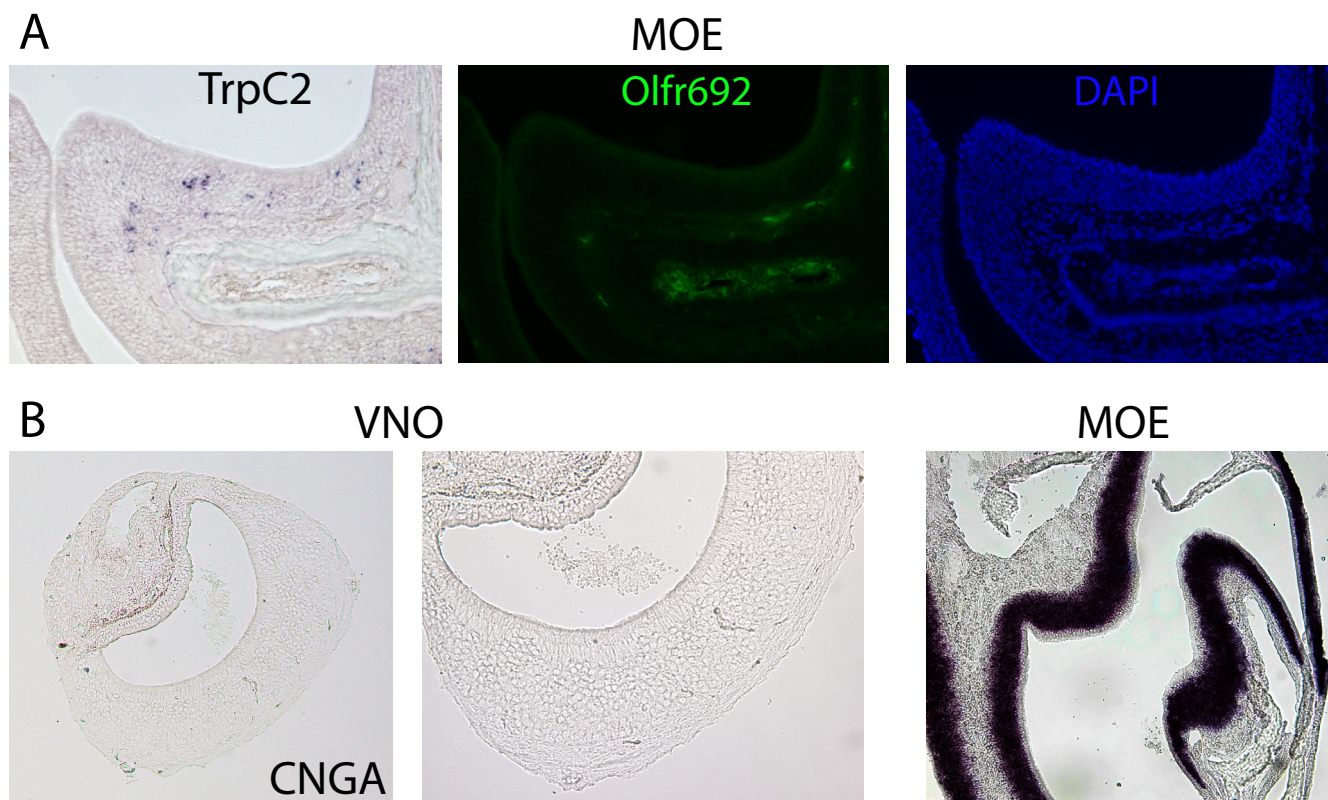


Figura 14: As células expressando *Olfr692* no VNO não são OSNs ectopicamente localizados. O fato de células *Olfr692*-positivas expressarem *TrpC2* no VNO é singular, pois não há expressão do marcador de OSNs *CNGA* (cyclic-nucleotide gated channel 2) no VNO (B). Além disso, não há expressão de *Olfr692* nas poucas células *TrpC2*-positivas no MOE (A), ainda de função desconhecida. O painel à direita em B mostra a vasta e ubíqua expressão de *CNGA* no epitélio sensorial do MOE.

Conforme descrito anteriormente na Introdução, OSNs no MOE expressam a subunidade $G_{\alpha olf}$ de proteína G, e os VSNs do VNO expressam as subunidades $G_{\alpha o}$ para o caso da população basal (que também expressa V2Rs), e $G_{\alpha i2}$ para o caso da população apical (que expressa V1Rs).

As células que estudamos possuem a expressão de um receptor típico do MOE e, entretanto, expressam o canal iônico *TrpC2*, típico do VNO. Isto sugere fortemente que essas células são uma população nova de neurônios sensoriais, e não uma população de VSNs ou OSNs típicos.

Partindo desse racional, a próxima etapa da nossa caracterização foi identificar a proteína G que estaria associada ao receptor *Olfr692* expresso no VNO. As proteínas G são

um marcador interessante de posição histológica no VNO, já que as duas populações são bastante distintas e cada uma delas expressa uma subunidade de proteína G distinta.

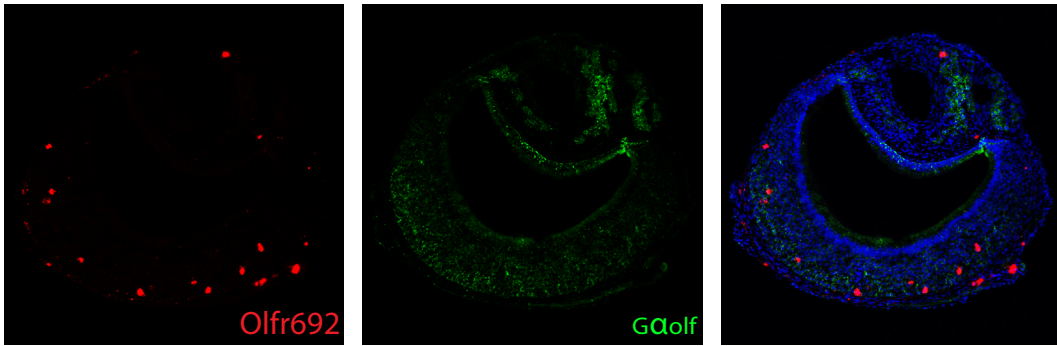
Os primeiros testes foram realizados utilizando sondas complementares à proteína $G_{\alpha olf}$ tanto no VNO quanto no MOE em hibridações *in situ* duplas para o receptor *Olfr692*. Nesses experimentos não detectamos a expressão dessa subunidade de proteína G no VNO (**Fig. 15A**), enquanto no MOE a mesma sonda foi capaz de detectar a expressão deste gene, conforme esperado.

Em seguida foram utilizadas sondas de RNA complementares ao mRNA das subunidades $G_{\alpha o}$ e $G_{\alpha i2}$ de proteínas G em experimentos de hibridação *in situ* dupla com o receptor *Olfr692*.

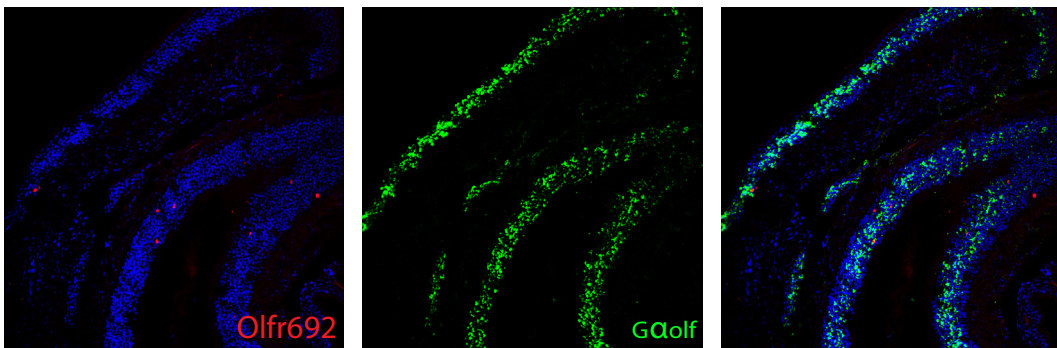
Nestes experimentos, foi observada colocalização entre a expressão do receptor *Olfr692* e a subunidade $G_{\alpha o}$ de proteína G, confirmando sua expressão junto à população basal de VSNs (**Fig. 15C**). Para confirmar essa informação, também foram realizados experimentos de hibridação *in situ* dupla para a subunidade $G_{\alpha i2}$ de proteína G, marcador da população apical de neurônios sensoriais do VNO. Nesse caso, observamos que não houve colocalização entre as marcações para a proteína G e o receptor *Olfr692* (**Fig. 15D**).

As células *Olfr692*-positivas localizam-se junto à população basal de VSNs (Neurônios Sensoriais Vomeronasais), colocalizando com marcadores da população basal de VSNs, como a proteína $G_{\alpha o}$ (**Fig. 15**). Esses experimentos não dizem respeito apenas à localização das células *Olfr692* positivas no VNO, mas também à sua identidade molecular e funcional. No MOE, os receptores OR transduzem sinal através da proteína $G_{\alpha olf}$ e do canal *CNGA* (Cyclic Nucleotide Gated Channel), enquanto no VNO, onde não há expressão de *CNGA* (**Fig. 14**) ou de $G_{\alpha olf}$, as células positivas para *Olfr692* aparentemente expressam *TrpC2* e proteína $G_{\alpha o}$, sugerindo que elas podem se tratar de uma população nova de neurônios sensoriais olfativos no VNO. Vale lembrar que as células *Olfr692* no MOE não expressam *TrpC2*, e, portanto, devem transduzir sinal de modo diferente, e possivelmente apresentar uma função diversa neste outro órgão sensorial (**Fig. 13**).

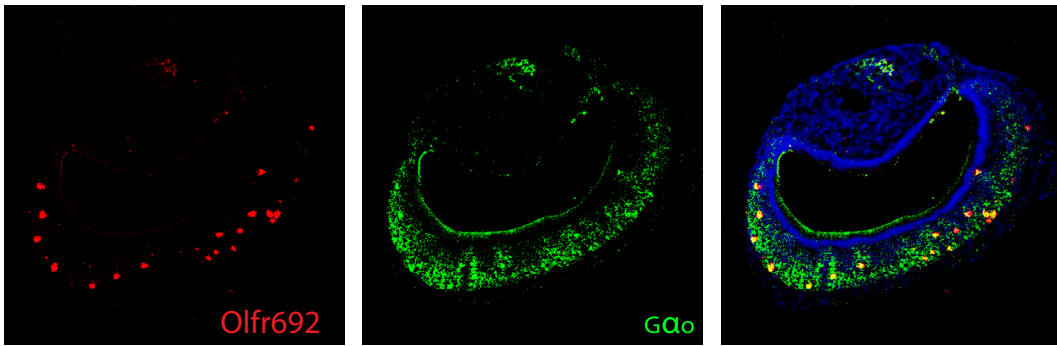
A



B



C



D



E

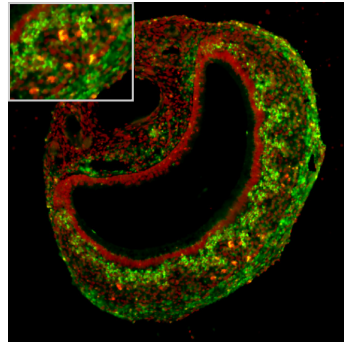


Figura 15: **Proteínas G expressas nas células que expressam receptores OR:** não foi identificada a expressão do mRNA da proteína *Gαolf* no VNO (A), embora nossa sonda tenha sido capaz de identificar o mRNA correspondente no MOE (B). As células *Olfr692*-positivas tiveram marcação positiva para a proteína *Gαo*, marcadora da população V2R de VSNs (C), e não houve colocalização com a proteína *Gαi2*, marcadora da população V1R de VSNs (D). Micrografia obtida em microscópio de fluorescência, a marcação do corante nuclear está em vermelho, que se distingue do tom alaranjado da marcação do fluoróforo Alexa 555 pela coloração e pela intensidade da marcação. Em detalhe (E), observa-se que as células *Olfr692*-positivas estão localizadas em uma circunvolução do VNO em que não se detecta mRNA da subunidade *Gαi2* de proteína G.

6.3.4 Colocalização com moléculas H2-Mv.

Os VSNs que expressam receptores V2R, também expressam moléculas H2-Mv de MHC, cuja função é pouco conhecida in vivo (LOCONTO et al., 2003). Nossa caracterização molecular dos neurônios olfativos *Olfr692*-positivos também avaliou a expressão de genes desse grupo MHC *H2-M10.2*, *H2-M10.5* e *H2-M10.6* (Fig. 16). A expressão da molécula de MHC *H2-M10.2* não foi co-localizada com a expressão do receptor *Olfr692*. Este membro pertence a uma pequena família de moléculas MHC expressas especificamente no VNO (LOCONTO et al., 2003), de modo que também foram realizados testes utilizando uma composição de dois genes distintos desta pequena família, *H2-M10.5* e *H2-M10.6*. Este teste resultou em uma colocalização para algumas células entre o receptor *Olfr692* e as moléculas *H2-M10*, que não ocorreu para todas as células *Olfr692*-positivas. (Fig. 16)

O método utilizado para a detecção do sinal para as moléculas *H2-M10.5* e *H2-M10.6* foi o desenvolvimento cromogênico, que apresenta grande sensibilidade e precisão para genes expressos em células isoladas (Fig. 16),

Além disso, a marcação cromogênica, é opaca, criando um precipitado roxo que interrompe o caminho da luz, dificultando a diferenciação entre células marcadas e não marcadas ao longo do eixo Z. Em contrapartida, a microscopia fluorescente confocal fornece uma precisão muito maior para a análise de colocalização de sinal em uma mesma célula. No futuro, realizaremos o desenvolvimento da detecção de sinal desses genes *H2-M10* e do gene *Olfr692* utilizando sondas fluorescentes e análise sob microscópio confocal.

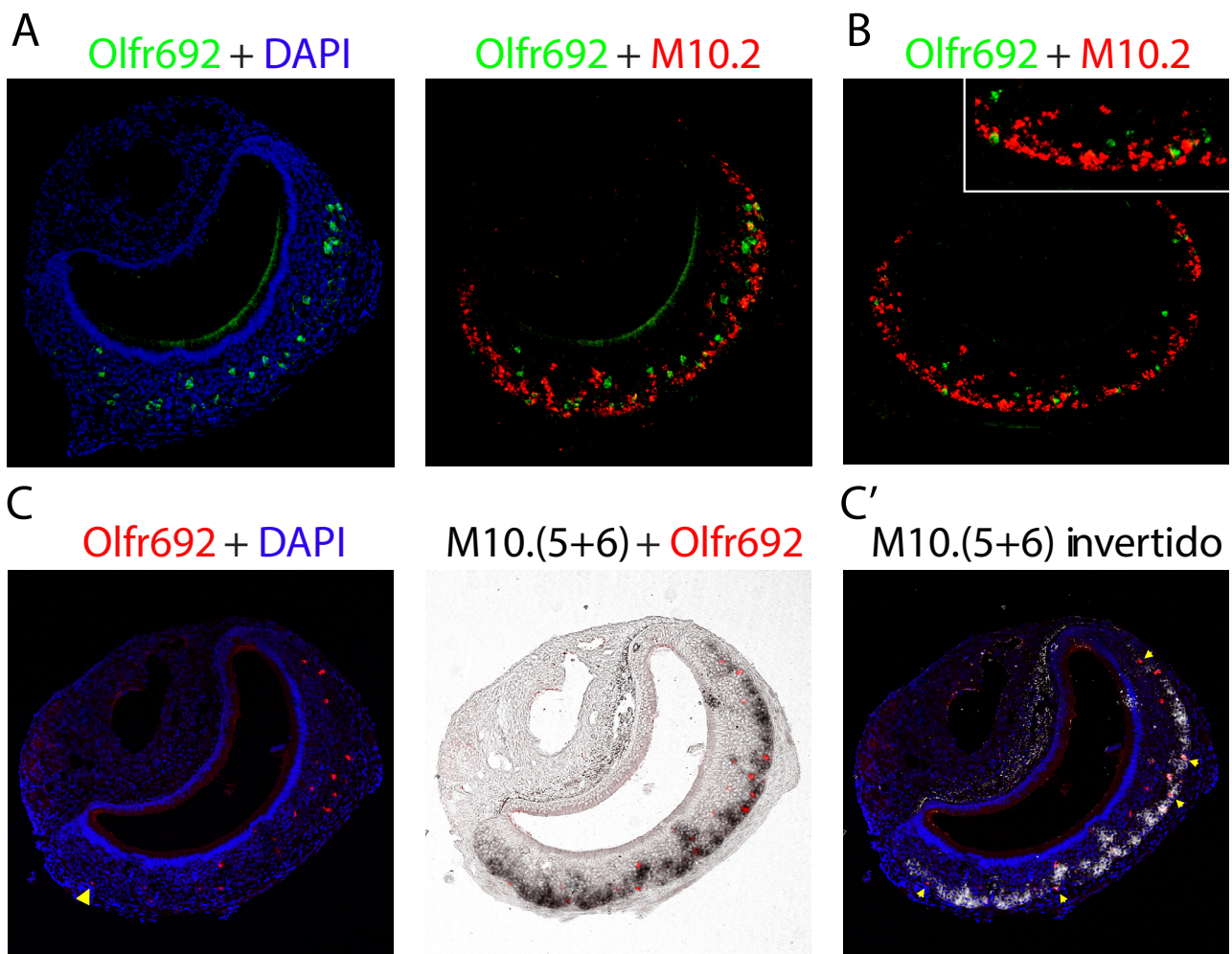


Figura 16: **Co-expressão de Olfr692 com genes M10 expressos na camada basal do VNO.** (A) Experimentos de hibridação in situ dupla revelaram que as células Olfr692-positivas não expressam o membro M10.2 da família H2-Mv de moléculas não clássicas de MHC de classe I (LOCONTO et al., 2003) o membro expresso em maior número de células do VNO (detalhe da ausência de colocalização em B). C) Células Olfr692+ co-expressam não obrigatoriamente H2-M10.5 e H2-M10.6. Esses membros estão entre os mais expressos entre os M10 do VNO e foram escolhidos em conjunto por cobrirem um grande número de células. Núcleos corados com DAPI. Pontas de seta amarela evidenciam células marcadas em vermelho, sobretudo nas sobreposições da marcação dos genes H2-M10.5 e H2-10.6 invertida no painel C'.

6.3.5 Sobreposição com a expressão de receptores V2R

Os receptores OR obedecem a uma lógica de expressão monogênica, monoalélica, em que apenas um entre os cerca de 1400 receptores é expresso. Entretanto, o epitélio do VNO possui uma dinâmica distinta. Os VSNs da camada basal deste órgão expressam, além de um receptor V2R de subfamílias A, B e D, um receptor de subfamília C (MARTINI et al., 2001; SILVOTTI et al., 2007). Em geral, a expressão do receptor *Vmn2r2* ocorre em maior número de células, seguido pelo receptor *Vmn2r1*. Na literatura, sugeriu-se

que a co-expressão de V2RCs e V2RA/B/D pudesse ter algum papel funcional, na estabilização heterodimérica do receptor na membrana, ou ainda na co-deteção de ligantes. (MARTINI et al., 2001).

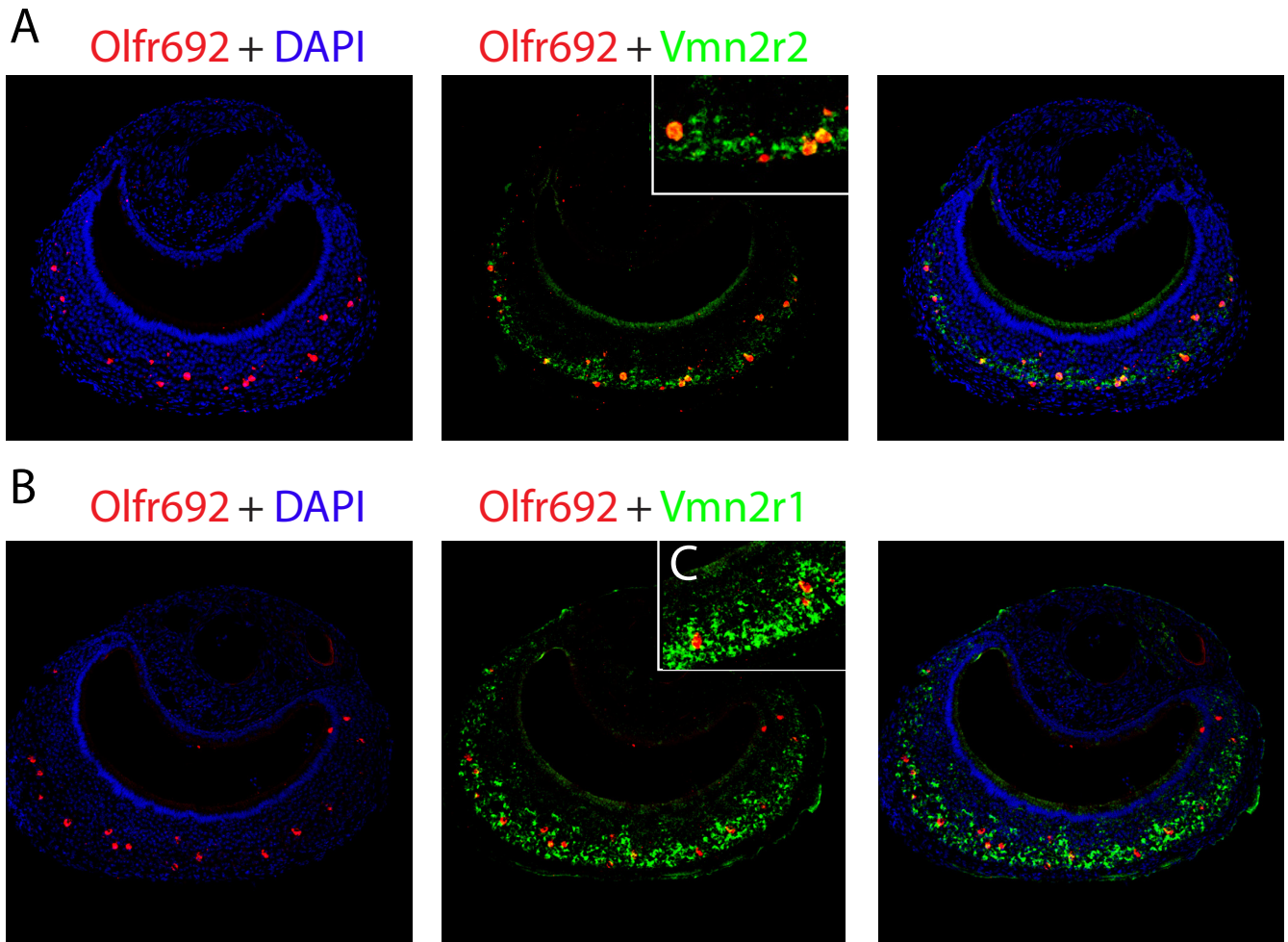


Figura 17: O receptor Olfr692 é co-expresso com receptores de classe C da família V2R. Encontramos colocalização entre o receptor Olfr692 e os membros Vmn2r2 e Vmn2r1. Ocorreu uma sobreposição bastante clara e consistente para o receptor Vmn2r2 (A) e uma sobreposição mais discreta, possivelmente facultativa entre o Olfr692 e Vmn2r1. Deve-se considerar que o receptor Vmn2r2 possui prevalência maior do que o receptor Vmn2r1 na população basal de VSNs no VNO.

Seguindo a lógica da co-expressão entre os receptores V2R, verificamos a expressão do receptor *Vmn2r2*, pertencente à subfamília C de receptores V2R, avaliada por hibridação *in situ* dupla, nas células que expressam o receptor OR *Olfr692* no VNO. Observamos colocalização com o receptor *Olfr692*, corroborando nossos dados anteriores de

que as células *Olfr692*-positivas estão na camada basal do VNO, que naturalmente expressam receptores V2R (**Fig. 17**).

Também foram feitos experimentos para analisar se ocorria colocalização entre o receptor *Olfr692* e o receptor *Vmn2r1* (**Fig. 17B**); aparentemente, a colocalização entre o receptor *Olfr692* e *Vmn2r1* ocorre com menor frequência do que a colocalização entre *Olfr692* e *Vmn2r2*. Entretanto, não sabemos se a diferença de colocalização de *Olfr692* com estes dois receptores da família C de V2Rs é real ou foi resultado de diferenças na eficiência das sondas empregadas. A princípio, as sondas para os dois receptores levariam à detecção das mesmas células, uma vez que as sequências de mRNA dos dois receptores V2R (NCBI: NM_019918.2 e NM_001104592.1 para os receptores *Vmn2r1* e *Vmn2r2*, respectivamente), têm nível de similaridade de sequência de 90% (dados não mostrados). Esse nível de similaridade ocasiona hibridação cruzada, ou seja, as sondas são capazes de hibridarem com ambos os receptores e, mais ainda, com todos os receptores da subfamília C. Novos experimentos não foram conduzidos para solucionar este problema, uma vez que não foi possível desenhar sondas específicas para cada receptor V2R de classe C, dada a similaridade alta entre os 7 membros desta família, ao longo de toda a região codificadora e regiões 5' não traduzidas. Planejamos solucionar este problema futuramente pelo emprego de anticorpos específicos contra estes receptores, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Roberto Tirindelli.

Em seguida, como último passo da etapa de caracterização, verificamos se as células que expressam o receptor *Olfr692* expressam também receptores V2R das outras subfamílias (A, B e D). Uma sobreposição entre a expressão do receptor *Olfr692* com receptores V2R, naturalmente encontrados no VNO, reforçaria a hipótese de que os ORs são expressos por acaso neste tecido, em virtude de algum mecanismo de regulação aberrante e impreciso, enfraquecendo a hipótese de que essa população de células no VNO possui função específica e definida.

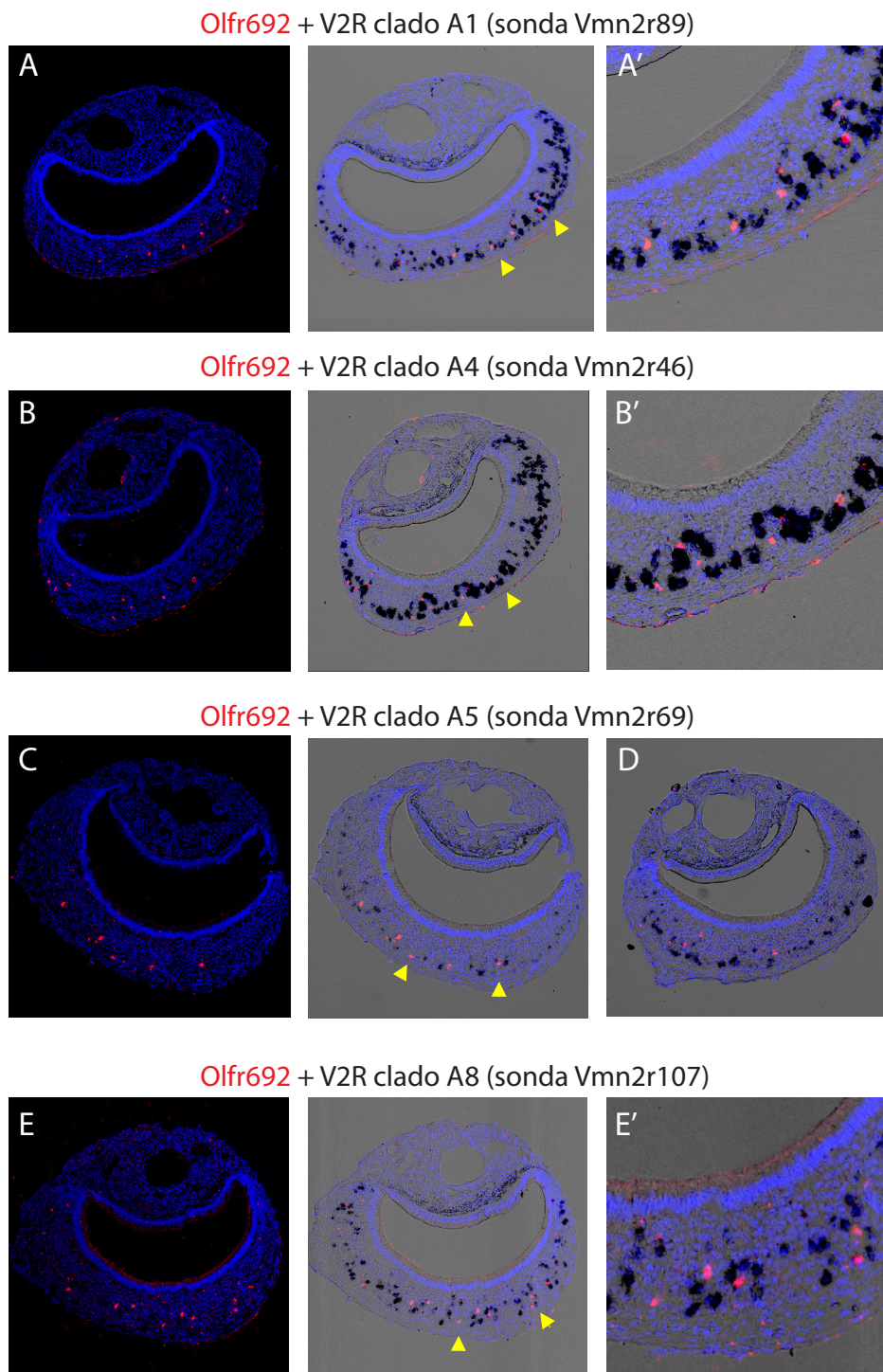


Figura 18: Ausência de co-expressão de Olfr692 com V2Rs. Experimentos de hibridação *in situ* dupla (fluorescente e colorimétrica) mostrando a ausência de expressão de Olfr692 (fluorescência vermelha) e receptores nos clados A1, A4, A5 e A8 de V2Rs (detecção colorimétrica). A', B' e E' mostram detalhes em maior magnificação das pranchas à esquerda. O receptor com base no qual a sonda clado-específica utilizada foi desenhada é mostrada entre parênteses acima de cada painel. Núcleos contra-corados com DAPI.

Foram feitas sondas para os receptores *Vmn2r89* (Clado A1), *Vmn2r46* (A4), *Vmn2r69* (A5) e *Vmn2r107* (A8). Uma vez que ocorre cross-hibridação da sonda com todos os receptores dentro de um mesmo clado da família V2R, cada sonda empregada foi capaz de cobrir as várias subfamílias (clados) de V2Rs existentes (**Fig. 18**). Não houve sobreposição entre as marcações dos receptores V2R e do receptor *Olfr692*, sugerindo que a expressão deste OR não ocorre em combinação com a expressão de receptores V2R. (**Fig. 18**).

6.4 Investigação funcional preliminar da população de células vomeronasais expressando ORs

Uma vez realizada a caracterização molecular das células que expressam o receptor *Olfr692*, nosso interesse foi o de realizar experimentos preliminares no sentido de identificar a função do receptor. Apesar de as células *Olfr692*-positivas apresentarem marcadores compatíveis com aqueles apresentados por VSNs funcionais, a funcionalidade dessas células ainda está em questão.

Para nossa análise preliminar, animais foram expostos *in vivo* a diversos estímulos puros ou complexos que são candidatos a ligantes para o receptor *Olfr692*. Nossos candidatos foram principalmente estímulos que possuem relevância biológica relacionada ao VNO e ligantes de receptores filogeneticamente relacionados ao receptor.

A ativação de células do VNO foi analisada utilizando um marcador de ativação neuronal, o IEG *Egr1*, que foi validado na literatura para a finalidade de investigação de ativação de VSNs frente à exposição a estímulos complexos (ISOGAI et al., 2011).

6.4.1 Exposição a estímulos relacionados a predadores e a estímulos intraespecíficos conhecidos

Os VSNs da camada basal do órgão vomeronasal são responsivos a feromônios, entre os quais proteínas encontradas na urina dos próprios camundongos, de ratos e na saliva de gatos domésticos (PAPES et al., 2010). Desta forma, estímulos de predadores e de

co-específicos se tornaram candidatos a serem os ligantes que ativam as células expressando ORs no VNO.

Para a verificação da capacidade de estes ligantes ativarem as células estudadas neste projeto, utilizamos um protocolo de hibridação *in situ* dupla desenvolvido em nosso laboratório, onde ocorre a detecção indireta de ativação neuronal através da análise da expressão do gene *Egr1*, concomitantemente à detecção da expressão de *Olfr692*, em animais expostos aos ligantes citados acima. Nestes experimentos, a co-expressão entre o marcador *Egr1* e *Olfr692* indicaria que o estímulo ao qual o animal foi exposto tem a capacidade de ativar as células expressando ORs no VNO.

Nossos experimentos de hibridação *in situ* dupla demonstraram, entretanto, que as células *Olfr692*-positivas não coincidem com as células responsivas a estímulos provenientes de gato doméstico (**Fig. 19A-C**), indicando que os odores deste predador não ativam VSNs expressando *Olfr692*. Outros estímulos crus de predadores e as próprias proteínas com atividade de feromônio de gato e rato ainda não foram testados para verificar se ativam a subpopulação de neurônios vomeronasais sob estudo.

Em fêmeas, as células *Olfr692*-positivas tampouco se sobrepõem àquelas ativadas após exposição à maravalha odorizada por camundongos machos (**Fig. 19D-F**). Importaneamente para a discussão que se segue, machos expostos a maravalha odorizada por camundongos fêmeas não-lactantes não apresentam ativação detectável no VNO (**Fig. 19G**), e, portanto não há sobreposição de neurônios ativados com células *Olfr692*-positivas.

Estes estímulos olfativos testados, que são estímulos de grande relevância biológica, pois intermedeiam de respostas fisiológicas e comportamentais estereotipadas, não foram capazes de causar a ativação das células *Olfr692*-positivas, como se vê na **Figura 19**. Apesar de esses serem os primeiros candidatos, análises genômicas de receptores OR e dos artigos que identificaram ligantes para receptores OR nos propuseram novos ligantes para serem testados.

6.4.2. Os receptores OR expressos no VNO pertencem à classe I de receptores de odorantes, que detectam ácidos alifáticos

Utilizando o software de análise filogenética MEGA (KUMAR et al., 2012), foi feito o alinhamento entre os receptores OR, sendo posteriormente obtida uma árvore filogenética dos receptores dessa família. Este procedimento revelou que o receptor Olfr692 pertence à classe I de receptores de odorantes.

Receptores OR de classe I são receptores encontrados em peixes e anfíbios e eram considerados relíquias evolutivas em mamíferos (FREITAG et al., 1995). Esses receptores ocupam um cluster específico no cromossomo 7 de camundongos e são compartilhados com outros filos. Eles compõem uma pouco numerosa em camundongos, possuindo cerca de 40 famílias. Curiosamente, muitos dos receptores de classe I cujos ligantes foram identificados respondem a compostos alifáticos (MALNIC et al., 1999; ZHANG; FIRESTEIN, 2002).

Por outro lado, os receptores de classe II são específicos de mamíferos, possuem um grande número e receptores, classificados por (ZHANG; FIRESTEIN, 2002) em 185 famílias distintas, que se distribuem por 18 dos 20 cromossomos murinos

Os receptores OR de classe I possuem alguns membros já deorfanizados (MALNIC et al., 1999; SAITO et al., 2009; NGUYEN et al., 2012). Os ligantes identificados para estes receptores são ácidos alifáticos de 7 a 10 carbonos, tais como ácidos heptanoico, octanoico, nonanoico e decanoico. Posteriormente, foi feito um alinhamento especificamente entre os receptores de classe I, cujos membros foram parcialmente deorfanizados (MALNIC et al., 1999; SAITO et al., 2009; NGUYEN et al., 2012). Tal árvore filogenética está representada na **figura 20**, em que os ácidos alifáticos identificados como ligantes dos receptores OR de classe I estão representados por cores diferentes.

Desta forma, levantamos a hipótese de que o receptor Olfr692 fosse ativado por estes compostos. Como será detalhado adiante, foram realizados experimentos para identificar ativação neuronal no VNO por avaliação do IEG *Egr1* a partir de amostras de VNO de animais expostos a estes ácidos.

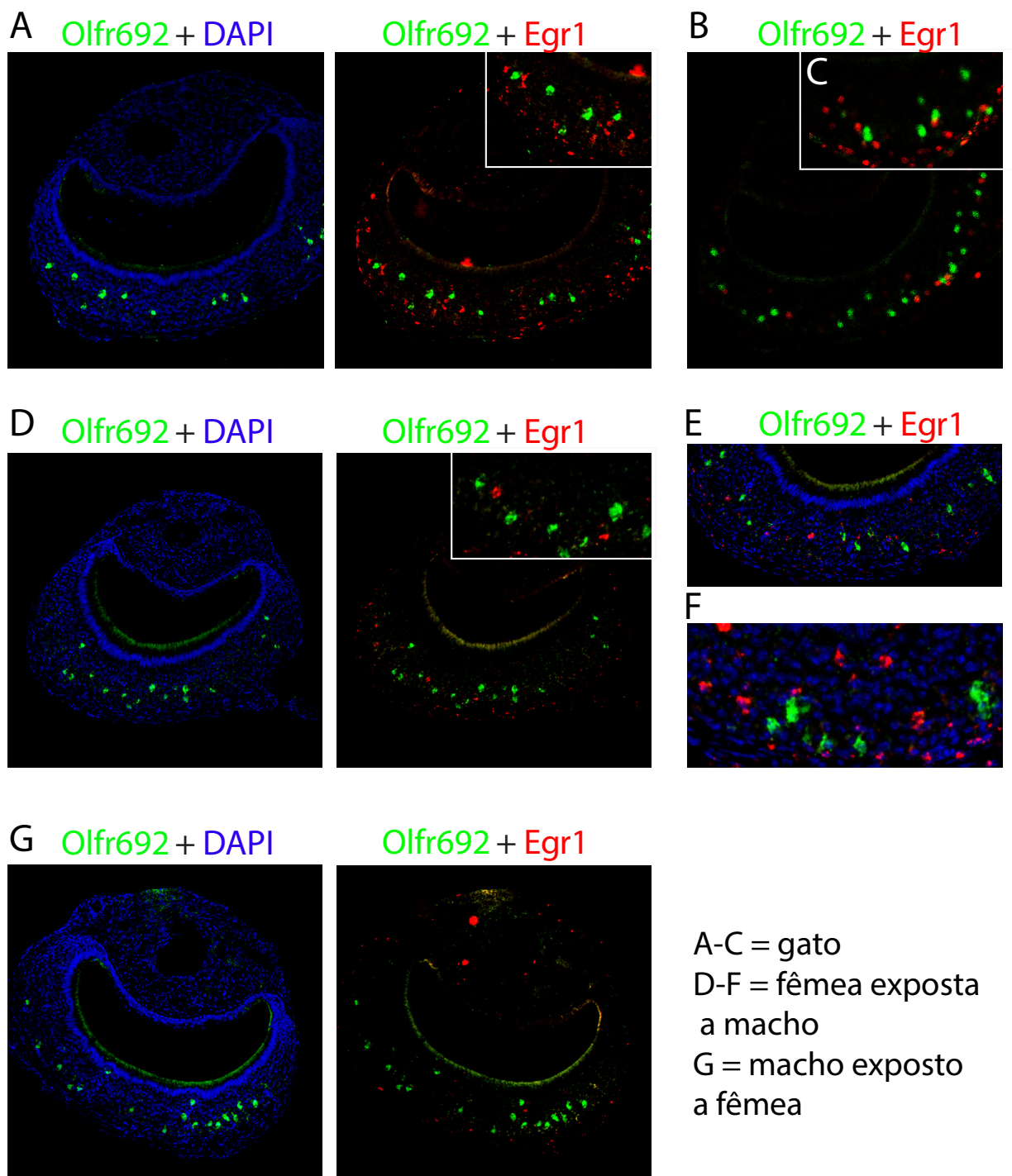


Figura 19: Células *Olfr692*-positivas não são ativadas por odor de sexo oposto ou predadores. Experimentos de hibridação *in situ* dupla fluorescente para *Olfr692* (verde) e o marcador de ativação *Egr1* (vermelho) em animais expostos a odor de gato (A e B) [detalhe em maior magnificação para outro animal em C], fêmeas expostas a odor de maravalha odorizada por machos (D-F), ou machos expostos a odor da maravalha odorizada por fêmeas (G). A e D contêm insets com detalhes em maior magnificação das pranchas associadas.

De modo resumido, foram feitos experimentos de exposição utilizando ácido butírico, ácido octanoico, ácido nonanoico e ácido decanoico utilizando a concentração inicial de 10mM. Além disso, foram feitos testes utilizando uma mistura dos mesmos 3 ácidos na concentração de 100mM.

Entretanto, até o momento, não foi identificada responsividade das células *Olf692*-positivas a esses compostos (vide abaixo). Além disso, a responsividade das células expressando *Olf692* frente a uma variedade de compostos, incluindo os ácidos mencionados acima, foi avaliada em sistemas de expressão heteróloga, em colaboração com o Dr. Darren Logan, pesquisador do Wellcome Trust Sanger Institute. Da mesma forma, não foi identificada ativação de células em cultura expressando o receptor *Olf692* de forma funcional por qualquer ligante testado (vide detalhes abaixo).

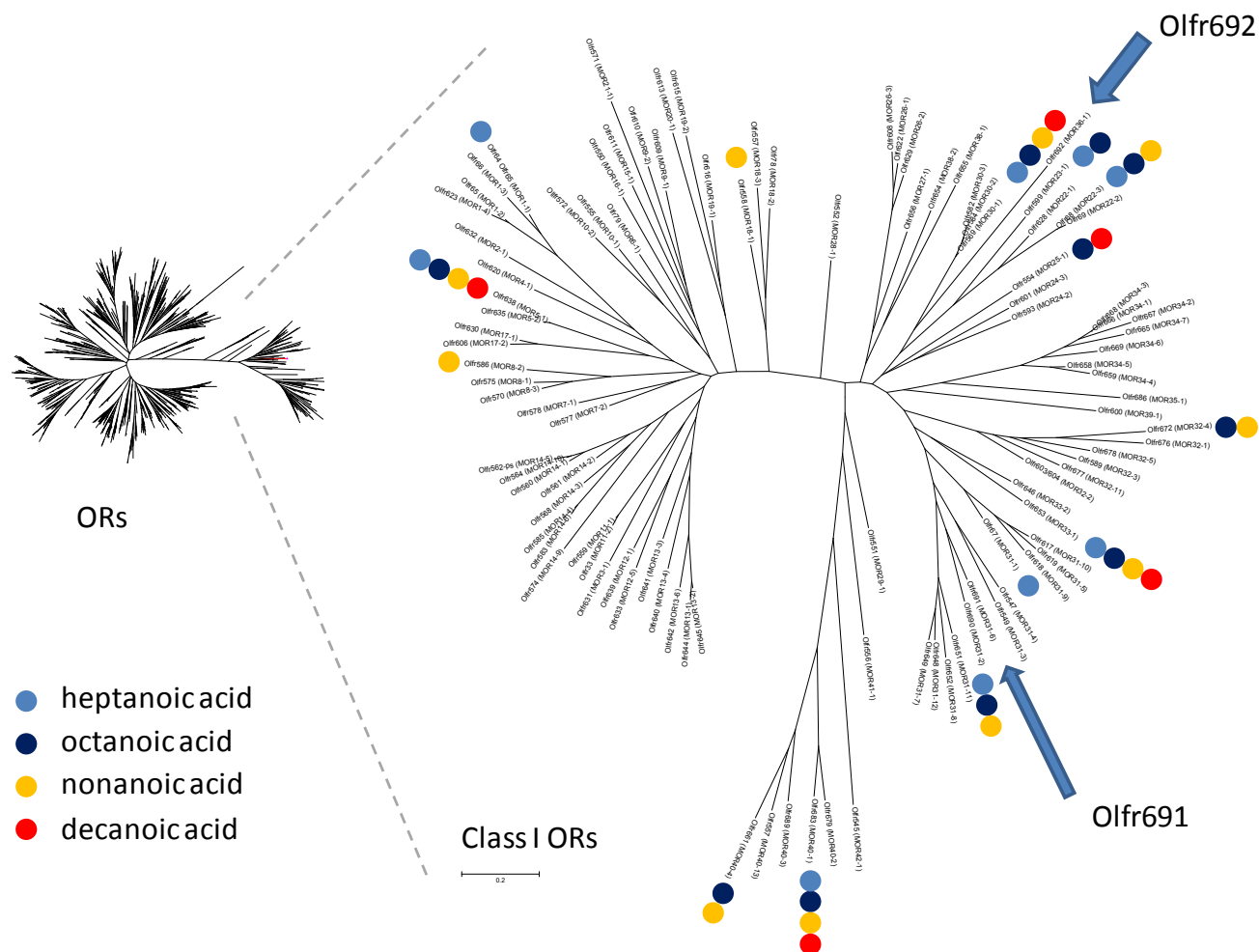


Figura 20: **Árvore de genes, mostrando as relações de similaridade (ao nível de proteína) entre os membros da classe I de receptores OR.** Vários receptores na classe I respondem a ácidos alifáticos de cadeia curta, como ácidos heptanoico, octanoico, nonanoico e decanoico. As respostas de receptores avaliados na literatura aparecem em código de cores (legenda à esquerda). Note que vários receptores similares ao membro Olfr692 respondem a estes compostos, presentes abundantemente no leite de mamíferos.

Dado que era de nosso interesse identificar o ligante do receptor Olfr692 e que havíamos verificado que esse receptor pertence à classe I de ORs, decidimos investigar por hibridação *in situ* a expressão, no VNO, de outros receptores de classe I: Olfr638 e Olfr569, ambos receptores para os ácidos heptanoico, octanoico, nonanoico e decanoico; e o receptor Olfr691, que é o receptor OR mais próximo do receptor Olfr692 no cluster em que os receptores de classe I se encontram no cromossomo 7 no genoma do camundongo. (Fig. 21).

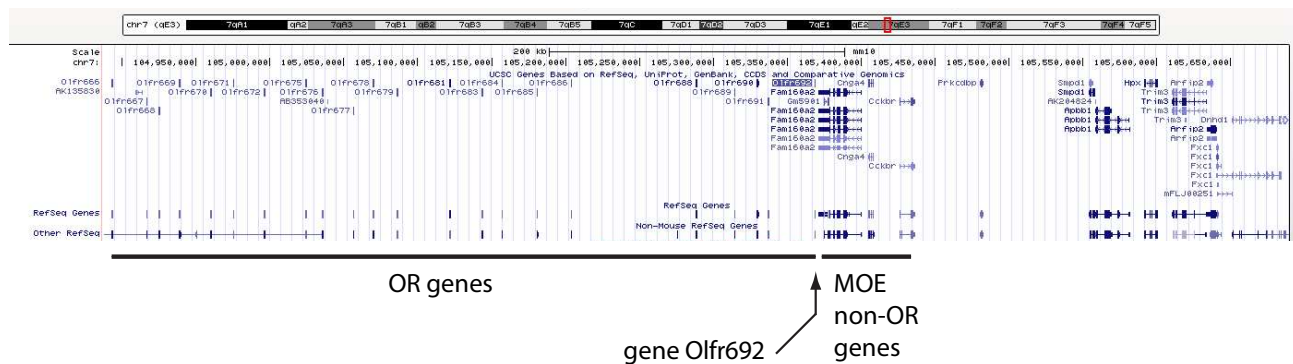


Figura 21: **Representação do Cromossomo 7 onde se encontra o Cluster de receptores OR de Classe I.** À esquerda do receptor Olfr692 encontram-se outros receptores OR de Classe I, à direita, encontram-se genes expressos no MOE, mas que não fazem parte dos receptores OR de classe I.

Essas sondas foram testadas em hibridação *in situ* cromogênica para o VNO e para o MOE. Não houve detecção dos três receptores testados no VNO (Fig. 22), mas todos eles tiveram sua expressão confirmada no MOE, indicando que apesar da proximidade no genoma e do fato de se tratarem de receptores de classe I, o receptor Olfr692 é expresso no VNO de modo singular, diferente de outros receptores OR.

Além disso, esse experimento serviu para validar nossos dados de RNA-seq, uma vez que aqueles receptores não tinham sua expressão indicada nas bibliotecas (Fig. 22).

6.4.3 Ensaio de exposição a Ácidos Alifáticos utilizando o IEG *Egr1*

Devido ao alto nível de similaridade entre o receptor Olfr692 e receptores responsivos aos ácidos alifáticos, foram testados como candidatos a ligante do receptor Olfr692 os ácidos octanoico, nonanoico e decanoico na concentração de 100mM. Conforme os protocolos de exposição utilizados neste projeto, os ácidos alifáticos foram diluídos utilizando óleo mineral e os animais foram expostos por 45min a 1ml de solução aspergida sobre gaze médica.

Olfr691



Olfr638



Olfr569

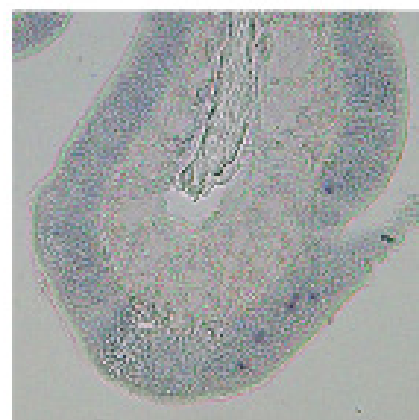
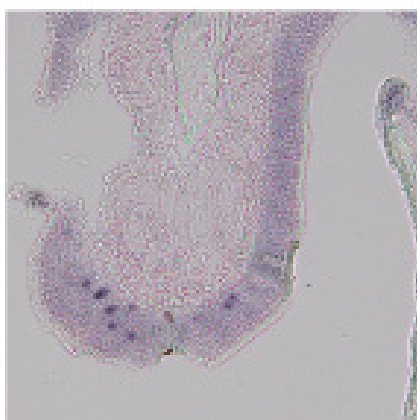
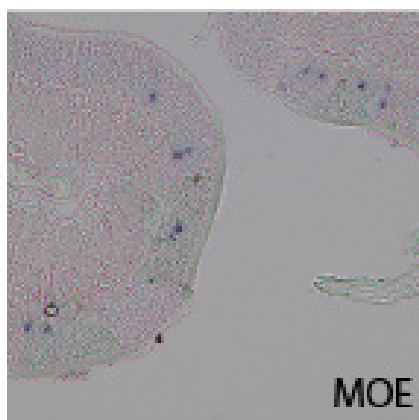


Figura 22: **Receptores Olfr691, Olfr638 e Olfr569 não expressos no VNO.** Os experimentos de hibridação *in situ* colorigência confirmaram os dados de RNA-seq, em que não foi detectada a expressão dos três receptores do VNO. No MOE, linha inferior da figura, todos os receptores tiveram sua expressão detectada no MOE.

Nesse experimento em particular, antes da colocação entre o receptor Olfr692 e o IEG *Egr1*, foi realizada uma hibridação *in situ* fluorescente para o IEG *Egr1*. Apesar dessa abordagem não permitir, em um primeiro momento, a identificação da colocação entre o receptor e a ativação neuronal, o objetivo desse experimento foi averiguar se essa

concentração de odorante seria suficiente para a identificação de ativação de VSNs. Não foi identificada a ativação dessas células utilizando o IEG *Egr1* em animais adultos, onde a expressão do receptor *Olfr692* já é alta (**Fig. 23**).

Esses candidatos a ligantes para o receptor *Olfr692* também foram analisados em ensaios de ativação celular em sistema de ensaios de ativação medidos pela expressão de Luciferase, conforme descrito a seguir. Outros compostos também foram sugeridos como possíveis ligantes para esse receptor e testados da mesma maneira (vide item abaixo).

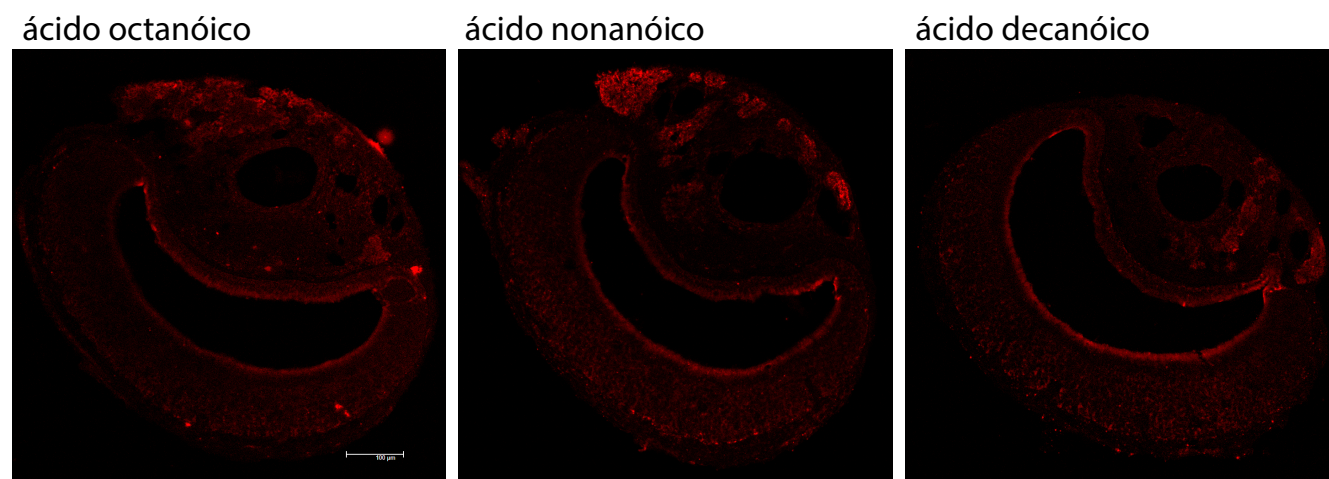


Figura 23: Ácidos alifáticos na concentração de 100mM não são capazes de deflagrar ativação de receptores Olfr692-positivos no VNO. A exposição aos ácidos não foi capaz de ativar consistentemente células no VNO. Barra de escala representa 100μm.

6.4.4 Ensaios de detecção de Ácidos Alifáticos pelo receptor *Olfr692* em sistemas heterólogos

Baseado na similaridade entre o receptor *Olfr692* e os demais receptores OR de classe I, foram realizados pelo grupo de pesquisa do Dr. Darren Logan experimentos de verificação da detecção de uma série de compostos pelo receptor *Olfr692* expresso e de maneira funcional em células em cultura (sistema heterólogo), utilizando medição da atividade de luciferase como método de ensaio. Imaginou-se que esta estratégia permitiria a identificação de candidatos a ligantes para o receptor *Olfr692*. Nos ensaios, este receptor foi expresso em um sistema de expressão heteróloga baseado em células da linhagem Hana3.

De modo resumido, as células são cotransfectadas com plasmídeos para o receptor sob estudo e para o gene da luciferase controlado por um promotor sensível à

atividade gerada pelo receptor, no caso, um promotor sensível ao acúmulo de AMP cíclico, produto da ativação de células que expressam receptores OR. O acúmulo de AMP cíclico então sensibiliza um promotor que causa um aumento da expressão da luciferase, que pode ser medido através de métodos quimioluminescentes. Essa molécula causa então uma luminescência momentânea que pode ser medida por um luminômetro. Este ensaio indica se houve ou não ativação celular mediante a exposição das células a diferentes concentrações de uma determinada substância química.

Nesse tipo de ensaio, foram testados os mesmos ácidos alifáticos listados acima, além do ácido heptanoico, em diferentes concentrações em comparação com um controle. Entretanto, não foi observada ativação nessas células de ensaio heterólogo. (Fig. 24).

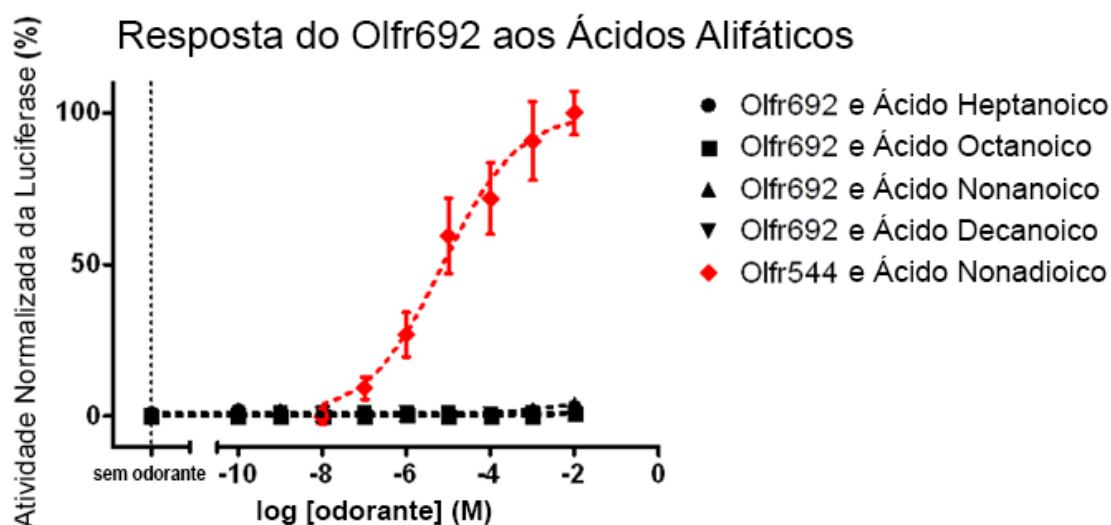


Figura 24: Células expressando o receptor Olfr692 em ensaio heterólogo não são ativadas pelos ácidos alifáticos ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico e ácido decanoico. Em comparação com o controle, o receptor Olfr544 que é responsivo ao ácido nonadioico, a ativação das células expressando o receptor Olfr692 é nula para a exposição a esses ácidos alifáticos.

Além dos ácidos alifáticos de cadeia curta, essa ferramenta de ensaio em sistema heterólogo é muito poderosa em termos do número de compostos que é possível ensaiar. Nosso grupo colaborador avaliou outros compostos que são candidatos em potencial para serem ligantes do receptor Olfr692. (**Tabela 2**)

Nenhum dos compostos avaliados tiveram resultado positivo para a ativação das células expressando receptor *Olf692*. Os critérios para a escolha desses candidatos a ligantes não estão evidenciados na tabela; entretanto, esses compostos são feromônios de alarme, odores de predadores, ligantes para OR de classe I, feromônios conhecidos, ligantes para receptores V1R.

Tabela 2: Compostos testados em ensaio de Bioluminescência utilizando Luciferase Recombinante.

N°	Nome	N°	Nome
1	Ácido 3-metil-Butanóico	29	p-Cresol
2	Ácido Nonadióico	30	Eucaliptol
3	Ácido Octanodióico	31	Isoborneol
4	Ácido Butírico	32	(+)-Fenchona
5	Ácido Pentanóico	33	(-)-Fenchona
6	Ácido Hexanóico	34	Pentadecalactona
7	Ácido Heptanóico	35	2-Heptanona
8	Ácido Octanóico	36	1,2-Propanodiol
9	Ácido Nonanóico	37	2,6-Dimetilpirazina
10	Ácido Decanóico	38	2,5-Dimetilpirazina
11	(+)-Carvona	39	1,3-Ditiolano
12	(-)-Carvona	40	Tiociiclobutano
13	(+)-Diidrocarvona	41	TMT
14	2-cumaranona	42	m-Anisalaldeído
15	Acetato de Fenila	43	p-Anisalaldeído
16	Acetato de Benzila	44	Etil-Vanilina
17	Hexano-3,4-diona	45	Propionato de Etila
18	Hexano-2,3-diona	46	Acetato de Etila
19	4-Hidroxycumarina	47	Cumarina
20	1-Pentanol	48	Acetofenona
21	Fenilacetato de alila	49	4-Cromanona
22	R-(-)-2-Ácido Fenilbutírico	50	Diidrojasmona
23	S-(+)-2-Ácido Fenilbutírico	51	Cicloexanona
24	Indol	52	Butano-2-ona
25	16-Hexadecanolídeo	53	Ácido 2-Bromoocetanóico
26	Muscona	54	Ácido 8-Bromoocetanóico
27	Terc-butil-cicloexanol	55	Ácido 2-Bromoexanóico
28	Tetrametilbenzeno		

Outros compostos também se apresentam como bons candidatos a ligante para o receptor Olfr692, por exemplo, ácidos graxos presentes no leite (por exemplo, ácido palmítico, ácido esteárico), que podem possuir grande significado biológico. Estes compostos serão futuramente testados nos dois tipos diferentes de ensaios de ativação celular descritos acima.

6.4.5 Exposição de animais a compostos presentes no leite e a odores de fêmeas lactantes

O leite é uma fonte provável de estímulos olfativos, importante não somente para a nutrição de filhotes, mas também para fornecer informações capazes de regular comportamentos entre indivíduos da mesma espécie. Por exemplo, compostos do leite podem ser atrativos (de modo inato) para juvenis e filhotes, mas repulsivos a adultos, levando a comportamentos de amamentação controlados e restritos aos filhotes e suas mães. Desta forma, o leite foi escolhido como provável ativador das células expressando receptores OR no VNO. Esta escolha se baseou não somente na importância, ainda pouco apreciada e estudada, do leite como fonte de odores, mas também porque ácidos alifáticos de cadeia curta são encontrados abundantemente no leite.

Levantamos a hipótese de que o receptor Olfr692 possa estar envolvido com a detecção de compostos do leite, resultando na geração de respostas comportamentais apropriadas frente a este estímulo sensorial; uma das nossas hipóteses foi a de que o receptor Olfr692 detectaria estes compostos apenas em indivíduos adultos, mediando comportamentos repulsivos em relação ao leite, o que é frequentemente observado em adultos de muitas espécies de mamíferos.

Nossos experimentos anteriores não comprovaram resposta positiva de neurônios vomeronasais *Olfr692*-positivos em animais expostos a ácidos alifáticos, que estão presentes em grande quantidade no leite. Entretanto, uma grande variedade de compostos também está presente nesta fonte de odores, incluindo compostos desconhecidos ou ainda pouco estudados. Desta forma, para avaliar a capacidade do leite em ativar nossas células, escolhemos utilizar fêmeas lactantes e o próprio leite como estímulos para verificar se a

função do receptor Olfr692 estaria relacionada ao leite. Para tanto, animais foram expostos a fêmeas lactantes e ao próprio leite extraído de fêmeas lactantes.

Ensaio preliminares utilizando fêmeas expostas a fêmeas lactantes indicaram que ocorre a expressão do IEG *Egr1* quando os animais são expostos a estes estímulos (**Fig. 25**). Esses ensaios tiveram caráter preliminar, já que era de nosso interesse investigar o estímulo presente no leite e os animais em fase de lactação significavam o acréscimo de mais variáveis para a análise.

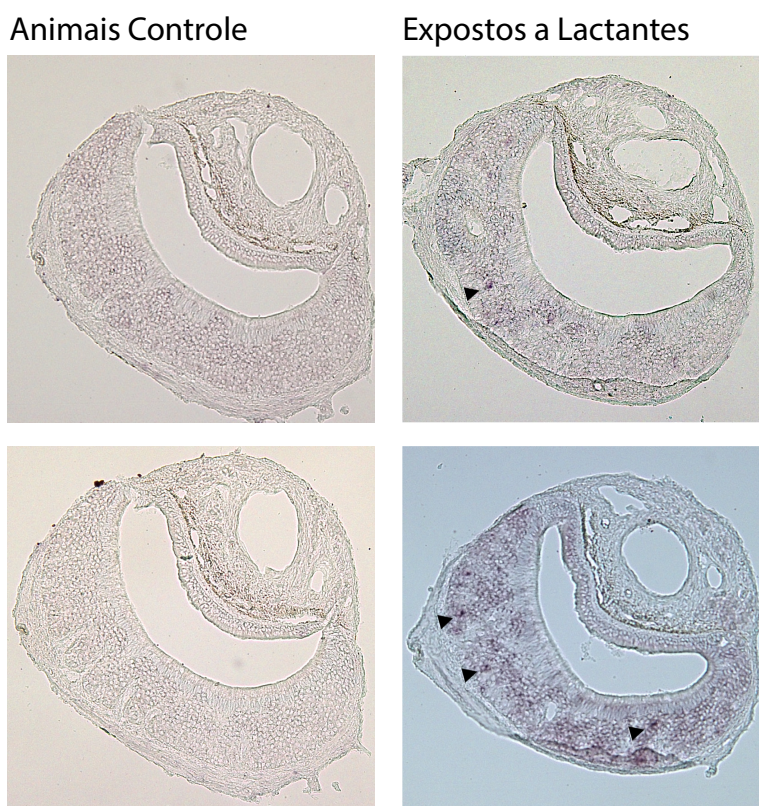


Figura 25: A exposição de animais C57Bl6J a fêmeas lactantes causa a ativação de neurônios sensoriais no VNO. Nos painéis da esquerda encontram-se os animais controle não expostos e nos direitos, os animais expostos a fêmeas lactantes por 45'. Pontas de seta indicam células marcadas pela detecção cromogênica para o IEG *Egr1*.

Por conta disso, decidimos fazer a extração de leite de fêmeas lactantes e, em seguida expor animais diretamente. Para esse experimento, utilizamos um protocolo de extração de leite (descrito detalhadamente nos métodos), que consistiu basicamente em superestimular as fêmeas anestesiadas utilizando o hormônio ocitocina e cloridrato de

metoclopramida (**plasil**) e em seguida extrair o leite com uma bomba de vácuo de pressão controlada.

Nos VNOs dos animais submetidos à exposição ao leite, foi observada ativação em neurônios olfativos do VNO, entretanto, essa ativação não foi colocalizada com a expressão do receptor *Olfr692* em indivíduos adultos (**Fig. 26**). Nos indivíduos juvenis ocorre uma expressão bastante limitada do receptor *Olfr692* e por isso, não esperávamos encontrar sobreposição entre o indicador de ativação e a marcação para o receptor *Olfr692* e, para esses animais juvenis, não foi observada ativação de neurônios do VNO, da mesma maneira como não se observa ativação de animais *TrpC2*^{-/-}, quer adultos, quer juvenis (dados não mostrados).

Com esses experimentos, a hipótese de o receptor *Olfr692* estar relacionado à detecção de compostos do leite, à lactação ou à amamentação foi enfraquecida. Embora os dados obtidos nesta etapa tenham permitido levantar novas questões e aventar novas hipóteses sobre a própria capacidade de o leite ativar o VNO (por exemplo, ficou em aberto a questão de quais são os receptores relacionados à amamentação), estes dados não permitiram avanços na identificação dos ligantes para os receptores OR expressos no VNO, e, portanto, não contribuíram para sua melhor caracterização funcional.

6.5 Ensaios Comportamentais de Tempo de Desmame Natural (NWT) para estudar a possível função dos receptores OR na detecção do leite

Uma vez que identificamos o leite como um possível estímulo para o VNO, passou a ser de nosso interesse identificar o envolvimento do VNO nos comportamentos envolvidos na lactação e no desmame. Para isso, estabelecemos um protocolo para identificar se havia diferenças entre os animais que possuem o VNO funcional e animais em que a função do VNO está ablacionada, com relação a estes comportamentos.

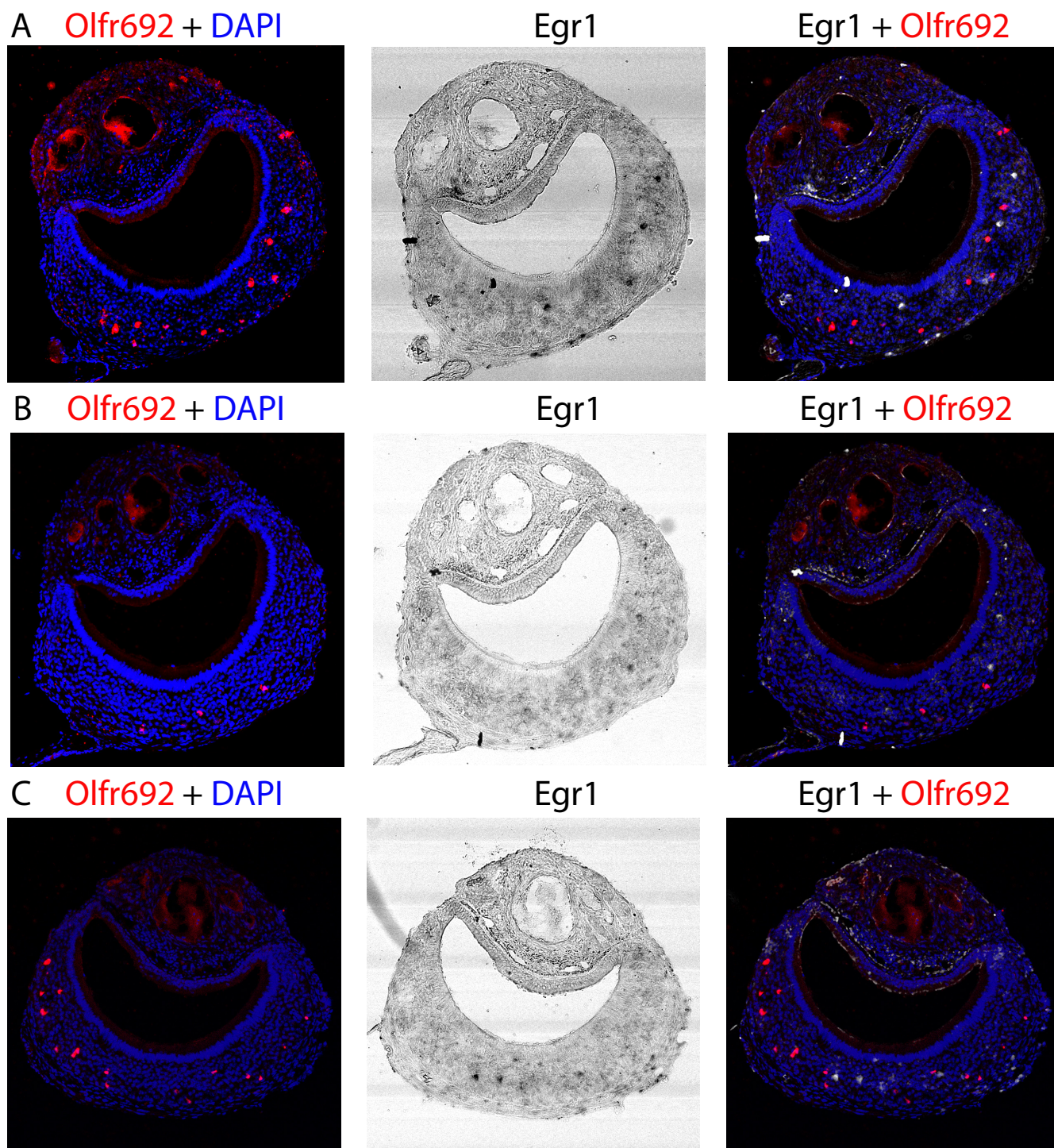


Figura 26: Células Olfr692-positivas não são responsivas à exposição ao leite de camundongos: O IEG Egr1 (desenvolvimento cromogênico, campo claro, coluna central) foi utilizado como marcador indireto de ativação neuronal. A, B e C são diferentes VNOs submetidos ao mesmo tratamento: exposição ao leite, sacrifício do animal e hibridação *in situ*. Na coluna central estão as micrografias obtidas em campo claro e na coluna direita essas imagens tiveram a coloração invertida em manipulador de imagens a fim de facilitar a identificação da colocalização.

Foram realizados cruzamentos entre animais knockout para o gene *TrpC2* (*TrpC2*^{-/-}) e animais heterozigotos para o gene (*TrpC2*^{+/-}), supondo que animais que possuem uma cópia funcional do gene *TrpC2* teriam uma resposta igual à apresentada pelo animal selvagem. A progênie desse cruzamento foi genotipada e mantida separada das fêmeas lactantes durante o período de uma noite. No dia seguinte, um a um, os animais foram colocados nas gaiolas das respectivas mães e o tempo até o início da mamada foi quantificado, até o tempo máximo de 5min. Algumas dessas medições foram feitas mais de uma vez para o mesmo animal e os resultados estão sumarizados na **Fig. 27**.

O racional desse experimento se baseia na co-expressão do receptor Olfr692 com *TrpC2*, e de nossa hipótese segundo a qual o receptor Olfr692 está envolvido de alguma forma com a lactação. Em animais *Trpc2*^{-/-}, as células Olfr692-positivas não estariam ativas e possíveis déficits em comportamentos associados poderiam ser medidos, em comparação com animais *TrpC2*^{+/-}.

Nossa hipótese era que as células Olfr692-positivas, por serem possivelmente capazes de detectar compostos do leite em períodos tardios do desenvolvimento, estariam envolvidas na repulsão ao leite. Assim, animais juvenis de idade mais avançada passariam a recusar o leite ou dariam preferência à procura de outra fonte de alimento. Portanto, em nossos ensaios, esperamos que em animais *TrpC2*^{-/-} este comportamento fosse perdido, levando os filhotes a demorarem menos tempo para encontrar a mãe e iniciar a mamada em comparação com animais *TrpC2*^{+/-}, onde a repulsão progressiva ainda seria mantida.

No modelo que propusemos para esse experimento assumimos que a atração pelo leite não seria intermediada necessariamente pelo VNO e as diferenças entre os intervalos de tempo entre o reencontro e a mamada seriam devidas à expressão do receptor Olfr692, e não a efeitos da perda de *TrpC2* em outras células do VNO.

Dessa forma, o tempo até a deflagração do comportamento de mamada em animais *Trpc2*^{-/-} seria menor do que o tempo de deflagração deste comportamento em animais que possuem pelo menos uma cópia do canal iônico *Trpc2* funcional (*Trpc2*^{+/-}). Nossos dados (**Figura 27**) indicam que tal efeito foi observado e é estatisticamente significativo. Entretanto, como comentado acima, ainda não podemos definir, através deste

experimento, se tal efeito é devido às células Olfr692-positivas estudadas neste projeto ou aos efeitos (primários ou secundários) derivados da perda de TrpC2 no VNO ou no MOE.

É possível dizer, através destes experimentos, no entanto, que o comportamento de mamada está relacionado a células TrpC2-positivas, o que representa um dado novo, que merecerá investigações futuras mais aprofundadas, pois sugere que o VNO possa estar relacionado com este importante comportamento social.

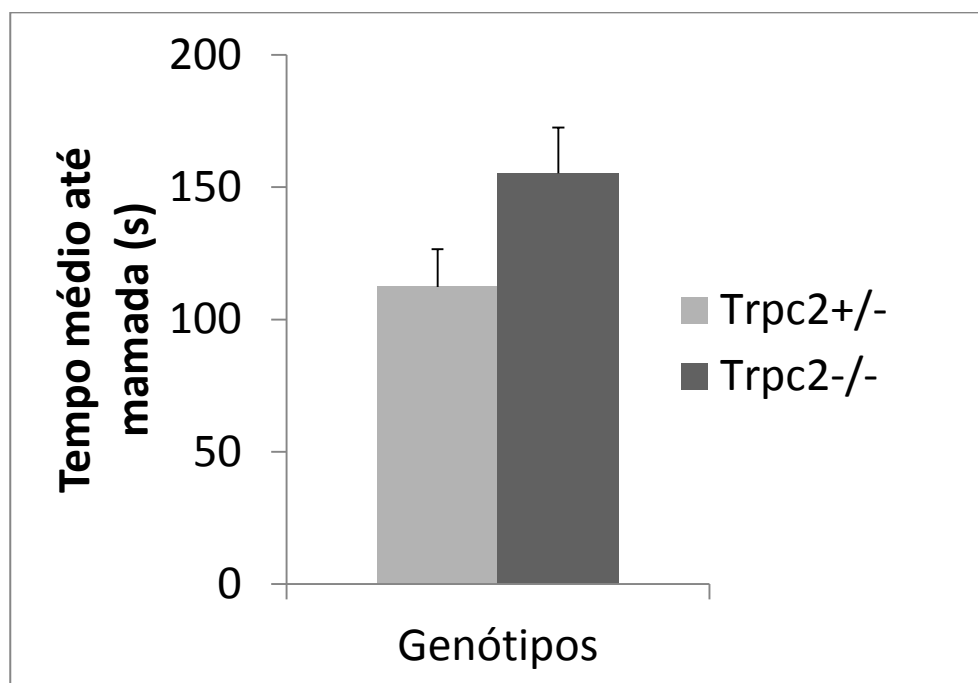


Figura 27: Avaliação do tempo médio até mamada. Animais de 2 a 3 semanas foram mantidos em jejum overnight a fim de avaliar o tempo de desmame do genótipo TrpC2+/- em comparação com o genótipo TrpC2-/- . A barra representa o erro padrão da média.

7. Discussão

7.1 Análise da expressão dos receptores OR no Órgão Vomeronasal

Os experimentos de hibridação *in situ* confirmaram a expressão do receptor *Olf692* apontada pelos dados de RNA-seq e PCR em Tempo Real e, além disso, demonstraram que sua expressão ocorre em células presentes no epitélio olfativo, em um número compatível com o de células que expressam receptores V2R.

Se comparado com o receptor *Vmn2r41*, que devido a um fenômeno de cross-hibridação reconhece receptores de todo o clado A4 de receptores V2R (são reconhecidos cerca de 10 genes), obtivemos um número de células compatível com a expressão desse receptor V2R. Uma média de 12 células foi observada por corte em animais adultos e esse número de células foi consistente entre os diversos animais analisados. O epitélio olfativo possui área de cerca de 0,08mm² e essa área mínima apresenta cerca de 12 células *Olf692*-positivas. Esse número de células e a consistência de sua expressão entre indivíduos adultos nos indicou a existência de uma subpopulação específica expressando o *Olf692* no VNO, que pode possivelmente ser funcional.

A menor expressão de *Olf78* no VNO, se considerada em relação ao número de células contendo tal receptor, é condizente com dados prévios na literatura (LEVAI et al., 2006) e com nossos dados de RNA-seq do VNO, que indicam um baixo valor de FPKM para este gene (**Fig. 8**).

Não confirmamos a expressão dos receptores *Olf124* e *Olf1509*, que constavam nos nossos dados iniciais de RNA-seq, através de PCR em tempo real ou hibridação *in situ*. Desta forma, elaboramos e testamos uma hipótese para explicar a expressão dos genes *Olf124* e *Olf1509* nas bibliotecas de RNA-seq do VNO: Deve ter havido contaminação durante a dissecação do material utilizado para a construção das bibliotecas com pequena quantidade do órgão septal de Maserà, onde cerca de metade das células expressa o receptor *Olf124* e cerca de 12% expressa o receptor *Olf1509* (GROSMAITRE et al., 2009).

O teste desta hipótese foi realizado através de um experimento de PCR em Tempo Real utilizando duas amostras distintas de cDNA obtido a partir de mRNA do VNO, a primeira delas utilizando a mesma técnica de dissecação empregada para obter os VNOs cujo mRNA foi utilizado para a geração das bibliotecas de RNA-seq e uma segunda dissecando os VNOs com maior precisão, removendo qualquer resquício do Órgão Septal de Masera. O resultado do *Real-Time* PCR comparativo entre as amostras demonstrou que essa contaminação foi determinante para uma análise não precisa da expressão dos receptores OR no VNO (**Fig. 7**).

Dado que nossas bibliotecas de RNA-seq se demonstraram contaminadas com amostras vindas do SOM, não as consideramos confiáveis para expressão positiva de outros receptores OR no VNO. Apesar disso, houve diferenças entre a expressão de ORs relatada nos dados vindos de (LEVAI et al., 2006) e os dados obtidos através do RNA-seq. Alguns dos receptores reportados na literatura como expressos no VNO não possuíam sua expressão no VNO confirmada nas bibliotecas de RNA-seq; vale lembrar que como houve contaminação com o SOM, a negativa para a expressão de um dado receptor é mais confiável do que uma expressão positiva, que pode ser expúria.

Para alguns receptores OR pouco expressos no VNO, pode estar havendo algum tipo de controle “frouxo” sobre a regulação de sua expressão, levando possivelmente a um nível de expressão baixo e aleatório desses receptores no VNO. Este não parece ser o caso para os receptores *Olfr692* e *Olfr78*, que possuem sua expressão invariável entre diferentes animais e, no caso do receptor *Olfr692*, compatível com o de células funcionais V2R positivas.

Para prosseguir na investigação da expressão do receptor *Olfr692*, foram realizados experimentos de hibridação *in situ* para o receptor ao longo do desenvolvimento do animal desde o nascimento até a idade adulta. A expressão desse receptor foi observada em indivíduos adultos, e não em animais jovens, não havendo detecção da expressão em animais P0, P10 e P20. A partir de P30, foram observadas 2 a 3 células por corte e após P60, observa-se o número de células que observamos nos experimentos iniciais, cerca de 12 células por corte. Esse padrão de expressão temporal significa que deve estar havendo algum tipo de regulação distinta da expressão dos receptores V2R, pois estes são expressos

nos VSNs desde o desenvolvimento embrionário, estando presentes em níveis idênticos ao adulto ao longo do desenvolvimento do animal a partir do nascimento, desde a idade P0 até P60 (**Fig. 10**).

7.2 Caracterização molecular das células *Olf692*-positivas

Células *Olf692*-positivas foram estudadas de maneira abrangente quanto à sua caracterização molecular. Apesar de as informações sobre a expressão de outros receptores OR no VNO vindas das nossas bibliotecas de RNA-seq mostrarem expressão de alguns receptores OR, optamos pelo receptor *Olf78* como representante dos receptores OR para a análise de uma expressão monogênica de ORs no VNO.

Não houve sobreposição entre as marcações para esses dois receptores no VNO (**Fig. 10**). O receptor *Olf78* é expresso em uma população menor de células, aparentemente localizadas em uma região mais apical do epitélio olfativo do VNO, enquanto a distribuição da população que expressa os receptores *Olf692* é mais basal, onde estão presentes células que expressam receptores V2R.

Embora uma análise mais completa seja necessária para afirmar com certeza que a expressão de receptores OR no VNO se dá de forma monogênica, utilizando sondas para todos os receptores OR expressos no VNO, o fato de os níveis de expressão dos demais receptores OR ser muito baixos combinada com a não-sobreposição entre os receptores OR *Olf78* e *Olf692* no VNO corroboram a hipótese de que no VNO essas populações obedecem à “regra - um receptor um neurônio”. (SERIZAWA et al., 2004).

Cada um dos marcadores será comentado a seguir, entretanto, a Tabela 3 sumariza as características moleculares dessa nova população, entre os marcadores para as populações sensoriais conhecidas.

7.2.1 Expressão de moléculas das vias de transdução de sinal clássicas dos OSNs e VSNs

Houve clara sobreposição entre a expressão do receptor *Olf692* e o gene *TrpC2*, que participa da via de transdução de sinal dos VSNs. Em contrapartida, não foi detectada a

expressão dos genes da via de transdução de sinal dos OSNs canônicos, como *CNGA* e também não foi detectada a expressão de proteína $G_{\alpha olf}$, que participam da cascata de transdução de sinal dos OSNs no MOE. Por outro lado, essas células também expressaram proteína $G_{\alpha o}$ e não expressaram proteína *Gai2*, indicando uma possível participação do gene $G_{\alpha o}$ na transdução de sinal dessas células.

Entretanto, no MOE, receptores olfativos de classe OR acoplam com proteínas $G_{\alpha olf}$, enquanto que o receptor *Olfr692* colocou com moléculas $G_{\alpha o}$. Seria uma possibilidade que essas GPCRs acoplassem e transduzissem sinal utilizando $G_{\alpha o}$ ao invés do $G_{\alpha olf}$ canônico? Será que a subunidade $G_{\alpha o}$ não poderia ser, também expressa no MOE e acoplada aos receptores OR naquele neuroepitélio? Qual será, de fato, o comprometimento entre GPCRs e suas respectivas proteínas G: quão promíscuas essas GPCRs podem ser para garantir a transdução de sinal? Em sistemas recombinantes, qual proteína G é utilizada para a transdução de sinal desses receptores.

7.2.2 Colocalização com as moléculas H2-M10.

Não houve colocalização entre a expressão de *Olfr692* e *H2-M10.2*, *H2-M10.5* e *H2-M10.6*, e são necessários novos experimentos para analisar a expressão dos demais genes desta família com o receptor *Olfr692*. Embora esses genes ainda tenham função obscura eles são expressos na camada basal do epitélio olfativo do órgão vomeronasal. A não-colocalização desses genes com o receptor *Olfr692* pode reforçar a hipótese de uma população de função ou funcionamento distinto das células V2R-positivas.

Dado que esses genes H2-M10 possuem função de transporte de receptores V2R ABD para os dendritos (LOCONTO et al., 2003), qual será a função desses genes em células que não expressam receptores V2R A B ou D? Será que a sua função de transporte seria necessária para as moléculas ou o mecanismo para o transporte para os receptores OR para os dendritos se dá por outras vias?

7.2.3 Sobreposição com a expressão de receptores V2R

Obtivemos sobreposição entre o receptor *Olfr692* e o receptor *Vmn2r2*. Este receptor faz parte do clado C de receptor V2R e receptores deste clado (sobretudo *Vmn2r1* e

Vmn2r2) são co-expressos com outros receptores V2R, representantes de outros clados (MARTINI et al., 2001). Receptores do clado C da família V2R são marcadores importantes da população basal dos VSNs.

A avaliação da co-expressão com outros receptores mostrou que o *Olfr692* não é co-expresso com receptores dos clados A1 (*Vmn2r89*), A4 (*Vmn2r46*), A5 (*Vmn2r69*) e A8 (*Vmn2r107*). É possível afirmar que não foi observada sobreposição entre os receptores analisados e o receptor *Olfr692*, isto sugere que o receptor *Olfr692* não é co-expresso com receptores V2R de classes A, B e D. Esses receptores, de classes A, B e D parecem ser os receptores relacionados à detecção de feromônios pelo VNO, embora o único receptor que teve seu ligante identificado tenha sido o *Vmn2r116*, cujo ligante é um peptídeo secretado pelo canal lacrimal de camundongos, chamado ESP1 (HAGA et al., 2010). Embora não tenham seus receptores identificados, proteínas MUP (Major Urinary Protein) também desencadeiam ativação de células no VNO, mediadas por receptores de classes ABD (dados do nosso laboratório ainda não publicados).

Este perfil de expressão de marcadores, somado ao alto nível de expressão do receptor *Olfr692* no VNO e sua regulação fina, já que o receptor é expresso durante a puberdade e idade adulta, levou à sugestão de que a expressão não se trata de uma falha de regulação (ou expressão “leaky”).

O receptor *Olfr692* teve sua expressão específica no VNO inequivocamente confirmada tanto por hibridação *in situ* quanto por *Real-Time* PCR; entretanto, esse dado *per se* não é suficiente para afirmar que o receptor tenha alguma função biológica ou mesmo que seja expresso de maneira funcional. É possível que sua expressão seja não-funcional, meramente devida a uma localização genômica nas proximidades de um elemento *cis*-regulatório capaz de dirigir a transcrição de forma aberrante no VNO. Exemplos do envolvimento destes tipos de elementos regulatórios são comuns na expressão tecido-específica de genes *OR*, como é o caso dos elementos P e H, que aumentam a expressão de vários ORs no MOE (LOMVARDAS et al., 2006; KHAN et al., 2011).

Estudos futuros sobre a localização genômica do gene *Olfr692* e os elementos regulatórios que controlam sua expressão poderão lançar luz sobre este fenômeno e mesmo sobre a função de tal receptor expresso de forma aberrante e não-ortodoxa no VNO.

Tabela 3: Caracterização Molecular da nova população sensorial do VNO.

OSNs canônicos	V1R	V2R	OR+ VNO
OR+	V1R+	V2R(ABD)+	OR+
	V2RC-	V2RC+	V2RC-
G α olf+	Gai2+	G α o+	G α olf- G α o+ Gai2-
CNGA+	TrpC2+	TrpC2+	TrpC2+
		M2-Mv	M2-Mv + e -

7.3 Estudos preliminares sobre a função do Receptor Olfr692

Uma vez feita a caracterização molecular das células que expressam o receptor *Olfr692*, prosseguimos com estudos funcionais preliminares. Apesar da expressão controlada e do alto nível de expressão, é possível que essas células presentes no VNO não sejam funcionais, por exemplo, se o receptor *Olfr692* depender da expressão de *G α olf*, *ACIII* e *CNGA*, não expressos no epitélio olfativo do VNO. Para testar a funcionalidade destas células, utilizamos o marcador indireto de ativação neuronal *Egr1*, IEG expresso nos neurônios e que já foi utilizado previamente para esta finalidade em nosso laboratório e em outros grupos de pesquisa (PAPES et al., 2010; ISOGAI et al., 2011). Desta forma, quando um neurônio é ativado, é possível detectar a expressão transitória deste IEG por hibridação *in situ*.

Os primeiros testes funcionais envolveram exposição de animais a estímulos que nos pareceram mais evidentemente envolvidos na detecção pelo VNO: estímulos intraespecíficos, machos adultos expostos à maravalha odorizada por fêmeas, e fêmeas expostas a maravalha odorizadas por machos. Desses testes, houve muito pouca ativação do VNO nos machos expostos à maravalha de fêmeas conforme experimentos anteriores já haviam demonstrado (dados não mostrados). Quanto às fêmeas expostas à maravalha de

machos, já era conhecido um nível de ativação razoável, embora inferior à estimulação com odores de predadores, que é mais expressiva. Nesses dois casos, entretanto, não houve ativação das células *Olfr692*-positivas.

Em seguida, o estímulo testado foi o proveniente de predadores: gazes médicas esfregadas contra a pelagem de gatos domésticos. Esse estímulo é bastante eficiente na geração de comportamentos estereotipados de medo e ansiedade e ativa uma grande população de células da população basal de VSNs (PAPES et al., 2010). Esse tipo de estímulo é conhecido como cairomônio, e sua detecção confere vantagem adaptativa para o indivíduo que o detecta, embora possa ser desvantajoso para o predador que o originou.

Nestas fontes de estímulo, está presente uma proteína da família das MUPs, cuja versão recombinante demonstrou-se capaz de ativar uma fração das células da população V2R do VNO (CHAMERO et al., 2007; PAPES et al., 2010). Essas proteínas estão presentes na urina de camundongos machos, na urina de ratos e na saliva de gatos. Entretanto, esses estímulos não causaram a ativação da população *Olfr692*-positiva, por isso prosseguimos com a investigação, na literatura, de ligantes para o receptor *Olfr692*, a fim de investigar de modo mais aprofundado sua possível função no VNO.

A revisão da literatura sobre ligantes de receptores OR nos indicou uma informação relevante: *Olfr692* é um receptor OR de classe I relacionado a outros receptores que foram deorfanizados em estudos anteriores (MALNIC et al., 1999; SAITO et al., 2009a).

Os ácidos testados neste projeto foram ácido butírico, ácido octanoico, ácido nonanoico e ácido decanoico. Ainda seria possível fazer outros testes utilizando outros ácidos graxos como o ácido palmítico ou o ácido esteárico, entretanto, partindo da nossa hipótese de trabalho de que algum componente do leite poderia ser ligante do receptor, nosso interesse foi investigar se o estímulo cru, o próprio leite seria capaz de ativar células *Olfr692*-positivas.

Os estímulos testados foram escolhidos devido à similaridade de sequência entre os receptores OR de classe I, em que o receptor *Olfr692* se encontra, sendo que tais receptores possuem ácidos alifáticos de cadeia curta entre seus ligantes identificados. Entretanto, não observamos ativação de neurônios sensoriais *Olfr692*-positivos para nenhum dos ácidos testados. Uma das hipóteses que nos ocorreu após a não identificação da

ativação com estes estímulos foi se nosso método de exposição não seria adequado. É possível que nossos protocolos de exposição, que funcionam bem para estímulos crus e para proteínas recombinantes hidrofílicas, não sejam adequados para o “delivery” desses ligantes anfotéricos.

Outra hipótese também nos pareceu razoável: o ligante para o receptor Olfr692 seria um ácido alifático, mas não exatamente aqueles que foram testados. Ou, ainda, o ligante poderia ser um dos ácidos graxos, ácidos alifáticos de cadeia longa, como o ácido palmítico ou o ácido esteárico.

Esses ácidos de cadeia curta ou mesmo os ácidos graxos estão presentes no leite (SMITH et al., 1968) e diante desta informação, nos surgiram perguntas, relacionando as informações obtidas sobre o receptor Olfr692: será que o receptor não estaria relacionado, de alguma maneira ao evento de desmame entre esses animais, já que ele passa a ser expresso em um número de células significativo entre 30 e 60 dias de idade? Por conta disso, elaboramos a hipótese descrita nos resultados, de que o comportamento de desmame poderia ser intermediado pelo receptor Olfr692 e por conta disso o leite conteria seu ligante.

7.3.1 Exposição ao Leite Como Fonte de Estímulo Olfativo

Alguns dos receptores relacionados ao Olfr692 possuem como ligantes ácidos alifáticos de cadeia curta, tais como ácido heptanoico (Olfr569, Olfr699, Olfr68), ácido octanoico (Olfr569, Olfr699, Olfr68), ácido nonanoico (Olfr569 e Olfr68) e ácido decanoico (Olfr569 e Olfr554). Por causa disso, esses ácidos foram testados como possíveis ligantes para o receptor Olfr692. Inicialmente foi testada a concentração de 10mM para esses ácidos, entretanto, dado que não houve resposta positiva, a concentração dos ácidos foi aumentada para 100mM e, apesar de ter havido ativação de VSNs, ela não foi encontrada nas células *Olfr692*-positivas.

Como alguns desses ligantes estão presentes no leite (SMITH et al., 1968), aventamos uma nova hipótese, que é a de se o próprio leite não seria uma fonte de estímulos que pudesse conter o ligante para o receptor Olfr692. Um ponto forte para esta hipótese é o fato de esse receptor não ser expresso em grande número de células nos animais juvenis, mas ser expresso em um número comparável ao de receptores V2R em

animais adultos. Uma diferença crítica entre a história natural de mamíferos juvenis e adultos é sua dependência do leite materno.

Essa hipótese foi testada e foram observadas células *Egr1*-positivas após a exposição ao leite. Essa informação é de uma relevância biológica muito grande, já que não havia sido relatado anteriormente na literatura, e a ativação de células no VNO pelo leite aponta uma nova função biológica potencialmente intermediada pelo Órgão Vomeronasal.

Apesar de esta questão não ter sido aprofundada neste projeto, uma vez que as células ativadas pelo leite não correspondem às expressando o receptor OR estudado, essa é uma questão de alta importância biológica e poderá ser explorada no futuro por outros projetos de pesquisa.

O ligante para o receptor Olfr692 ainda não foi encontrado. Apesar disso, diversos ligantes em potencial foram testados e os candidatos propostos estiveram dentro de contextos biológicos relevantes de ativação do Órgão Vomeronasal. Esse estudo funcional preliminar excluiu importantes candidatos a ligantes para esse receptor. Essa investigação contou com a colaboração do grupo de pesquisa do Dr. Darren Logan para uma abordagem mais poderosa e mais abrangente desta questão da função da população de neurônios sensoriais olfativos que expressam o receptor *Olfr692*.

Novos estudos funcionais estão em andamento e outros serão feitos em futuros projetos de pesquisa. Esses estudos deverão incluir a manipulação do receptor Olfr692, possivelmente em estudos de ablação gênica ou superexpressão, seguidos de bateria de ensaios comportamentais adequados para a avaliação dos efeitos da ausência ou superexpressão desses receptores. Muitos desses ensaios comportamentais já foram utilizados em nosso laboratório e eles são de alta relevância para a avaliação funcional de genes relacionados à olfação.

Em resumo, este projeto levou à descoberta de uma nova população de sensorial no VNO, que expressa o receptor Olfr692 e ocupa a porção basal do VNO, junto com VSNs expressando receptores V2R. Essa descoberta, se somada à descoberta da função dessas células, será de grande relevância para a comunidade científica, de maneira que acreditamos que esses dados poderão futuramente resultar em artigos de grande impacto.

8. Conclusões

1) Identificamos a expressão de um receptor OR que é expresso em Neurônios Sensoriais Olfativos do VNO em um nível comparável à expressão de receptores V2R

-A expressão do mRNA receptor *Olfr692* no Órgão Vomeronasal de camundongos foi confirmada por Hibridação *in situ* e *Real-Time* PCR;

-Os receptores *Olfr124* e *Olfr1509* não são expressos no VNO. Embora constassem nas bibliotecas de RNA-seq, não tiveram sua expressão confirmada no VNO quer por hibridação *in situ*, quer por *Real-Time* PCR;

-Os receptores *Olfr691*, *Olfr638* e *Olfr569* não são expressos no VNO. Não tiveram seu mRNA detectado por hibridação *in situ* no VNO, confirmando os dados de RNA-seq para esses receptores; esses genes serviram para validar o RNA-seq e atestar a robustez destes dados.

-Todos os receptores OR amplificados ao longo deste estudo (*Olfr692*, *Olfr78*, *Olfr124*, *Olfr1509*, *Olfr691*, *Olfr638* e *Olfr569*) tiveram sua expressão confirmada por hibridação *in situ* no MOE, mesmo que não tivessem sido encontrados no VNO, indicando um protocolo adequado e robusto para a detecção de ORs.

-O receptor *Olfr692* é expresso em uma população compatível com receptores V2R, entretanto, esse padrão importante de expressão ocorre apenas em indivíduos adultos, sugerindo um rigoroso controle de sua expressão.

2) Caracterizamos molecularmente a população *Olfr692*-positiva quanto aos marcadores moleculares do Sistema Olfativo Principal e Sistema Olfativo Acessório ou Vomeronasal. Definimos uma nova população de VSNs, que não possui os marcadores canônicos do Sistema Olfativo Principal apesar de expressar um receptor de família OR.

-Neurônios sensoriais olfativos que expressam o receptor *Olfr692* no VNO não expressam subunidade *CNGA2* do canal iônico dependente de nucleotídeo cíclico que é necessário para o funcionamento de OSNs no MOE. Ao invés desse canal, essas células são *TrpC2*-positivas.

-VSNs *Olf692*-positivos não expressam a subunidade de proteína G tipicamente expressa nos OSNs do MOE ($G_{\alpha olf}$) e ao invés disso expressam a subunidade $G_{\alpha o}$ de proteína G.

-Células *Olf692*-positivas não expressam os genes *H2-M10.2*, *H2-M10.5* e *H2-M10.6*, membros da família MHC H2-Mv, expressos nos demais VSNs da população V2R.

3) Investigamos a funcionalidade da população de VSNs caracterizada ao longo deste trabalho, através de tentativas de identificar seus ligantes entre estímulos biologicamente relevantes.

-Células *Olf692*-positivas não respondem a estímulos provenientes de predador. Testamos gazes friccionadas contra pelos de gato, um estímulo importante para a ativação de VSNs da população V2R, que não resultou em ativação destas células.

-VSNs *Olf692*-positivos também não respondem a estímulos intraespecíficos tais como exposição ao bedding de indivíduo do sexo oposto, à fêmea lactante e ao leite da própria espécie.

-VSNs *Olf692*-positivos também não são responsivos aos ácidos orgânicos alifáticos de cadeia curta: ácido butírico, ácido octanoico, ácido nonanoico e ácido decanoico. Esses ácidos são importantes porque são ligantes para receptores OR de classe I e porque alguns deles estão presentes, em alguma quantidade, no leite, que é uma fonte de estímulos biologicamente muito importante para os mamíferos.

9. Referências

ADAMS, R.; MCFARLAND, L. SEPTAL OLFACTORY IN PEROMYSCUS organ , was located on the nasal septum , rostral to and separated from the re- inspiratory air currents . The vomeronasal nerve and olfactory nerve from the. , v. 4, 1971.

BREER, H.; FLEISCHER, J.; STROTMANN, J. The sense of smell: multiple olfactory subsystems. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 63, n. 13, p. 1465–75, 2006.

BRENNAN, P. A; ZUFALL, F. Pheromonal communication in vertebrates. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 308–15, 2006.

BUCK, L.; AXEL, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. **Cell**, v. 65, n. 1, p. 175–187, 1991. Elsevier.

CHAMERO, P.; LEINDERS-ZUFALL, T.; ZUFALL, F. From genes to social communication: molecular sensing by the vomeronasal organ. **Trends in Neurosciences**, v. 2, n. 10, p. 1–10, 2012. Elsevier Ltd.

CHAMERO, P.; MARTON, T. F.; LOGAN, D. W.; et al. Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. **Nature**, v. 450, n. 7171, p. 899–902, 2007.

FIRESTEIN, S. How the olfactory system makes sense of scents. , v. 413, n. September, p. 211–218, 2001.

FLEISCHER, J.; SCHWARZENBACHER, K.; BESSER, S.; HASS, N.; BREER, H. Olfactory receptors and signalling elements in the Grueneberg ganglion. **Journal of neurochemistry**, v. 98, n. 2, p. 543–54, 2006.

FLEISCHER, J.; SCHWARZENBACHER, K.; BREER, H. Expression of trace amine-associated receptors in the Grueneberg ganglion. **Chemical senses**, v. 32, n. 6, p. 623–31, 2007.

FREITAG, J.; KRIEGER, J.; STROTMANN, J.; BREER, H. Two classes of olfactory receptors in *Xenopus laevis*. **Neuron**, v. 15, n. 6, p. 1383–92, 1995.

GROSMAITRE, X.; FUSS, S. H.; LEE, A. C.; et al. SR1, a mouse odorant receptor with an unusually broad response profile. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 46, p. 14545–14552, 2009.

HAGA, S.; HATTORI, T.; SATO, T.; et al. The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behaviour through a specific vomeronasal receptor. **Nature**, v. 466, n. 7302, p. 118–22, 2010. Nature Publishing Group.

HERRADA, G.; DULAC, C. A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. **Cell**, v. 90, n. 4, p. 763–73, 1997.

ISHII, T.; OMURA, M.; MOMBAERTS, P. Protocols for two- and three-color fluorescent RNA in situ hybridization of the main and accessory olfactory epithelia in mouse. **Journal of neurocytology**, v. 33, n. 6, p. 657–69, 2004.

ISOGAI, Y.; SI, S.; PONT-LEZICA, L.; et al. Molecular organization of vomeronasal chemoreception. **Nature**, v. 478, n. 7368, p. 241–245, 2011. Nature Publishing Group.

JONES, D. T.; REED, R. R. Golf; An Olfactory Neuron Specific-G Protein. , v. 9631, 1988.

JUILFS, D. M.; FÜLLE, H. J.; ZHAO, A Z.; et al. A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 7, p. 3388–95, 1997.

KAUPP, U. B. Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 188–200, 2010. Nature Publishing Group.

KHAN, M.; VAES, E.; MOMBAERTS, P. Regulation of the Probability of Mouse Odorant Receptor Gene Choice. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 907–921, 2011. Elsevier Inc.

KIMCHI, T.; XU, J.; DULAC, C. A functional circuit underlying male sexual behaviour in the female mouse brain. **Nature**, v. 448, n. 7157, p. 1009–14, 2007. Nature Publishing Group.

KUMAR, S.; STECHER, G.; PETERSON, D.; TAMURA, K. MEGA-CC: computing core of molecular evolutionary genetics analysis program for automated and iterative data analysis. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 28, n. 20, p. 2685–6, 2012.

LEINDERS-ZUFALL, T.; COCKERHAM, R. E.; MICHALAKIS, S.; et al. Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 36, p. 14507–12, 2007.

LEINDERS-ZUFALL, T.; LANE, A P.; PUCHE, A C.; et al. Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. **Nature**, v. 405, n. 6788, p. 792–796, 2000. Nature Publishing Group.

LEVAL, O.; FEISTEL, T.; BREER, H.; STROTMANN, J. Cells in the Vomeronasal Organ Express Odorant Receptors but Project to the. **Comparative and General Pharmacology**, v. 490, n. December 2005, p. 476 – 490, 2006.

LIBERLES, S. D.; BUCK, L. B. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. **Nature**, v. 442, n. 7103, p. 645–50, 2006.

LOCONTO, J.; PAPES, F.; CHANG, E.; et al. Functional expression of murine V2R pheromone receptors involves selective association with the M10 and M1 families of MHC class Ib molecules. **Cell**, v. 112, n. 5, p. 607–618, 2003. Elsevier Inc.

LOMVARDAS, S.; BARNEA, G.; PISAPIA, D. J.; et al. Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. **Cell**, v. 126, n. 2, p. 403–13, 2006.

MALNIC, B.; HIRONO, J.; SATO, T.; BUCK, L. B. Combinatorial receptor codes for odors. **Cell**, v. 96, n. 5, p. 713–723, 1999. Cell Press.

MARTINI, S.; SILVOTTI, L.; SHIRAZI, A; RYBA, N. J.; TIRINDELLI, R. Co-expression of putative pheromone receptors in the sensory neurons of the vomeronasal organ. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 3, p. 843–848, 2001.

MOMBAERTS, P. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 4, p. 263–278, 2004.

MOMBAERTS, P.; WANG, F.; DULAC, C.; et al. Visualizing an olfactory sensory map. **Cell**, v. 87, n. 4, p. 675–686, 1996. Elsevier.

NGUYEN, D. T.; LEE, K.; CHOI, H.; et al. The complete swine olfactory subgenome: expansion of the olfactory gene repertoire in the pig genome. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 584, 2012. BMC Genomics.

NISHIMURA, K.; UTSUMI, K.; YUHARA, M.; FUJITANI, Y.; IRITANI, A. Identification of puberty-accelerating pheromones in male mouse urine. **The Journal of experimental zoology**, v. 251, n. 3, p. 300–5, 1989.

PAPES, F.; LOGAN, D. W.; STOWERS, L. The vomeronasal organ mediates interspecies defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs. **Cell**, v. 141, n. 4, p. 692–703, 2010. Elsevier Ltd.

SAITO, H.; CHI, Q.; ZHUANG, H.; MATSUNAMI, H.; MAINLAND, J. D. Odor Coding by a Mammalian Receptor Repertoire. **Science signaling**, v. 2, n. 60, p. ra9, 2009a. NIH Public Access.

SAITO, H.; CHI, Q.; ZHUANG, H.; MATSUNAMI, H.; MAINLAND, J. D. Odor Coding by a Mammalian Receptor Repertoire. **Science signaling**, v. 2, n. 60, p. ra9, 2009b. NIH Public Access.

SERIZAWA, S.; MIYAMICHI, K.; SAKANO, H. One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system. **Trends in genetics : TIG**, v. 20, n. 12, p. 648–53, 2004.

SILVOTTI, L.; MOIANI, A.; GATTI, R.; TIRINDELLI, R. Combinatorial co-expression of pheromone receptors, V2Rs. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, n. 5, p. 1753–1763, 2007.

STOWERS, L.; HOLY, T. E.; MEISTER, M.; DULAC, C.; KOENTGES, G. Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. **Science**, v. 295, n. 5559, p. 1493–1500, 2002.

TIAN, H.; MA, M. Molecular organization of the olfactory septal organ. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 38, p. 8383–8390, 2004.

TIRINDELLI, R.; DIBATTISTA, M.; PIFFERI, S.; MENINI, A. From Pheromones to Behavior. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 3, p. 921–956, 2009. Am Physiological Soc.

VASSAR, R.; NGAI, J.; AXEL, R. Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. **Cell**, v. 74, n. 2, p. 309–18, 1993.

WEILER, E. The Septal Organ of the Rat During Postnatal Development. **Chemical Senses**, v. 28, n. 7, p. 581–593, 2003.

ZHANG, X.; FIRESTEIN, S. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 124–133, 2002.

10. Apêndice

Ao longo do meu projeto de mestrado, foram desenvolvidos protocolos de hibridação *in situ* dupla a fim de observar a detecção de duas sondas diferentes, tanto para a caracterização molecular das células Olfr692-positivas quanto para a investigação de ligantes para esse receptor através da análise do IEG *Egr1*. O aprimoramento desses protocolos proporcionou a obtenção de resultados de qualidade para as caracterizações feitas neste projeto e me instrumentalizou para a realização de técnicas de hibridação *in situ* e imunohistoquímica de maneira abrangente.

Essas técnicas foram utilizadas para o a realização de experimentos de outra abordagem do Laboratório de Neurobiologia Molecular sobre o Sistema Olfativo, dos quais participei e que resultaram em um artigo que está sendo submetido para publicação em março de 2014, e cujo manuscrito se encontra em anexo. Nesse artigo, a hibridação *in situ* para o IEG *Egr1* foi combinada com hibridação *in situ* para receptores V2R, alguns dos quais foram utilizados no meu projeto.

A hibridação *in situ* também foi utilizada em combinação com imunohistoquímica para experimentos de uma versão de CAT-FISH, em que um IEG é utilizado para a detecção de ativação neuronal em dois momentos distintos do tempo. No nosso caso, utilizamos a combinação da imunohistoquímica com hibridação *in situ* para detectar a expressão do IEG *Cfos*, que já havia sido validado por diversos pesquisadores para a identificação de ativação neuronal e foi utilizado pelo meu orientador para a identificação de ativação de neurônios no VMH, em dois momentos distintos de processamento: mRNA e proteína.

Parte da minha experiência na pós-graduação foi colaborar ativamente para a produção de um artigo científico distinto da pesquisa do meu próprio projeto, mas em outra questão científica relevante dentro do campo de pesquisa em que me insiro.

11. Anexos

11.1 Manuscrito do artigo submetido à revista Cell.

Neural representation of olfactory information in the hypothalamus

Vinicius M. A. Carvalho,^{1,2,6} Thiago S. Nakahara,^{1,2,6} Mateus A. A. Souza,^{1,2} Leonardo M. Cardozo,^{1,2} Guilherme Z. Trintinalia,^{1,2} Leonardo G. Pissinato,^{1,3} Jose O.

5 Venancio,^{1,3} Fabio F. Conte,¹ Felipe T. Tolentino,^{1,2} Eliana Ferraz,⁴ Lisa Stowers,⁵ and Fabio Papes^{1,*}

¹Department of Genetics and Evolution, Institute of Biology, State University of Campinas, Rua Monteiro Lobato, Campinas, SP, 13083-862, Brazil

10 ²Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Institute of Biology, State University of Campinas, Brazil

³Undergraduate Program in the Biological Sciences, Institute of Biology, State University of Campinas, Brazil

⁴Campinas Municipal Zoo, Campinas, SP, 13025-000, Brazil

15 ⁵Department of Cell Biology, The Scripps Research Institute, 10550 N. Torrey Pines Rd., La Jolla, CA 92037, USA

⁶These authors contributed equally to this work

*Correspondence: papesf@unicamp.br

Abstract

The nervous system is organized to detect, internally represent and process sensory information to generate appropriate behaviors. Despite the crucial importance of odors that elicit instinctive behaviors, their neural representation remains little characterized in the mammalian brain. Here, we study selected brain areas activated by a range of odors capable of eliciting innate behaviors (pheromones and kairomones), and found the brain to be exquisitely activated by odors from other species. Moreover, we found a discernibly organized map of olfactory information in the hypothalamus, where different stimuli entail activity in distinct and stereotypically positioned groups of neurons. This activity pattern was found not reflect induced behaviors, as previously thought, but the molecular receptors involved in the detection by the vomeronasal organ, therefore constituting a sensory neural map. The surprising finding of such map in the limbic system will help understand how odor information is processed in the brain to generate instinctive behaviors.

Highlights

- A wide range of odors that elicit instinctive behaviors activates the mouse brain
- The mouse brain is exquisitely tuned to odors from other species
- Activity in two regions (amygdala and hypothalamus) do not reflect output behaviors
- Different odors activate spatially segregated groups of neurons in the hypothalamus
- A striking neural representation of sensory information exists in the hypothalamus
- Olfactory sensory information is internally represented in the hypothalamus

Introduction

In mammals, sensory stimuli are detected by specialized sensory cells that express appropriately tuned molecular receptors. Sensory information is then sent to the brain, where it must be systematically represented by coherent patterns of neural activity (Luo and Flanagan, 2007). Though still poorly understood, it is assumed that these patterns of activity (or sensory maps) are read by decision-making areas in the brain, resulting in output behaviors. Therefore, knowledge on the neural representation of sensory information is key to understanding how the nervous system works to perceive the external world.

The olfactory system is specialized in the detection of chemical sensory stimuli, which indicate the presence and quality of food, potential mates, competitors and dangers in the environment (reviewed in Munger et al., 2009). Though the central representation of olfactory stimuli in the brain has been recently investigated (Stettler and Axel, 2009), very little is known about the neural mapping of odors that elicit instinctive behaviors. These cues include substances released by an individual and detected by the same species (pheromones) or by another species (kairomones), mediating a range of instinctive behavioral responses, such as aggression (Chamero et al., 2007), mating, gender discrimination (Stowers et al., 2002; Kimchi et al., 2007) and fear (Papes et al., 2010). Since these cues crucially regulate the interactions between individuals, the study of their neural representation is central to understanding how the brain controls animal behavior, indirectly impacting life cycle, natural history and evolution.

The vomeronasal organ (VNO), a sensory structure in the nasal cavity, has been implicated in the detection of pheromones and kairomones (Munger et al., 2009). The VNO connects with the accessory olfactory bulb (AOB) in the brain, which in turn is anatomically connected to several brain areas, including the amygdala (mostly the posteromedial cortical nucleus, or PMCO, and medial nucleus, or MeA). The amygdala is further connected to the hypothalamus (including the ventromedial nucleus, or VMH), stria terminalis (BNST nucleus), and medial preoptic area (MPOA) (Canteras et al., 1995; Petrovich et al., 2001).

The organizing principles behind the representation of odors that elicit innate responses in these areas remain poorly characterized. Prior studies have shown that activity in the AOB reflects sensory input from the VNO (Wagner et al., 2006). In contrast, it is thought that other regions are organized to reflect behavioral output. For example, it has been suggested that the MeA nucleus in the amygdala and the VMH nucleus in the hypothalamus are each divided in sub-areas, activated by predatory or social stimuli, composing distinct pathways involved in defensive or reproductive behaviors (Swanson, 2000; Choi et al., 2005; Lin et al., 2011; Silva et al., 2013). However, these notions arose from the use of a very limited set of olfactory stimuli and no systematic comparison has been made among a range of stimuli eliciting various behavioral outputs, to understand how and where sensory information represented along the circuit initiated at the VNO transitions to the generation of behavior by downstream brain areas.

Here we investigate and compare how different olfactory stimuli, each able to induce instinctive behaviors following detection mediated by the VNO, are internally

represented in the brain. We show that a large selection of intra- and interspecies signals leads to activation of areas found to depend on functional inputs from the VNO. We also show that neural activity in the amygdala and hypothalamus is not organized to reflect the valence or behavioral consequences of each detected stimulus, as previously thought. Instead, we found a discernible neural map in the ventromedial hypothalamus (VMH nucleus), where different stimuli activate distinct and stereotypically positioned ensembles of neurons, whose organization reflects the set of activated receptors in the sensory organ. Strikingly, these data show that an internal sensory map exists deep in the brain's limbic system to represent external olfactory information important for the survival of the individual and the species.

Results

A wide range of intra- and interspecies chemosignals detected by the VNO

activate specific brain nuclei

Pheromones and kairomones lead to behaviors innately, and are thus believed to be processed by hard-wired brain circuits. Moreover, such behaviors are conserved between individuals, and therefore we assume that pheromones/kairomones are represented by coherently organized activity along those circuits.

We started our investigation of such internal representation by first determining which brain areas are activated by different pheromones/kairomones. Such knowledge has been limited because previous studies investigated brain activity using few stimuli (mostly cat, and male or female mouse odors), and limited comparisons were made

between stimuli. Instead, we chose to use a comprehensive approach, where activity in several brain areas was evaluated in mice exposed to a wide range of pheromones and kairomones. We used intra- and interspecies olfactory stimuli (listed in Table S1) known to induce biologically relevant instinctive behaviors, such as odors from adult female
5 and male mice, juveniles, odors from other mouse strains (Balb/c and 128S/J), and numerous species that are natural or occasional mouse predators (rat, domestic cat, leopard cat, Cougar montain lion, african lion, several snake species, great horned owl, caracara hawk, and tarantula spider).

The amounts used for all stimuli are sufficient to induce similarly potent
10 behavioral responses in mouse subjects (Figures 1A and S1A). Interestingly, several heterospecific odors were shown to trigger defensive behaviors (Figure 1A), greatly expanding the previously described list of kairomones (Papes et al., 2010) and stressing the importance of olfaction in the detection of danger. Other odors (such as same-strain mouse odors) were unable to elicit defensive behaviors, and instead induced
15 aggressive or reproductive responses (Figures 1A and S1A). We also verified that distinct stimuli from the same species differed in their ability to induce behavior (for example, snake skin was more potent than snake bedding; Figure 1A). We chose the most potent stimulus from each species for further analyses.

With this protocol, increases in VNO and brain activity for each stimulus could be
20 evaluated by comparison with appropriate unscented controls (listed in Table S2). Most of the stimuli activated a large number of VNO sensory neurons (Figure 1B), as judged by the expression of the marker of VNO activity *Egr1* (Isogai et al., 2010). Some stimuli were presented in different forms and therefore cannot be compared, but we noticed a

tendency for intraspecific signals to activate a smaller subpopulation of VNO cells than interspecific stimuli, such as predator odors (Figures 1B and S1B). This is in agreement with previous reports (Papes et al., 2010; Isogai et al., 2011), which described the importance of the mammalian VNO in the detection of odors from other species.

5 Next, we analyzed whether VNO activation was accompanied by activity in several brain nuclei known to have anatomical connections (direct or indirect) with olfactory sensory organs (Figures 1C, 1D and 3; see Table S2 for a list of regions and controls). In animals exposed to heterospecific or conspecific odors, induction of the marker of neuronal activity c-Fos was stronger in the AOB (Figures 1D and S1C; see
10 also Papes et al., 2010), MeA, BNST, VMH and MPOA (Figure 1D and Table S2). Rabbit urine, which does not induce defensive or aggressive behaviors in mice (Figure 1A), did not activate these nuclei, nor did generally noxious stimuli such as foot shock (Figure 1D and Table S2).

15 Interestingly, we noticed that heterospecific signals tended to activate the AOB, MeA, BNST and VMH more strongly than conspecific odors (Figure 1D), and we found a statistically significant positive correlation between activity induced by each stimulus in these areas and the number of *Egr1*-expressing cells in the VNO (Figure S1D). In other regions, this correlation was not observed.

20 Previous studies indicated that some of those brain nuclei have anatomical links with the VNO (Canteras et al., 1995; Canteras et al., 1997; von Campenhausen and Mori, 2000; Petrovich et al., 2001; Blanchard et al., 2005). Our data now provides a comprehensive view of how they are activated by odorous stimuli, revealing that a strikingly large set of behavior-inducing odors activates some areas, including the AOB,

MeA, BNST and VMH. Additionally, we found that these nuclei are more strongly activated by heterospecific odors than by conspecific stimuli, revealing the unprecedented fact that the mammalian brain is exquisitely tuned to process odor information from other species in the environment. Finally, we show that activity in the MeA, BNST and VMH is correlated with the detection of stimuli by the VNO, supporting the idea that they belong to a functional pathway initiated at the VNO to process olfactory information.

Some odors used in the foregoing experiments were presented in different forms and are composed of complex mixtures of mostly uncharacterized ligands (some of which may also activate other sensory systems). Therefore, it was not possible to precisely determine if activity in each area was due exclusively to pheromones and kairomones. On the other hand, purified stimuli contained within each complex mixture can be used for this analysis. Therefore, we used recombinant versions of predator or mouse Major Urinary Proteins (rMups), which are sufficient to induce VNO-mediated behaviors (Chamero et al., 2007; Papes et al., 2010), and could be presented in comparable amounts. First, we confirmed that neural activity due to each pure rMup is indeed part of that induced by the corresponding native stimulus, because exposure to a combination of each rMup plus the respective complex odor resulted in c-Fos counts which are not the sum of c-Fos positive cells in animals separately exposed to the pure or to the native stimuli alone (Figure 2A).

To analyze brain activity due to distinct rMups, we adopted the same comprehensive strategy as before, by investigating several brain nuclei linked to olfaction (Figure 2). We found that equal amounts of predator (cat or rat) or mouse

rMups elicited similar activity in the AOB, MeA, BNST and VMH, but activity was lower for conspecific rMups in the VMH (Figure 2). Activity in other brain areas was very low for all rMups (Table S2). This first-hand comparison of brain activity due to different pure stimuli revealed that the MeA, BNST and VMH, whose activity correlates with VNO activation induced by complex stimuli (Figures 1 and S1), are indeed activated by pure pheromones and kairomones.

In sum, our choice of using a wide variety of behavior-inducing odors in the foregoing experiments (Figures 1 and 2) led to the following results: (a) specific brain areas are activated by a large repertoire of pheromones and kairomones, both complex and pure; (b) some areas are strongly and exquisitely activated by kairomones; (c) activity in a subset of the analyzed areas (MeA, BNST and VMH) is highly correlated with VNO detection of behavior-inducing odors.

Some nuclei in the amygdala and hypothalamus receive major functional inputs from the VNO

Some of the c-Fos-expressing areas in the previous section are known to have anatomical links with the VNO. However, anatomical connections do not necessarily imply functional involvement. Moreover, a particular area may receive inputs from more than one sensory organ, and thus the observed activity may not necessarily be dictated by the VNO. In this vein, it is interesting to note that the piriform cortex, which receives information from another sensory organ, the main olfactory epithelium, is also activated by some of our complex stimuli (Figure 1D).

To better understand the functional links between each region and the processing/representation of pheromones and kairomones detected by the VNO, we adopted a genetic ablation strategy, by analyzing activity in each brain region in animals where vomeronasal sensory neurons are held inactive by a null mutation in the gene coding for TrpC2, the primary sensory transduction channel for the VNO (Stowers et al., 2002). We found that instinctive behaviors towards the stimuli employed in our study were impaired in TrpC2^{-/-} mutants (Figure S2D; see also Stowers et al., 2002; Chamero et al., 2007; Papes et al., 2010).

We next exposed TrpC2^{-/-} mutants to a wide variety of chemosignals to provide a comprehensive view of which areas receive inputs from the VNO and may therefore process pheromone/kairomone information. We found the behavioral defects in TrpC2^{-/-} animals exposed to a wide variety of hetero- or conspecific odors to be accompanied by severely reduced or abolished c-Fos expression in the AOB (Figures 3A and S2A and Table S2; see also Papes et al., 2010), consistent with the notion that this brain region mainly collects information from the VNO (Wagner et al., 2006). When we analyzed areas anatomically connected with the AOB (von Campenhausen and Mori, 2000), we found activity levels in the BNST, PMCO and MPOA to be reduced in TrpC2^{-/-} mice, but remaining above those seen with unscented controls for some stimuli (Figure 3B and Table S2), suggesting that these areas are also processing other types of sensory information during our assays. In contrast, in the MeA nucleus in the amygdala, the number of c-Fos positive cells is much lower in TrpC2^{-/-} than in TrpC2^{+/+} mice, being comparable to unscented controls (complex stimuli in Figures 3A and 3B; pure ligands in Figure S2B; see also Table S2), suggesting the observed increase in c-Fos

expression in wild-type animals primarily results from processing of VNO signals. We additionally analyzed the VMH, one of the main targets of projections from the MeA (Canteras et al., 1995; Petrovich et al., 2001), and found c-Fos expression to be strikingly absent in $\text{TrpC2}^{-/-}$ animals after exposure to various stimuli (Figures 3 and S2C and Table S2), thereby functionally supporting the conclusion that VMH activity in our assay results from VNO stimulation.

While activity in the MeA, BNST and VMH is highly correlated with VNO activity (Figures 1 and S1), these results in $\text{TrpC2}^{-/-}$ animals indicated that the MeA and VMH are unique in that they seem to receive functional inputs from the VNO in exposed animals, favoring the model in which these regions are part of a functional circuit initiated at the VNO (Canteras et al., 1997; Swanson, 2000; Blanchard et al., 2005). We thus further focused on investigating the representation of odors in these two regions.

Olfactory stimuli activate broadly distributed and intermingled ensembles of neurons in the medial amygdala

It has been previously suggested that stimuli related to distinct behavioral outputs (reproductive or defensive) activate spatially segregated groups of neurons in the MeA (Swanson, 2000; Choi et al., 2005). These ideas arose from observations obtained with a limited number of stimuli, indicating that cat-odorized pieces of collar activate the ventral MeA (Dielenberg et al., 2001; Choi et al., 2005) and that female mouse odors activate the dorsal MeA (Fernandez-Fewell and Meredith, 1996; Kollack-Walker and Newman, 1996; Choi et al., 2005).

To better understand the organization of activity elicited by VNO stimuli in the MeA, we exposed mice to our wide range of heterospecific and conspecific stimuli. c-Fos-expressing cells were found broadly distributed in the posterior aspect of the MeA (MeAp) for all stimuli (examples in Figure 4A, ii, iv-viii). Overall, an average 10-25% of cells were activated, depending on the stimulus. For heterospecific and most conspecific stimuli, such distributive pattern was seen in both the dorsal and ventral aspects of the MeAp and in the anterior MeA (MeAa; Figures 4A, 4B and S3). In male mice exposed to female odors, the activated cells were found in both the dorsal and ventral MeAp, but with a higher concentration in the dorsal aspect (Figures 4A, iii and 4B). These foregoing results suggest that different stimuli do not result in grossly spatially segregated active ensembles of neurons in the medial amygdala.

To further investigate the spatial organization of activity in the MeA, we developed a new protocol to determine, in the same animal, the sets of active neurons related to sequential exposures to two stimuli (Figure 4C). In this dual c-Fos immunostaining / in situ hybridization method, nuclear c-Fos protein indicates activity related to the first exposure period, whereas immature nuclear c-Fos mRNA indicates active cells derived from the second exposure period (Figure 4C; see also Supplemental Experimental Procedures).

We did not verify any discernible differential distribution of activated cells when one predator stimulus was compared either to a different predator stimulus (Figure 4D) or to odors from conspecific same-sex individuals (not shown), and activated cells related to both exposures were intermingled in broad regions of the MeA. In males, the comparison between the ensemble related to one predator stimulus and the set of cells

activated by female mouse odors (which are distributed in the entire MeA but concentrated along its dorsal side) also revealed that these two stimuli activate interspersed groups of cells throughout the MeA (Figure 4E). Therefore, our results indicate that MeA activity is not organized to reflect behavioral outputs (reproductive or defensive). Instead, by the use of wide variety of odors, we find that each stimulus is represented by a distributed set of active cells, and that different olfactory stimuli activate intermingled ensembles in the medial amygdala, without gross spatial segregation.

Distinct olfactory stimuli stereotypically activate spatially segregated groups of neurons in the ventromedial hypothalamus

Similar to the MeA, prior studies suggested that the VMH is organized in functional sub-regions: predator (cat and rat) odors activate the dorsal sector of the VMH (VMHdm), while male and female mouse odors activate its ventrolateral aspect (VMHvl); thus, the notion arose that these sectors reflect defensive and social output behaviors, respectively (Swanson, 2000; Choi et al., 2005; Lin et al., 2011; Silva et al., 2013). However, these conclusions were based on the use of a very limited selection of odors, and few comparisons have been made between activity patterns due to different odors.

We set out to investigate how activity in the VMH is organized, by using our comprehensive list of odors, which elicit several distinct output behaviors, including defensive, aggressive, sexual (towards adults or juveniles) or neutral responses (Figure 5). Consistent with the notion that VMHdm activity correlates with defensive behavior,

male mice exposed to the odors of feline predators (domestic cat, leopard cat, mountain lion and african lion) and one avian predator (owl) displayed massive c-Fos expression in the VMHdm (Figures 5A, 5B and S5A and Table S2), with very few or no immunostained cells observed in the VMHvl. Instead, conspecific same-strain olfactory stimuli (Figures 5G and 5H) or exposure to the odors of different strains (Balb/c and 128S; Figure 7A) produced moderate to low activation in the VMHvl of C57Bl6/J mice.

To more precisely map the expression patterns between our stimuli, we demarcated the VMH boundary in each immunostained brain section, and plotted the position of each imaged c-Fos-positive cell onto a schematic reference map (Figure 5, top right in each panel; see details in Supplemental Experimental Procedures). The final representation of c-Fos-positive cells was further subdivided and quantified in 5 zones along the nucleus' longer axis (Figure 5, bottom right in each panel). These analyses confirm that heterospecific stimuli elicit activation circumscribed to the VMHdm and that some conspecific stimuli activate the VMHvl, in a stereotypic fashion (Figure 5), with activated cells being evenly dispersed in each sector (Figures 5 and S5C).

Next, we similarly mapped the activity evoked by additional taxonomically unrelated predators (hawk, several snake species and tarantula spider) and unexpectedly found very strong c-Fos expression in the previously described 'reproductive' zone, the VMHvl, with very few or no activated cells present in the previously described 'defensive' VMHdm (Figures 5D-5F and S5D). Moreover, olfactory stimulus from another type of predator (rat urine) induced VMH activity that was neither dorsal nor ventral. Instead, we found it to be located in a previously uncharacterized region, the central VMH (Figure 5C), similar to the ensemble activated after exposure to

a Mup from rat urine (Figures S5B and S7C), which has been shown to be sufficient to induce instinctive defensive behaviors in mice (Papes et al., 2010).

To further investigate the organization of olfactory representation in the VMH, we examined whether different stimuli elicit c-Fos expression in same or different subpopulation of neurons. Mice were sequentially subjected to two stimulations and the VMH was analyzed using the same dual c-Fos staining protocol described before (Figure 6 and Video S1; see Figures S6A and S6B for controls). We observed that two exposures to the same odor (snake) induce activation in the same circumscribed region of the VMH (VMHvl), and activated cells from both episodes are intermingled, with some overlap (Figures 6A and 6B). Similar results were obtained for the VMHdm activated by two sequential episodes of stimulation with cat odor (not shown). The concordance between the two ensembles activated by the same stimulus is significantly above that expected by chance alone [$23.4 \pm 0.9\%$ of all cells expressing c-Fos protein that also express c-Fos mRNA *versus* $2.5 \pm 0.6\%$ overlap expected by chance (mean $\pm$ s.e.m.; Welch's t-test assuming unequal variances; $t=24.3$; d.f.=6; $P<10^{-7}$)]. These results indicate that each odor is represented by an ensemble which is circumscribed to a region of the VMH, and that the ensembles are not random, suggesting that these coherent representations are hard-wired and may be read by the brain to generate innate responses.

Snake odor and mouse female odor activate opposing behaviors in male mice (Figures 1A and S1A), yet clearly result in activation of the same overall region of the VMH, the VMHvl. Therefore, we investigated if both types of olfactory information are represented by mutually exclusive ensembles. Interestingly, we found that activation

due to snake and conspecific odors are not grossly spatially segregated within the VMHvl, with some intermingling of c-Fos-positive cells related to both stimuli in this zone (Figures 6C and 6D). However, the overlap level seen between the two ensembles is much lower than the overlap observed when the same stimulus is applied twice (compare Figures 6B and 6D) and not significantly different from the overlap expected by random activation of VMH cells [$3.9 \pm 0.9\%$ of all cells expressing c-Fos protein that also express c-Fos mRNA *versus* $2.1 \pm 0.6\%$ overlap expected by chance ($t=0.79$; $P=0.24$)]. Moreover, fine analyses of the distribution of activated cells for snake and conspecific odors indicated that the active ensemble for conspecific odor is skewed towards the ventral side of the VMHvl (Figures S6D, S6E and 7A). Additionally, little overlap was seen between the collections of male VMH neurons activated by predator or same-sex mouse odors (Figures 6E and 6F). Together, these data indicate that different stimuli represented in the same VMH zone activate largely distinct subpopulations of neurons. They also strongly suggest that odors which impose different behavioral consequences may be represented by devoted groups of neurons in this nucleus.

The foregoing results (Figures 5 and 6) indicate that: (a) distinct stimuli that elicit instinctive behaviors activate spatially segregated groups of neurons in the VMH; (b) VMH activity patterns in response to stimuli are conserved between individuals; (c) distinct stimuli that drive different behaviors may activate devoted groups of neurons, even if they activate the same VMH zone; (d) predator odors elicit activity that is not restricted to the VMHdm, and the VMHvl is not exclusively involved in processing social intraspecific (reproductive or aggressive) signals, indicating that the VMH organization

is not in keeping with its previously proposed functional subdivisions (reproductive versus defensive; Swanson, 2000).

The ventromedial hypothalamus houses a neural map to represent sensory

5 olfactory input in the brain

If VMH activity is not organized by behavioral function, what are then the principles of organization behind the representation of odors in this area? We do observe that each individual stimulus activates a fraction of cells within one of many circumscribed regions, and different stimuli result in different neural representations, which together appear to constitute some sort of map. But what does such map represent and how is it formed? To determine what such a map represents, we tested the validity of possible models of organization in the VMH. First, we analyzed if the map reflects the behavioral outputs generated by the detected odors. Because the VMHvl and VMHdm are, respectively, activated by conspecific stimuli (controlling social behaviors) and by a few predator odors (Dielenberg et al., 2001; Choi et al., 2005; Lin et al., 2011; Silva et al., 2013), the notion arose that the VMH is an effector brain region whose activation status reflects the behaviors generated in response to sensory stimulation. However, our results show that even odors capable of eliciting defensive responses activate the VMHvl (Figures 5 and 7A). Moreover, the activity due to predator odors is not exclusively restricted to the VMHdm (Figures 5D-5F) and the spatial distributions of cells in the active ensembles (Figure S7A) are not significantly different for predator versus non-predator stimuli (two sample Kolmogorov-Smirnov distribution comparison (KS) test, $P=0.36$; and Welch's t-test assuming unequal variances for

comparing mean centroid positions, $t=1.2$, $P=0.22$). Similarly, we could not conclude that the group of activated cells due to heterospecific stimuli is spatially disjunct from the population activated by conspecific social stimuli (Figure 7B) (KS $P=0.47$; t-test $t=0.9$, $P=0.44$), nor could we find any statistically significant separation between the ensembles activated in defensive or social contexts (Figure 7C) (KS $P=0.54$; t-test $t=1.1$, $P=0.35$). These data challenge the current crystallized idea for the organization of the ventromedial hypothalamus and call for alternative models to explain how pheromones and kairomones are represented in the brain.

Second, we alternatively hypothesized that the spatial segregation of activity for distinct stimuli in the VMH map could be explained by the taxonomic groups to which the species tested belong. This model is not supported, however, because the distributions of activated cells for two avian predators are not concordant (Figures 5 and 7A), mammals activate both the VMHdm and VMHvl (Figures 5B, 5D, 7A and S7B), and the same region (VMHvl) is activated after exposure to stimuli from distantly related species (mouse, hawk, snake and an invertebrate) (Figures 5D-5F and 7A).

Third, we examined whether the location of activity in the VMH is dependent on the chemical nature of the stimuli. For example, small organic molecules could be represented in one VMH zone, while proteins/peptides would evoke activity in another zone. However, our data show that male mouse urine (containing both Mup proteins and small organic VNO ligands; Chamero et al., 2007) activates the VMHvl (Figures 5G and 7A), whereas cat odor (containing a defensive behavior-inducing Mup; Papes et al., 2010) activates the VMHdm (Figure 7A). Importantly, recombinant mouse Mup proteins lead to c-Fos-positive cells located in the VMHvl, whereas predator Mups and a peptidic

VNO ligand in the ESP family (Kimoto et al., 2005; Haga et al., 2010) activate cells located elsewhere, close to the central VMH (Figure S7C). Therefore, our data indicate that stimuli of similar chemical nature not necessarily induce identical patterns of VMH activity, suggesting that the mapping of olfactory information in the VMH is not
5 dependent on the stimulus' chemical makeup.

In our final model, we sought to test whether the map generated in the VMH is dependent on the molecular identity of the activated sensory neurons. Previous publications (Isogai et al., 2011) and data collected by our group (Figure 1B and unpublished observations) indicate that most stimuli employed in our study are detected
10 by cells in the basal zone of the VNO, characterized by the expression of GPCR receptors in the V2R family (~120 family members, phylogenetically grouped into several clades; Silvotti et al., 2007). Therefore, we decided to focus on defining the V2R receptors expressed in activated VNO neurons in animals individually exposed to various stimuli, using double fluorescent in situ hybridization with one probe to detect
15 the expression of the immediate early gene *Egr1* and other probes to detect specific clades of V2R receptors (Figures 7F and S7D) (see Supplemental Experimental Procedures for probe design and validation).

Surprisingly, when we compared the distribution of activated cells in the VMH (Figure 7A) with the receptors expressed in activated VNO neurons for each stimulus
20 (Figure S7E), we verified a strong and consistent correlation between the centroid of the spatial distribution of activated VMH ensembles and the corresponding clades of activated VNO receptors (Figure 7D) [correlation index 87% determined by Multivariate Analysis of Variance (MANOVA)]. Stimuli that activate VNO neurons expressing V2R

receptors in the A4 clade (nomenclature following Silvotti et al., 2007) all produce c-Fos expression in the VMHdm. In contrast, intra- and interspecies chemosignals detected by VNO cells expressing other clades of V2R receptors, particularly clades A8, A5 and A1, activate the VMHvl (Figure 7D). Two-sample Kolmogorov-Smirnov test revealed that the ensembles activated by these two stimulus categories are disjunct ($P=0.003$), and the mean centroid positions for ensembles observed in the two groups (red circles in Figure 7D) are significantly different (t-test, $t=27.2$, $P<e^{-21}$).

Interestingly, rat odor, which seems to be detected by both A4 and A8 receptors in the VNO (Isogai et al., 2011), is represented by a centrally located ensemble in the VMH (Figures 5C and 7A). Strikingly, the ESP1 peptide (Haga et al., 2010), which is detected by VNO neurons expressing receptors in the A3 V2R clade positioned intermediately in the phylogenetic V2R tree between clade A4 and clades A1/A8 (Figure S7D), leads to activation in the central zone of the VMH, between VMHdm and VMHvl (Figure S7C).

Together, our findings support the notion that the representation of odors in the VMH does not reflect the valence or behavioral consequences of the detected stimuli, as previously thought. Instead, it represents the molecular receptors in the sensory cells that detect the stimuli, revealing for the first time that a sensory map of vomeronasal input information exists deep in the limbic system in mammals.

Discussion

Representation of olfactory information in the brain

In this study, we investigated the neural representation of odors which elicit instinctive behaviors important for the survival of the individual and the species (pheromones and kairomones). Using a combination of behavioral, genetic and brain activity analyses, we show here that a wide range of different odors activate specific nuclei in the mouse brain, and that some of these areas are functionally involved in the circuit initiated at the VNO, most notably the medial nucleus of the amygdala (MeA) and the ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH). Though the general involvement of the amygdala and hypothalamus in processing olfactory information has been appreciated for some time (Swanson, 2000), their exact place in the neural mapping and representation of odors remained poorly characterized. We investigated the organization of activity in these two areas and, strikingly, found that it does not reflect output behaviors, as previously thought; instead, an unprecedented neural map of sensory input information was found to exist in the hypothalamus.

Organization of the representation of olfactory information in the amygdala

Other studies suggested that the MeA is divided in 'reproductive' and 'defensive' sectors (Swanson, 2000; Choi et al., 2005). In this study, our use of a wide selection of heterospecific and conspecific signals and of potent stimuli from several species enabled us to conclude that active cells related to most stimuli are in fact distributed throughout the MeA, with no apparent spatial organization (Figures 4 and S3), putting into question the proposed division of the MeA in dorsal/reproductive and ventral/defensive sectors.

Moreover, we show that different VNO stimuli activate intermingled ensembles of cells in the MeA, without gross spatial segregation. Interestingly, this distributive organization resembles the piriform cortex, where volatile odorants detected by the main olfactory epithelium are internally represented by distributed ensembles of active neurons, without any discernible spatial organization, irrespective of the stimulus' chemical nature, concentration or valence (Stettler and Axel, 2009). Curiously, the cortical amygdala, which also receives olfactory information collected by the main olfactory epithelium, seems to be organized in a spatially segregated fashion (Miyamichi et al., 2011; Sosulski et al., 2011). In the future, it will be interesting to know if odors detected by the main olfactory epithelium, which may include pheromones, are represented in a spatially segregated manner in the cortical amygdala, and, if so, why their representation is different from the representation of pheromones/kairomones in the MeA.

Organization of the representation of olfactory information in the hypothalamus

In the VMH, we found olfactory information to be represented according to the following rules: (a) each stimulus stereotypically activates an ensemble of neurons whose spatial location is concentrated in a circumscribed region of the nucleus; (b) different stimuli lead to diverging and spatially segregated ensembles of active neurons, similar to the organization of pheromone information in the lateral horn of the fly brain (Fisek and Wilson, 2013), and of taste information in the mammalian gustatory system (Chen et al., 2011); (c) odors from close species are no more likely to generate similar patterns of activity than those from distantly related ones; (d) the distribution of activated

cells is dictated neither by the behavioral consequences of the detected stimuli nor by their chemical nature; (e) there exists a strong correlation between the repertoire of receptors expressed in activated sensory neurons and the location of activated cells in the VMH. Thus, we conclude that the ventromedial hypothalamus contains a site where
5 olfactory sensory information related to instinctive behaviors is internally represented and mapped in the brain.

The VMH organization we describe here is in striking contrast with the current notion that the VMH is an effector site whose activity reflects brain outputs (reproductive or defensive behaviors) (Swanson, 2000). Instead, our data show that the
10 representation of odors in the hypothalamus is ruled by the sensory brain inputs, and therefore constitutes a sensory neural map in the limbic system.

These findings pose an interesting and exciting final question: if vomeronasal sensory receptor information (and not the ensuing behaviors) is maintained in the VMH, where are then the behaviors represented in the brain? The dorsal premammillary
15 nucleus and periaqueductal gray, anatomically positioned downstream to the VMH (Motta et al., 2009), are likely candidates, since they are activated by pheromones/kairomones and have been causally implicated in numerous behaviors. In the future, functional mapping of the flow of olfactory information along this brain circuit will be needed to understand the transition between the internal sensory representation
20 we describe in the limbic system and the representation and generation of adaptive behaviors in this yet uncharacterized higher brain region.

Experimental Procedures

Animals and stimuli

Animals were 8-weeks old male mice (females where indicated). TrpC2^{+/+} and TrpC2^{-/-} littermates were obtained by crossing C57Bl6/J background heterozygous couples
5 (Papes et al., 2010).

Dual Immunostaining / In situ Hybridization

Our new method for the combined detection of c-Fos mRNA and protein by dual immunostaining / in situ hybridization was based on the catFISH procedure (Lin et al.,
10 2011). In short, animals were quickly perfused after the second stimulation. Chosen 40 μ m vibratome sections encompassing the MeA and VMH were subjected to in situ hybridization for *c-Fos*, using two 1kb DIG-labeled riboprobes. Labeling involved two steps of signal amplification (DIG probe > horseradish peroxidase HRP-labeled anti-DIG antibody > tyramide-biotin > HRP-streptavidin > Alexa-546-tyramide). Sections were
15 then subjected to regular immunostaining for c-Fos using the Ab5 antibody (Millipore) (Papes et al., 2010) and Alexa-488 label.

Acknowledgements and author contributions

We thank GAG Pereira and JA Yunes for resources, AR Castro, GL Castro and DM
20 Mendes for providing snake and spider odors, NDM Villanueva for help with statistical analyses, ML Justino for help with artwork, the Life Sciences Core Facility (LaCTAD-UNICAMP) staff and K Spencer (Scripps) for help with confocal microscopy, and Dr. S. Liberles for kindly providing ESP expression constructs. V.C., T.N. and L.C. performed

Egr1 in situ hybridization expts., behavioral assays and c-Fos immunostaining, T.N. and M.S. performed dual staining expts., and other authors contributed to remaining data. This work was supported by Young Investigator FAPESP and PRP/UNICAMP grants to F.P. and by FAPESP fellowships to V.C., T.N., M.S., L.C., F.T. and F.C..

5

References

- Blanchard, D.C., Canteras, N.S., Markham, C.M., Pentkowski, N.S., and Blanchard, R.J. (2005). Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 1243–1253.
- Canteras, N.S., Simerly, R.B., & Swanson, L.W. (1995). Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 360, 213–245.
- Canteras, N.S., Chiavegatto, S., Ribeiro do Valle, L.E., and Swanson, L.W. (1997). Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Res. Bull.* 44, 297–305.
- Chamero, P., Marton, T.F., Logan, D.W., Flanagan, K., Cruz, J.R., Saghatelian, A., Cravatt, B.F., and Stowers, L. (2007). Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature* 450, 899–902.
- Chen, X., Gabitto, M., Peng, Y., Ryba, N.J.P., and Zuker, C.S. (2011). A gustotopic map of taste qualities in the mammalian brain. *Science* 333, 1262–1266.

20

- Choi, G.B., Dong, H.W., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Swanson, L.W., and Anderson, D.J. (2005). Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron* 46, 647–660.
- Dielenberg, R.A., Hunt, G.E., and McGregor, I.S. (2001). “When a rat smells a cat”: the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neurosci.* 104, 1085–1097.
- Fernandez-Fewell, G.D., and Meredith, M. (1996). c-Fos expression in Vomeronasal Pathways of mated or pheromone-stimulated male golden hamsters. *J. Neurosci.* 14, 3643-3654.
- 10 Fisek, M., and Wilson, R.I. (2013). Stereotyped connectivity and computations in higher-order olfactory neurons. *Nat. Neurosci.* 17, 280-288.
- Haga, S., Hattori, T., Sato, T., Sato, K., Matsuda, S., Kobayakawa, R., Sakano, H., Yoshihara, Y., Kikusui, T., and Touhara, K. (2010). The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behaviour through a specific vomeronasal receptor.
- 15 *Nature* 466, 118–122.
- Isogai, Y., Si, S., Pont-Lezica, L., Tan, T., Kapoor, V., Murthy, V.N., and Dulac, C. (2011). Molecular organization of vomeronasal chemoreception. *Nature* 478, 241–245.
- Kimchi, T., Xu., J., and Dulac, C. (2007) A functional circuit underlying male sexual behaviour in the female mouse brain. *Nature* 448, 1009-1014.
- 20 Kimoto, H., Haga, S., Sato, K., and Touhara, K. (2005). Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature* 437, 898–901.
- Kollack-Walker, S., and Newman, S.W. (1997). Mating-induced expression of c-fos in the male syrian hamster brain. *J. Neurobiol.* 32, 481-501.

- Lin, D., Boyle, M.P., Dollar, P., Lee, H., Lein, E.S., Perona, P., and Anderson, D.J. (2011). Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. *Nature* 470, 221–226.
- Luo, L., and Flanagan, J.G. (2007) Development of continuous and discrete neural maps. *Neuron* 56, 284-300.
- Miyamichi, K., Amat, F., Moussavi, F., Wang, C., Wickersham, I., Wall, N.R., Taniguchi, H., Tasic, B., Huang, Z.J., He, Z., Callaway, E.M., Horowitz, M.A., and Luo, L. (2011). Cortical representations of olfactory input by trans-synaptic tracing. *Nature* 472, 191–196.
- 10 Motta, S.C., Goto, M., Gouveia, F.V., Baldo, M.V.C., Canteras, N.S., and Swanson, L.W. (2009) Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding in subordinate conspecific intruders. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 4870-4875.
- Munger, S.D., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2009) Subsystem organization of the mammalian sense of smell. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 115-140.
- 15 Papes, F., Logan, D.W., and Stowers, L. (2010). The vomeronasal organ mediates interspecies defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs. *Cell* 141, 692–703.
- Petrovich, G.D., Canteras, N.S., and Swanson, L.W. (2001). Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res. Rev.* 20 38, 247–89.
- Silva, B. A., Mattucci, C., Krzywkowski, P., Murana, E., Illarionova, A., Grinevich, V., Canteras, N. S., Ragozzino, D., and Gross, C. T. (2013). Independent hypothalamic circuits for social and predator fear. *Nature Neurosci.* 16, 1731–1733.

Silvotti, L., Moiani, A., Gatti, R., and Tirindelli, R. (2007) Combinatorial co-expression of pheromone receptors, V2Rs. *J. Neurochem.* 103, 1753-1763.

Sosulski, D.L., Bloom, M.L., Cutforth, T., Axel, R., and Datta, S.R. (2011). Distinct representations of olfactory information in different cortical centres. *Nature* 472, 213–
5 216.

Stettler, D.D., and Axel, R. (2009). Representations of odor in the piriform cortex. *Neuron* 63, 854–864.

Stowers, L., Holy, T.E., Meister, M., Dulac, C., & Koentges, G. (2002). Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 295,
10 1493–500.

Swanson, L.W. (2000). Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Res.* 886, 113–164.

Von Campenhausen, H., and Mori, K. (2000). Convergence of segregated pheromonal pathways from the accessory olfactory bulb to the cortex in the mouse. *Eur. J. Neurosci.*
15 12, 33–46.

Wagner, S., Gresser, A.L., Torello, A.T., and Dulac, C. (2006) A multireceptor genetic approach uncovers an ordered integration of VNO sensory inputs in the accessory olfactory bulb. *Neuron* 50, 697-709.

Figure legends

Figure 1. A wide range of olfactory stimuli able to induce instinctive behaviors activate discrete brain areas

(A) Increased avoidance defensive behavior (left) after exposure to various heterospecific mammalian and non-mammalian predator odors. Some heterospecific (rabbit) and conspecific stimuli do not induce behavior. In contrast, intermale aggression (right) is elicited by conspecific, but not by heterospecific, odors. Heterospecific stimuli are shown in orange and conspecific ones in blue, grouped according to presentation form (bedding, gauze or bodily shedding). Mean $\pm$ s.e.m. * $p < 0.01$; ANOVA followed by Tukey-Kramer HSD post-hoc analysis against respective control (white bars). See Tables S1 and S2 for a list of stimuli and controls.

(B) Exposure of male mice to conspecific or heterospecific stimuli activates VNO neurons, as evidenced by in situ hybridization with RNA probe to immediate early gene *Egr1*. Control (ctrl) odor is PBS-soaked gauze for liquid stimuli (similar number of *Egr1*-positive cells were found for other controls). Scale bar represents 100 μ m. lu, VNO lumen. Purple labeling, nuclear stain; green, *Egr1* in situ hybridization signal.

(C) Representation of coronal sections through the mouse brain at the indicated bregma values, showing the location of analyzed brain nuclei in (D). 3V, third ventricle; Aq, cerebral aqueduct.

(D) Heat map representing the activation of several brain nuclei in animals exposed to various heterospecific and conspecific olfactory stimuli. Bright red indicates the largest number of observed c-Fos-positive cells per unit area for each nucleus. White indicates activation comparable to control level. See Table S2 for numbers of c-Fos-expressing cells and a key to heat map colors in each area, for each odor and respective controls.

Marginal activation was seen in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and anterior olfactory nucleus (not shown). A white gap separating two columns indicates that the corresponding stimuli were presented in different forms and should not be compared. ♀exp♂ denotes a female mouse exposed to male odors. n = 6-26. AOB, 5 accessory olfactory bulb; BNST, bed nucleus of the stria terminalis; MeA, medial nucleus of the amygdala; PMCO, posteromedial cortical nucleus of the amygdala; PLCO, posterolateral cortical nucleus of the amygdala; MPOA, medial preoptic area; VMH, ventromedial nucleus of the hypothalamus; PAG, periaqueductal gray; Pir, piriform cortex (related to olfaction, but not to VNO pathways); Hippo, hippocampus 10 (activity not directly related to olfaction and used as control); gcl, granule cell layer of the AOB; mcl, mitral cell layer. n.d., not determined.

Figure 2. Activity induced by pure VNO stimuli in the brain

(A) Comparison among activity in the AOB, MeA and VMH in animals separately 15 exposed to purified ligands presented in the same amount (cat, rat or mouse Mups). Mup24 or a mixture of Mup24, Mup3, Mup8 and Mup25 (Mup mix) were used at the same total amount. The number of c-Fos expressing cells is also shown for corresponding native stimuli, which are cat-scented gauze (SG) and rat urine (Ur.). Heterospecific stimuli are indicated in orange and conspecific ones in blue. White bars 20 represent unscented controls (MBP-soaked or clean gauze for liquid or solid stimuli, respectively). n = 8-12. *p < 0.01. Mean ± s.e.m. ANOVA followed by Tukey-Kramer HSD post-hoc analysis. n.s., no statistically significant difference.

(B) Heat map representing the activation of several brain nuclei in animals exposed to purified heterospecific and conspecific olfactory stimuli. Abbreviations and color grading are the same as in Figure 1 legend. See Table S2 for numbers of c-Fos expressing cells.

5

Figure 3. Investigation of brain areas functionally linked to the detection of odors by the VNO

(A) Exposure to conspecific and heterospecific stimuli leads to activation in the MeA and VMH, judged by c-Fos expression (green). This effect is significantly impaired in $\text{TrpC2}^{-/-}$ animals, where the VNO is non-functional. The white lines mark the boundaries for the MeA (dashed) or VMH (solid). d, dorsal; m, medial; opt, optic tract; 3V, third ventricle. Scale bar represents 100 μm .

10

(B) Quantification of odor-evoked c-Fos expression in several brain areas in $\text{TrpC2}^{+/+}$ (black bars) and $\text{TrpC2}^{-/-}$ (white bars) genotypes. pAOB means activity in granule cell layer of the posterior AOB. See Figure S2 for c-Fos expression in mitral cell layer. Control odor is PBS-soaked or clean gauze for liquid or solid stimuli, respectively. See Table S2 for numbers of c-Fos expressing cells in other brain areas and controls and for other odors, in both genotypes. $n = 8-20$. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$. Mean $\pm$ s.e.m. ANOVA followed by Tukey-Kramer HSD post-hoc analysis (comparison of $\text{TrpC2}^{+/+}$ against $\text{TrpC2}^{-/-}$ for each odor).

15

20

Figure 4. Olfactory stimuli activate dispersed and intermingled ensembles of cells in the medial nucleus of the amygdala (MeA)

(A) Distributed patterns of c-Fos expression in the posterior aspect of the MeA in animals exposed to conspecific and heterospecific stimuli, including several predator species. Panel Aiii represents the dorsal portion of the MeA (MeApd), near the optic tract.

5 (B) Distribution of activity in the anterior aspect (MeAa), and dorsal (MeApd) and ventral (MeApv) parts of the posterior aspect of the MeA, for several stimuli (grouped by presentation form). * $p < 0.01$. Mean $\pm$ s.e.m. ANOVA followed by Tukey-Kramer HSD post-hoc analysis. See also Figure S3 for c-Fos images and other stimuli. lpd. cat, leopard cat.

10 (C) Dual immunostaining / in situ hybridization to compare activity related to two sequential exposures to olfactory stimuli. Top, exposure protocol. Bottom, representative images showing cells activated in the first exposure (green nuclear fluorescence after c-Fos immunostaining) and in the second exposure (two red nuclear fluorescent foci after c-Fos FISH). See Figure S4 for experimental controls.

15 (D) Schematic representation of activated cells in the MeA after two sequential exposures to distinct predatory olfactory stimuli, collected across a 30 μ m thick z-series.

(E) Same as in (D), but to examine activated cells related to sequential exposures to a predator odor and conspecific odor.

n = 4-6. d, dorsal; m, medial; opt, optic tract. Scale bars represent 100 μ m.

20

Figure 5. Olfactory stimuli activate dispersed but spatially circumscribed neural ensembles in the ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH)

Heterospecific and conspecific olfactory stimuli activate sets of neurons in the VMH which are circumscribed to defined zones. In each panel, cFos expression (green), obtained in sections taken at bregma -1.46 mm, is shown on the left. See Figure S5 for c-Fos analysis in other planes along the rostral-caudal axis. Activated cells after exposure to heterospecific stimuli are shown in orange and to conspecific stimuli in blue. On the top right of each panel, the distribution of evoked activity from each stimulus, revealed by plotting the coordinates of each actual cFos positive nucleus from 5 animals onto a standardized reference VMH (see Supplemental Experimental Procedures for details). The boxes in each box-whisker plot represent the interquartile range of the active ensemble distribution along the dorsomedial-ventrolateral or dorsolateral-ventromedial axes of the VMH. Whiskers represent the extremes of the cellular distribution. The circumscription and stereotypy of activity evoked by each odor to specific VMH areas (bottom right in each panel) is evidenced by the quantification of c-Fos positive cells in 5 zones (black bars) along the dorsomedial-ventrolateral axis (scheme in panel A). n = 8-20. Abbreviations are the same as in Figure 3 legend. Scale bar represents 100 μ m.

Figure 6. Ensembles of active neurons in the VMH are non-random and devoted

(A) Dual immunostaining / in situ hybridization to compare activity in the VMH related to two sequential exposures to the same olfactory stimulus (green nuclear fluorescence represents c-Fos immunostaining related to the first exposure and nuclear foci of red fluorescence represent c-Fos related to second exposure). Higher magnification of co-labeled cell in inset.

(B) Left, schematic representation of activated cells in the VMHvl after two sequential exposures to the same stimulus, collected across a 30 μm thick z-series. See Figures S6A and S6B for experimental controls. Right, quantification of distribution and overlap of activated ensembles. The first bar (green) in each set represents cells activated in the first exposure only, the second bar (red) exhibits activated cells in the second exposure only, and the third bar (yellow) represents cells activated in both exposures. Figure S6C shows that our method correctly detects the high overlap between ensembles corresponding to the same stimulus in the piriform cortex ($83.7 \pm 1.7\%$ of all piriform cells expressing c-Fos protein also express c-Fos mRNA; see also Stettler and Axel, 2009).

(C) and (D). Similar to (A) and (B), but to compare ensembles of active cells in the VMHvl related to sequential exposures of male mice to predator stimulus (green fluorescence) and conspecific female odor stimulus (red fluorescence). Note the little overlap between the ensembles in (D), suggesting that cells activated by the two stimuli with opposing consequences are devoted. See also Figures S6D and S6E.

(E) and (F) Similar to (A) and (B), but to compare ensembles of active cells in the VMHvl related to predator stimulus (green) and conspecific male odor stimulus (red). Note the little overlap between the ensembles in (F), suggesting that cells activated by the two stimuli with opposing consequences are devoted.

n = 4-6. Abbreviations are the same as in Figure 3 legend. Scale bars represent 100 μm . See also Video S1 for a depiction of z-series confocal images after dual staining to show cells activated by the first or second stimulus, or both.

Figure 7. A neural map reflecting VNO sensory olfactory input is formed in the VMH

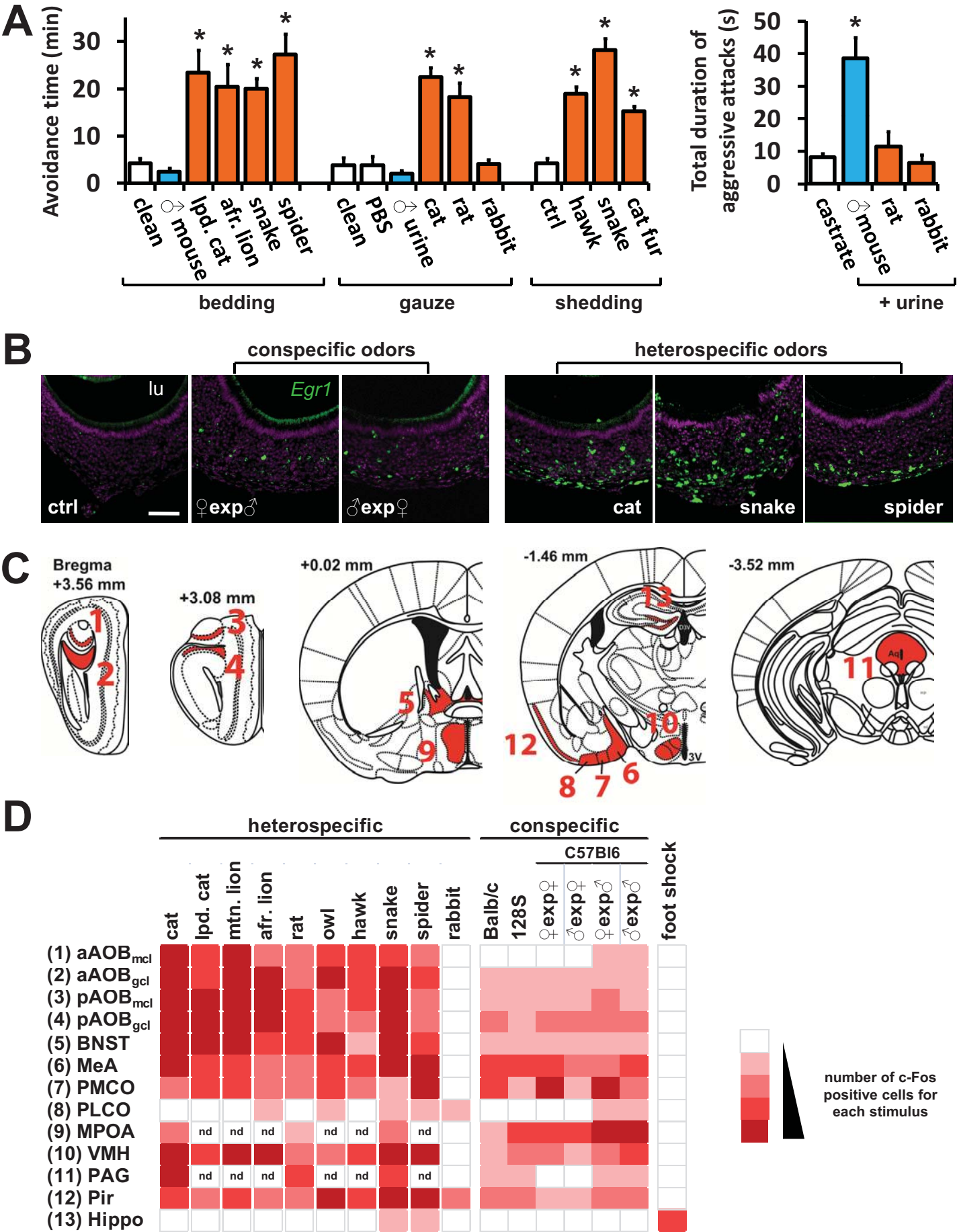
(A) Schematic diagram of the VMH, showing the centroids for the activated ensembles for different stimuli (mean position along both axes $\pm$ s.e.m. of position along the main axis, in an arbitrary 0 to 100 scale along the dorsomedial-ventrolateral long axis). d, dorsal, m, medial.

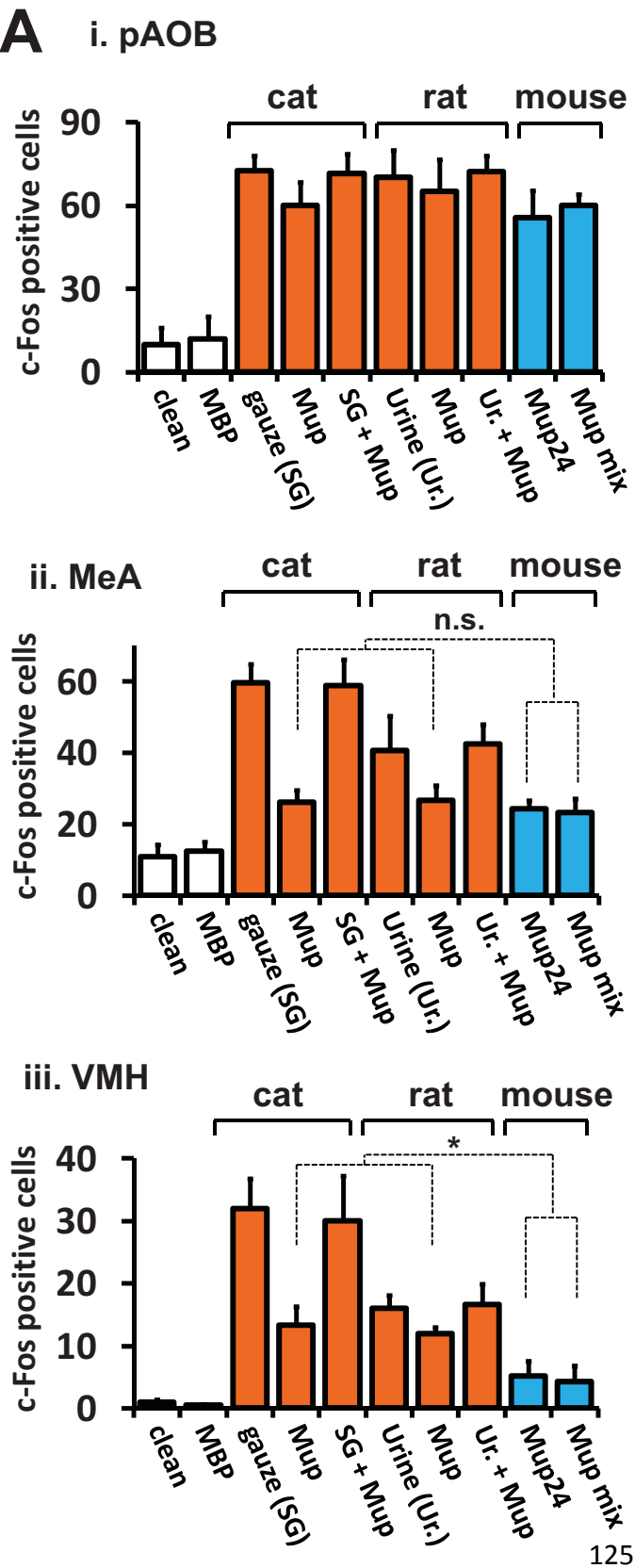
(B-D) Comparisons between the patterns of VMH activity towards various odors and (B) the nature of each donating species (heterospecific versus conspecific), (C) the ensuing behaviors (defensive versus social), or (D) the molecular receptors expressed in detecting sensory neurons. Black dots represent the centroid of activated ensembles for stimuli and red circles represent the global mean centroid for each compared type of stimulus (mean $\pm$ s.d.). Univariate beanplots in the middle represent the distribution of activated cells for each stimulus category. * $p < 0.01$; Welch's t-test. See main text for other statistical tests of distribution comparison.

(E) Model of VMH organization, showing activation of VMHdm by stimuli detected by clade A4 V2R receptors (green), and activation in VMHvl by stimuli detected by other clades of V2R receptors (purple).

(F) Examples of double in situ hybridization for *Egr1* (red) and vomeronasal receptors (green) in VNO sections of animals exposed to different stimuli, with labeling co-localization evidenced in inset. See Figure S7E for results with probes for several V2R receptor clades and Supplemental Experimental Procedures for probe information. lu, lumen. Scale bar represents 100 μ m.

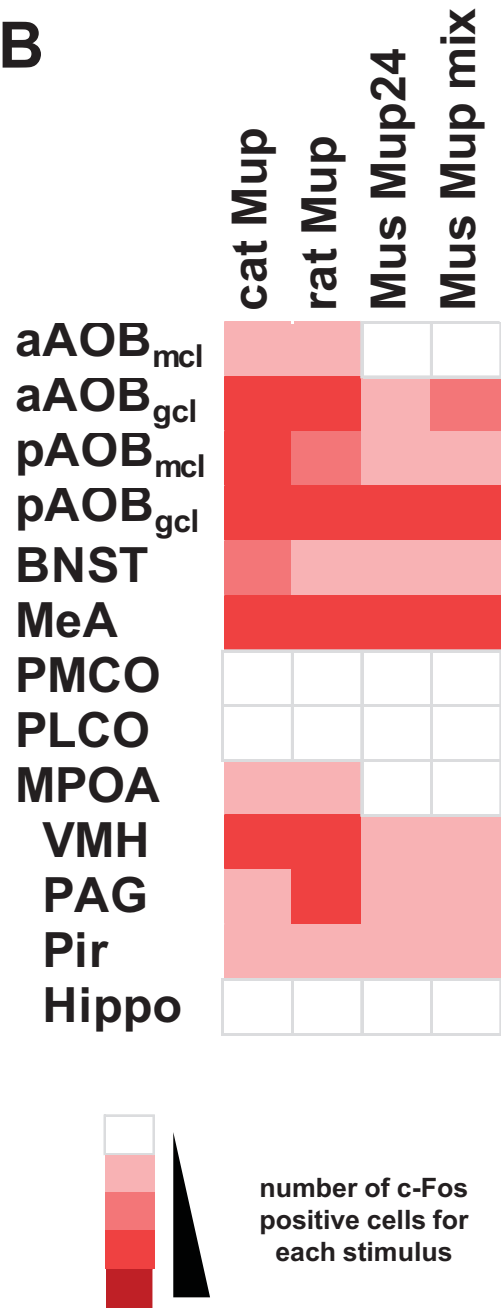
Carvalho et al., Fig. 1



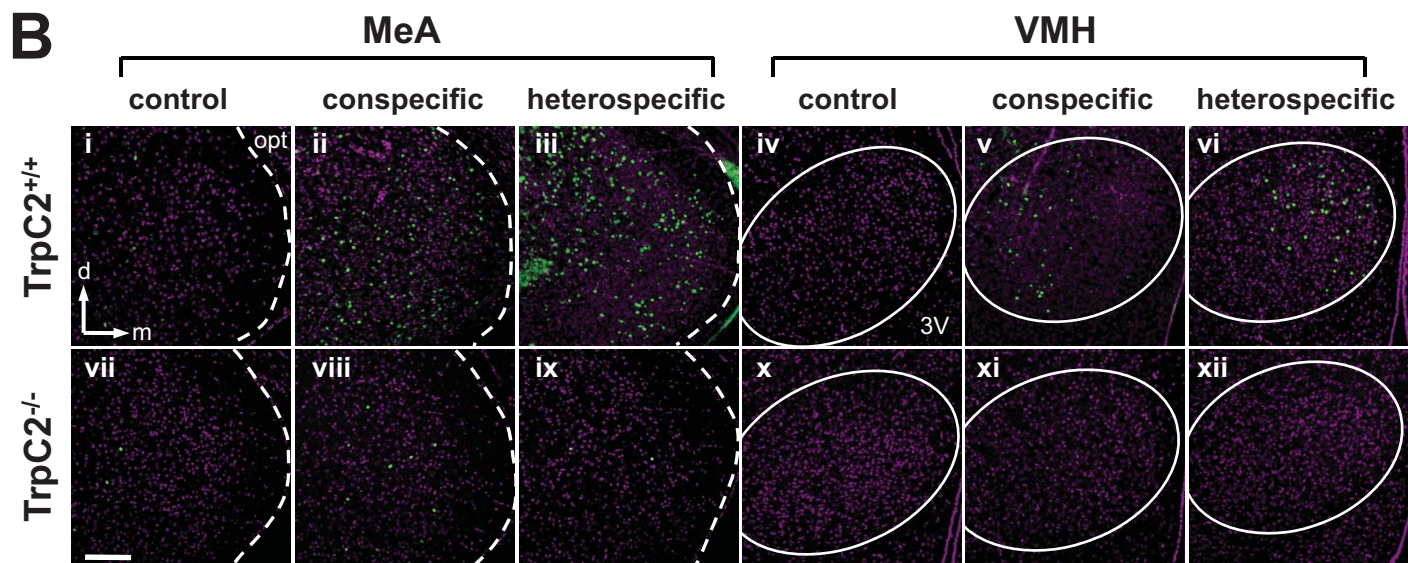
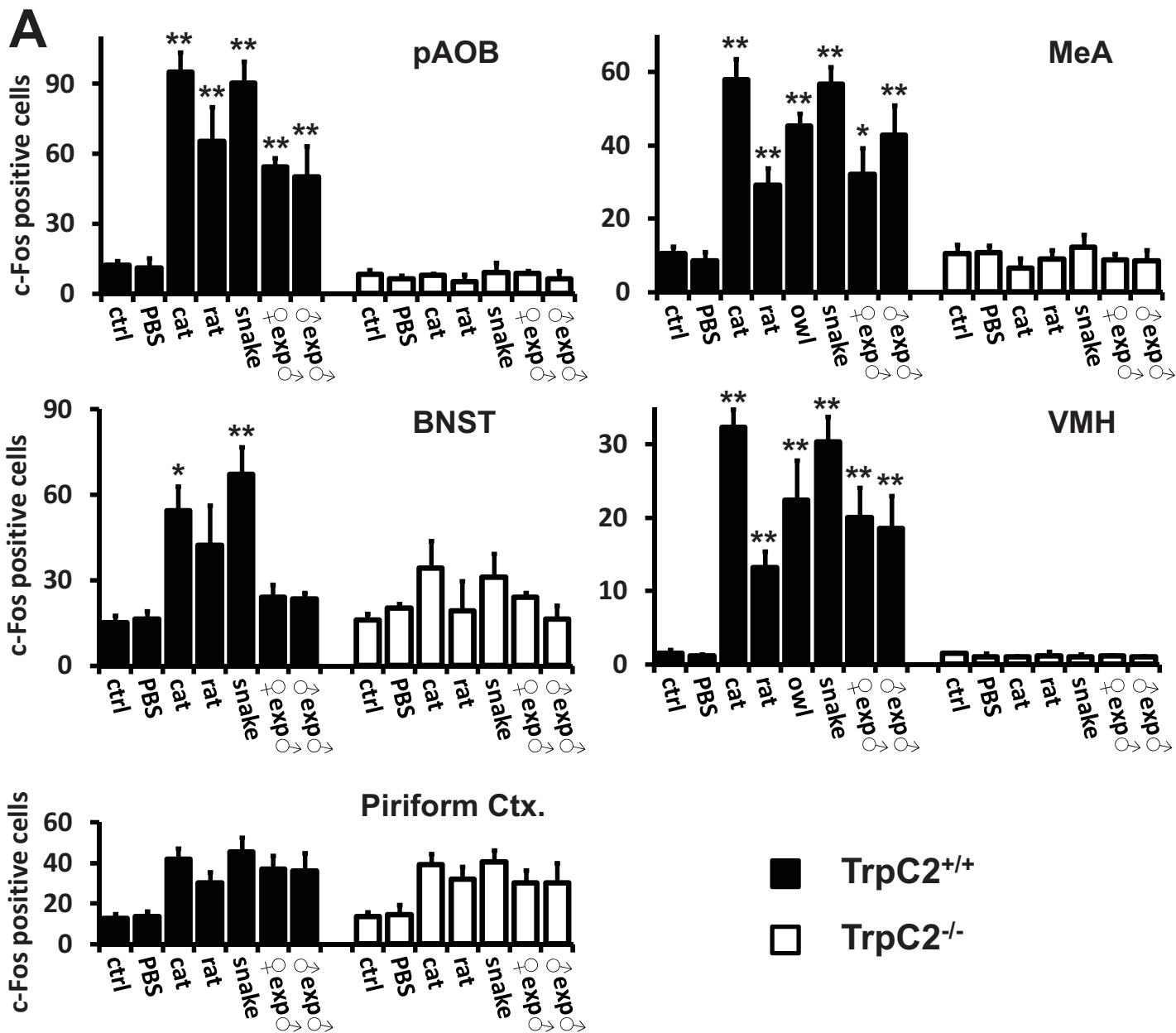


Heterospecific stimuli

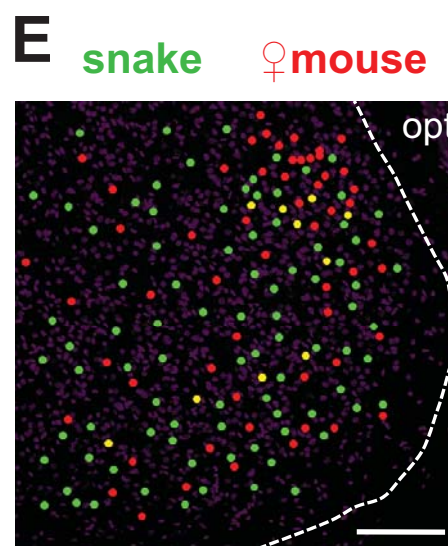
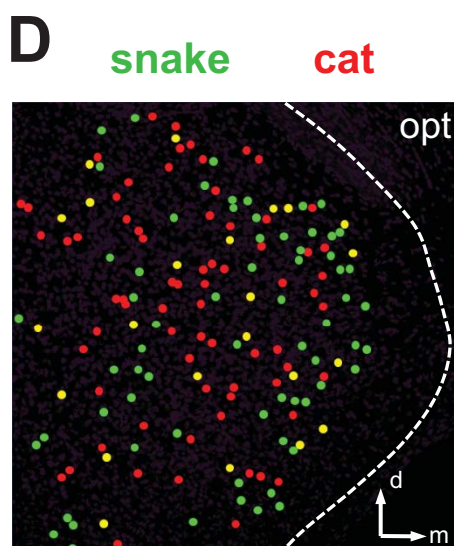
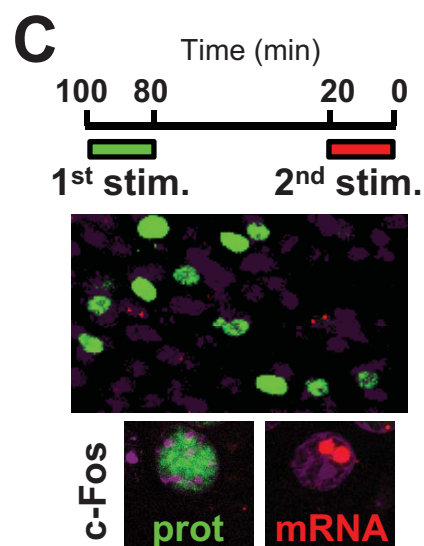
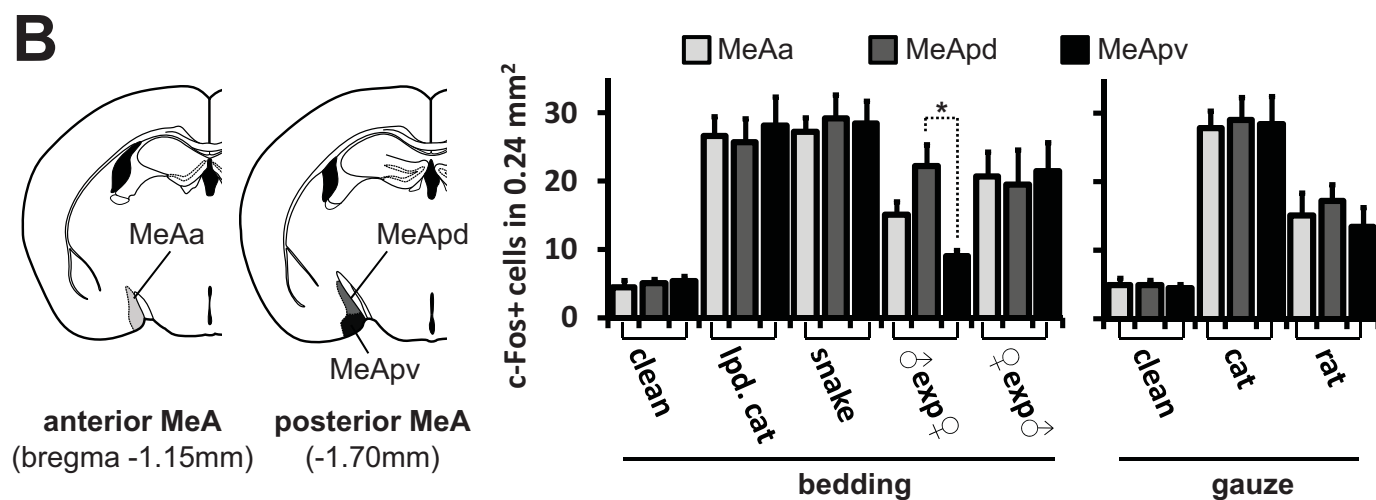
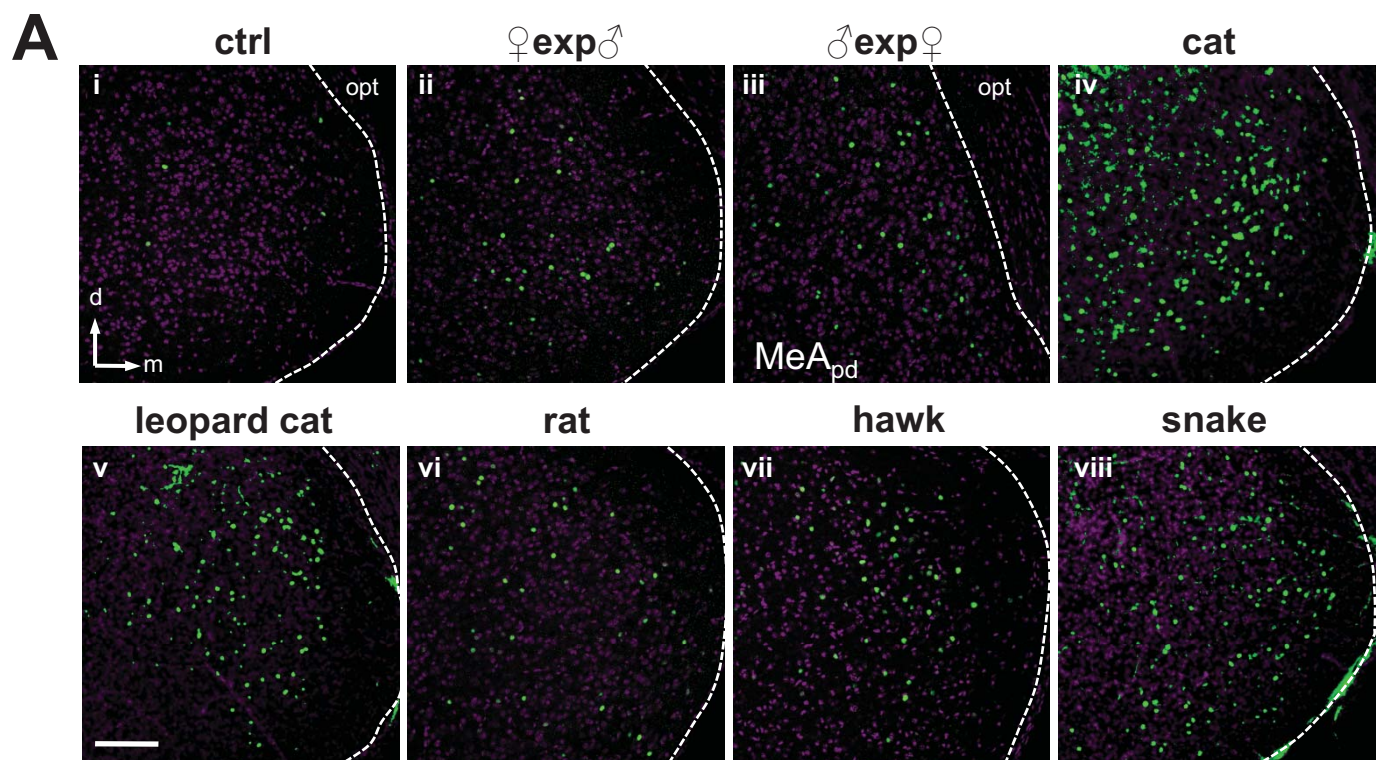
Conspecific stimuli

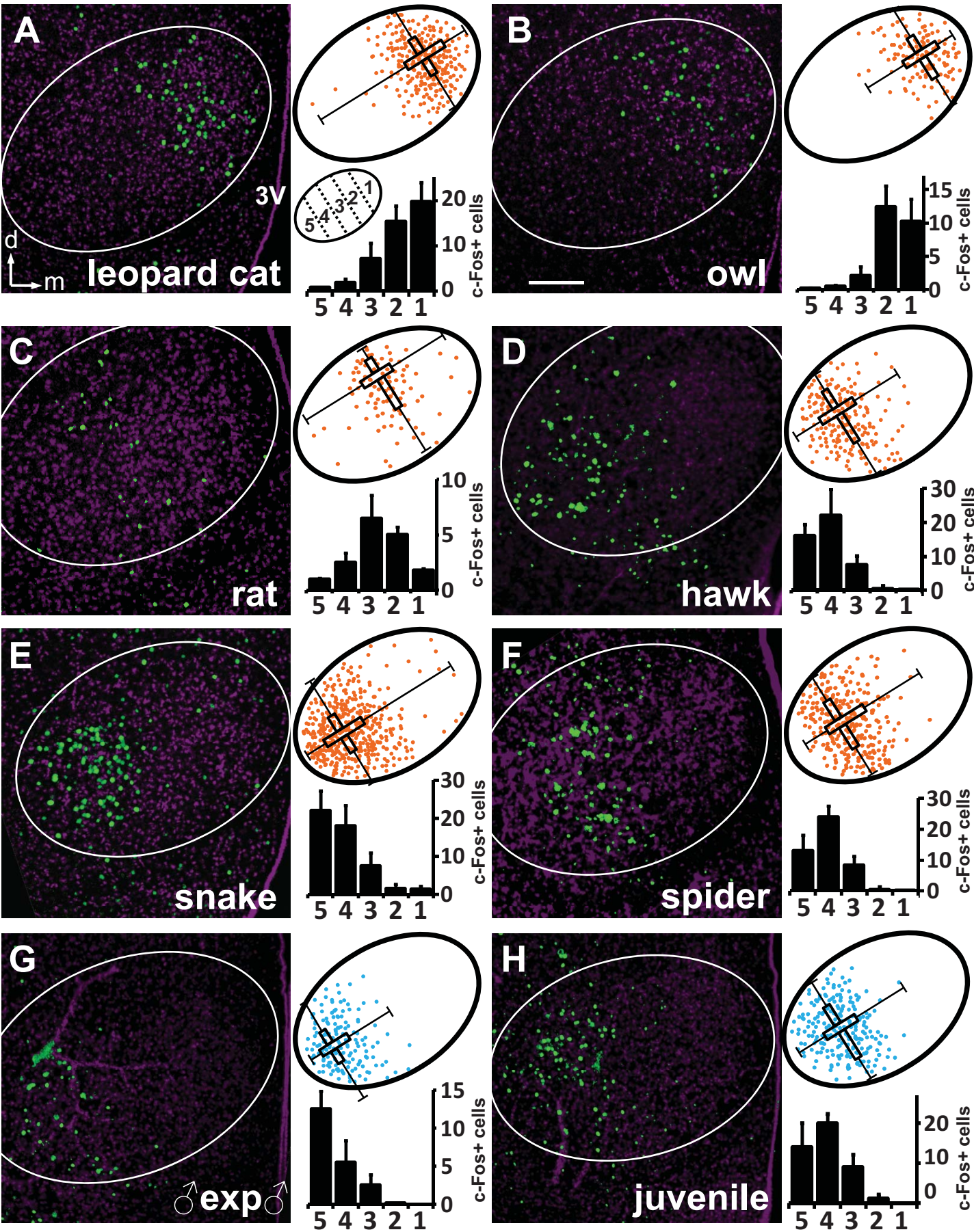


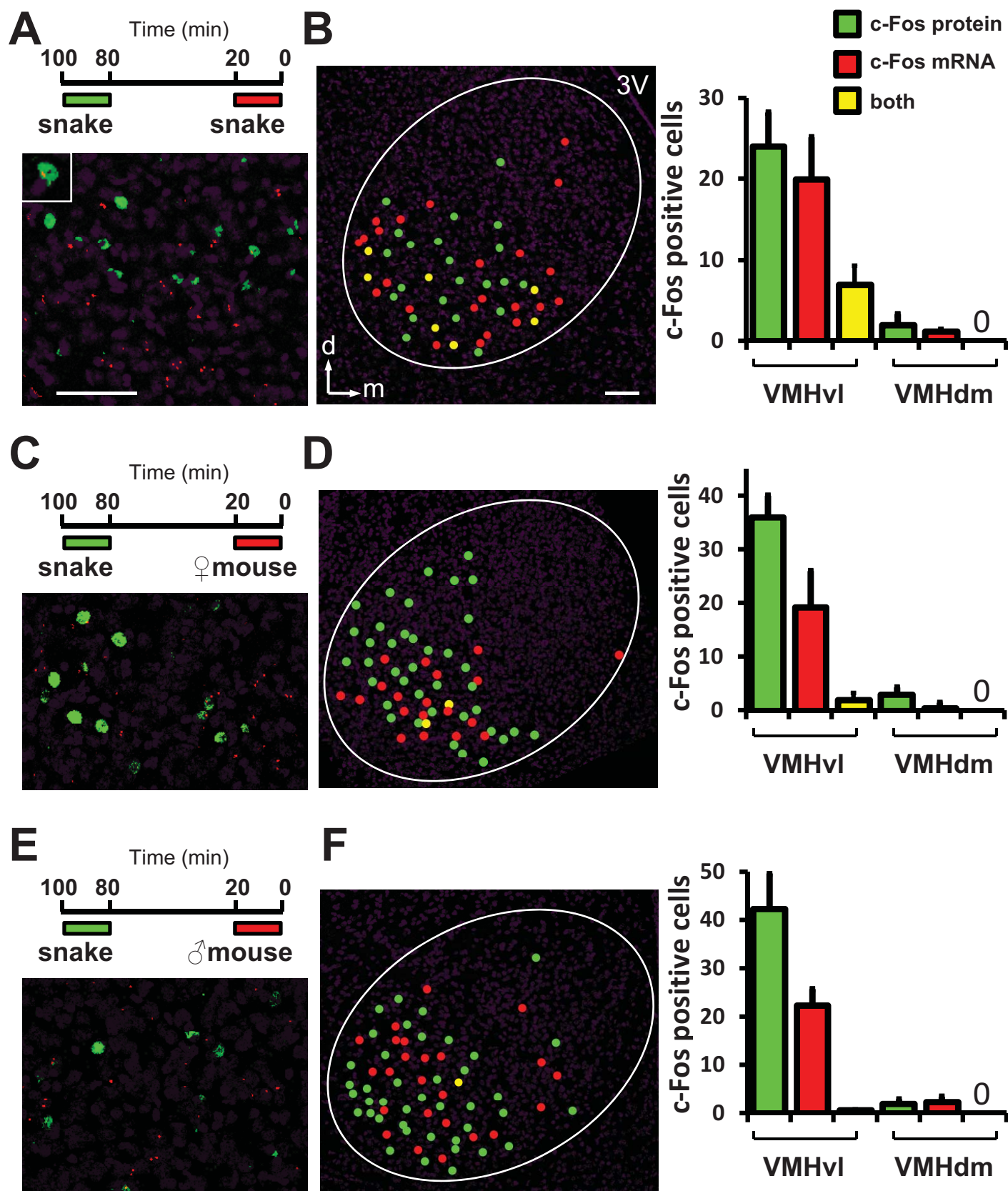
Carvalho et al., Fig. 3

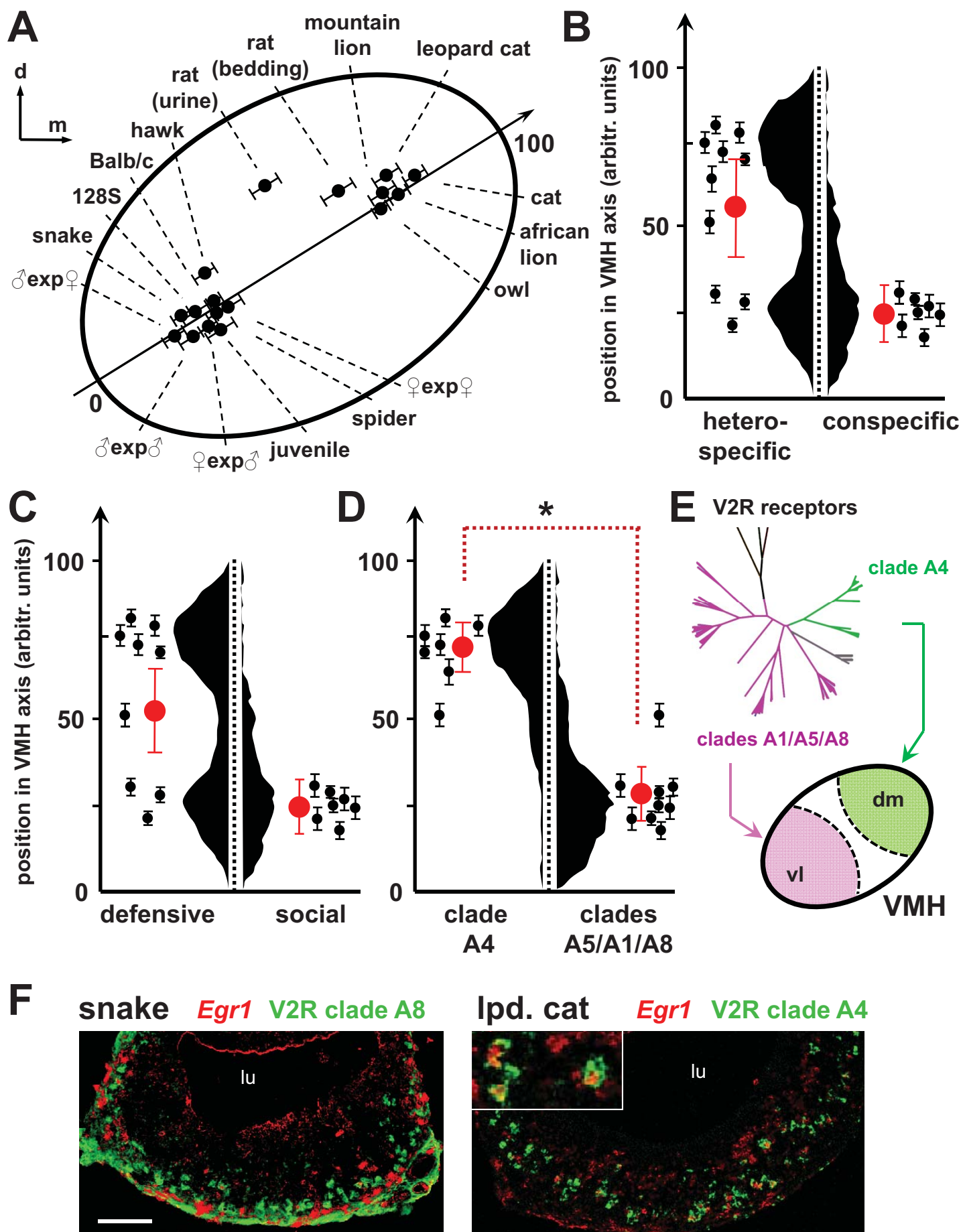


Carvalho et al., Fig. 4









Supplemental Figure Legends

Figure S1. Related to Figure 1

(A) Sexually naive adult C57Bl6 male mice were exposed to male or female subjects (first two bars) and the mounting time in a 5 min assay session was measured as an indication of sexual behavior. The third bar denotes a female that was anesthetized and rubbed against snake skin before the sexual behavior assay, indicating that female mouse and snake odors elicit opposing behavioral consequences (important for the interpretation of Figures 6 and S6, where brain activity related to these two stimuli are compared). Snake skin does not induce any behavior. Mean $\pm$ s.e.m. * $p < 0.01$; ANOVA followed by Tukey-Kramer HSD post-hoc analysis. See Supplemental Experimental Procedures for full description of behavioral assay.

(B) Comparison of activity in VNO sensory neurons, as judged by the number of nuclei expressing the immediate early gene *Egr1* in a 400 μm^2 area of VNO sensory epithelium, between cat odor and several amounts of male mouse urine. Subjects are C57Bl6 male mice. The sigmoidal fitting red curve indicates that large volumes of conspecific urine (measured in ml on a decimal logarithm scale) are saturating and induce less activity than cat odor (gauze rubbed against cat's skin). Mean $\pm$ s.e.m. * $p < 0.01$; ANOVA followed by Tukey-Kramer HSD post-hoc analysis.

(C) Examples of immunostaining for c-Fos (green fluorescence) showing activation of the posterior division of the AOB in animals exposed to three taxonomically distantly related species (heterospecific odors). Purple labeling shows nuclear staining. gcl, granule cell layer; mcl, mitral cell layer; gl, glomerular layer; d, dorsal. Scale bar

represents 100 μm . See Table S1 for a description of stimuli, and Figures 3 and S2 and Table S2 for quantification of AOB activation. See also Papes et al., 2010, for images of AOB c-Fos immunostaining for other stimuli.

(D) Scatter plots comparing the activation level in the VNO (judged by the number of nuclei expressing the immediate early gene *Egr1* in a 400 μm^2 area of sensory epithelium) and the activation level seen in AOB (accessory olfactory bulb), BNST (bed nucleus of the stria terminalis), MeA (medial nucleus of the amygdala), VMH (ventromedial nucleus of the hypothalamus), PMCO (posteromedial cortical nucleus of the amygdala) and MPOA (medial preoptic area), as judged by the number of c-Fos positive cells in each brain region per unit area (as denoted in Table S2). The R^2 and probability values for the F statistics are given in each panel, indicating the amount of variance explained by the linear regression model (dashed red line) and the likelihood that the data fit the model, respectively. Note the positive correlation between AOB, BNST, MeA and VMH activation and VNO activation, but absence of correlation for the PMCO, MPOA and piriform, whose activation status reflects events in the main olfactory epithelium, not the VNO. The hippocampus is used as a control region not directly affected by either the main or accessory olfactory system activation.

Figure S2. Related to Figure 3

(A) Quantification of odor-evoked c-Fos expression in the mitral cell layer of the AOB in TrpC2^{+/+} (black bars) and TrpC2^{-/-} (white bars) genotypes. See Table S2 for full description of odors and controls, numbers of c-Fos expressing cells in the anterior division of the AOB, and for other odors in both genotypes. n = 8-20. *p < 0.05; **p <

0.01. Mean $\pm$ s.e.m. ANOVA followed by Tukey-Kramer HSD post-hoc analysis (comparison of TrpC2^{+/+} against TrpC2^{-/-} for each odor). Control odor is clean gauze (ctrl) or PBS-soaked gauze for solid or liquid stimuli, respectively.

(B) and (C) Quantification of odor-evoked c-Fos expression in the MeA (B) or VMH (C) in TrpC2^{+/+} (black bars) and TrpC2^{-/-} (white bars) genotypes exposed to comparable amounts of pure stimuli. See Supplemental Experimental Procedures and Table S1 for full description of Mup stimuli and amounts used. n = 8. *p < 0.05; **p < 0.01. Mean $\pm$ s.e.m. ANOVA followed by Tukey-Kramer HSD post-hoc analysis (comparison of TrpC2^{+/+} against TrpC2^{-/-} for each Mup). Control odor is PBS-soaked gauze.

(D) Avoidance defensive behavior is impaired in TrpC2^{-/-} mice (white bars) as compared to TrpC2^{+/+} controls (black bars) after exposure to various heterospecific predator odors. Y-axis values indicate the amount of time the animal spends more than 20 cm away from the stimulus in a 30 min session (see Supplemental Experimental Procedures for details). Stimuli are grouped according to presentation form (bedding, gauze or bodily shedding). Mean $\pm$ s.e.m. *p < 0.01; ANOVA followed by Tukey-Kramer HSD post-hoc analysis (comparison of TrpC2^{+/+} against TrpC2^{-/-} for each odor). lpd. cat, leopard cat; afr. lion, african lion. See Table S1 for full description of stimuli.

Figure S3. Related to Figure 3

(A) and (B). Activation in the medial nucleus of the amygdala is distributed across the nucleus and along the rostro-caudal axis (sections in three bregma positions are shown), in animals exposed to cat (A) or snake (B) odors. Images represent immunostaining for the marker of neuronal activation c-Fos (green fluorescence). Purple

labeling, nuclear stain. The white dashed lines mark the boundaries for the MeA. d, dorsal; m, medial; opt, optic tract. Scale bar represents 100 μ m.

(C) Equal distribution of activity in the anterior aspect (MeAa), and dorsal (MeApd) and ventral (MeApv) parts of the posterior aspect of the MeA, for several stimuli (grouped by presentation form). See also Figure 4 for other stimuli. mtn. lion, mountain lion; afr. lion, african lion.

Figure S4. Related to Figure 4

Controls for dual immunostaining / in situ hybridization experiments shown in Figure 4.

(A) Dual immunostaining / in situ hybridization to control for activity related to one exposure to olfactory stimulus during the first application window (100 to 80 min prior to brain dissection). Top, exposure protocol. Bottom, representative image showing location of cells activated in the first exposure (green nuclear fluorescence after c-Fos immunostaining). Rare nuclear red fluorescence foci indicate c-Fos mRNA detected by FISH. Yellow cells express both nuclear c-Fos protein and mRNA.

(B) Left, schematic representation of activated cells in the MeA after one exposure to stimulus during the first application window, collected across a 30 μ m thick z-series. Right, quantification of activated cells related to stimulus exposure. The first bar (green) in each set represents cells activated in the first exposure only, the second bar (red) in each set exhibits rare cells expressing c-Fos mRNA, and the third bar (yellow) represents very few cells expressing both nuclear c-Fos protein and mRNA.

(C) and (D) Same as in (A) and (B), but to examine activated cells related to one exposure to stimulus during the second application window (20 to 0 min before brain dissection).

n = 4-6. d, dorsal; m, medial; opt, optic tract. Scale bar represents 100 μ m for panels (B) and (D).

Figure S5. Related to Figure 5

(A) Olfactory stimuli from african lion activate sets of neurons in the dorsomedial sector of the VMH. A representative image of the marker of neuronal activation c-Fos expression (green fluorescence) evaluated in sections taken at bregma -1.34 mm is shown.

(B) Recombinant version of Mup protein from rat urine activates sets of neurons in the central sector of the VMH, similar to the profile of activation induced by rat urine (see Figure 5). A representative image of c-Fos expression (green) evaluated in sections taken at bregma -1.34 mm is shown. d, dorsal; m, medial; 3V, third ventricle.

(C) and (D) Activation in the VMH is distributed across the rostro-caudal axis (sections in three bregma positions are shown), in animals exposed to cat (C) or snake (D) odors. Images represent immunostaining for c-Fos (green). dm, dorsomedial; vl, ventrolateral. Purple labeling, nuclear stain. The white solid lines mark the clear boundaries for the VMH. Scale bars represent 100 μ m.

Figure S6. Related to Figure 6

(A) Control for dual immunostaining / in situ hybridization experiments shown in Figure 6, to evaluate activity related to one exposure to olfactory stimulus during the first application window (100 to 80 min prior to brain dissection). Top left, exposure protocol. Bottom left, schematic representation of activated cells in the VMH after one exposure to stimulus during the first application window, collected across a 30 μ m thick z-series. Right, quantification of activated cells related to stimulus exposure, in the VMHdm and VMHvl. The first bar (green) in each set represents cells activated in the first exposure only, the second bar (red) exhibits very rare cells expressing c-Fos mRNA, and there are no cells expressing both nuclear c-Fos protein and mRNA (third bar (yellow) in each set).

(B) Same as in (A), but to examine activated cells related to one exposure to stimulus during the second application window (20 to 0 min before brain dissection), showing that cells express c-Fos mRNA (red), and no cells express c-Fos protein (green) or both (yellow).

(C) The high concordance between the ensembles activated by two instances of application of the same stimulus (snake, in this case) in the piriform cortex, as previously described (Stettler and Axel, 2004), show that the employed dual immunostaining / in situ hybridization protocol correctly evaluates activity related to two sequential exposures separated by a long period without stimulation.

(D) Snake and female mouse odors elicit opposing behavioral consequences in male mice, yet activate ensembles in the same VMHvl region. However, the distribution of cells activated in male mice by conspecific female odor (red fluorescence) is skewed

towards the ventral side, while activity triggered by snake odor (green fluorescence) is widespread in the VMHvl. See also Figure 6 for quantification of little overlap between the two ensembles, which is not different from that expected by chance.

(E) Quantification of the differences in location of activated cells in four arbitrary zones along the dorsal-ventral axis in the VMHvl represented in panel D. Mean $\pm$ s.e.m. * $p < 0.01$; ANOVA followed by Tukey-Kramer HSD post-hoc analysis (comparison between the numbers of c-Fos cells in each of 4 sectors along the dorsal-ventral axis for both odors). Note the separation between the positions of the centroids (median values marked as triangles) for the two distributions.

The white solid lines mark the clear boundaries for the VMH. Scale bars represent 100 μ m. d, dorsal; m, medial; 3V, third ventricle.

Figure S7. Related to Figure 7

(A) Comparison between the patterns of VMH activity towards various odors and the nature of each donating species (predators versus non-predators). Black dots represent the centroid of activated ensembles for stimuli, and red circles represent the global mean centroid for each compared type of stimulus (mean $\pm$ s.d.). Univariate beanplots in the middle represent the distribution of activated cells for each stimulus category.

(B) Same as in (A), but comparing mammalian and avian odors.

(C) Schematic diagram of the VMH, showing the centroids for the activated ensembles for pure stimuli (mean position along both axes $\pm$ s.d. of position along the main axis, in an arbitrary 0 to 100 scale). d, dorsal, m, medial. See Table S1 for details of pure stimuli and amounts used.

(D) Phylogenetic tree of V2R receptors, evidencing clustering into several clades. The figure focuses on A-type clades, following nomenclature used in Silvotti et al., 2007.

(E) Heat map showing V2R receptors in several clades expressed in VNO neurons activated after exposure to various heterospecific and conspecific stimuli. The number of receptors in each clade is given in the second column. Dark blue indicates co-expression of Egr1 and the tested clade in more than 10 cells per VNO section.

Intermediate blue hue indicates 3 to 10 co-labeled cells per section, lighter blue indicates 1 or 2 co-labeled cells per sections and white indicates absence of co-labeling.

Check also Isogai et al., 2011, for V2R receptors expressed in cells activated by other stimuli.

Table S1.

	Common species name	Scientific name	Presentation form	Collection method	Amount used	Reported behavior on mice
Crude stimuli	Domestic cat	<i>Felis catus</i>	Gauze scented with bodily secretions	Gauze rubbed against the neck and mouth regions	one 8-ply 5 x 5 inches gauze	Fear behavior (Dielenberg et al., 2001; Papes et al., 2010)
	Domestic cat	<i>Felis catus</i>	Bodily shedding	Shaved cat fur	1 g	Fear behavior (Papes et al., 2010 and this study)
	Leopard cat	<i>Leopardus pardalis</i>	Scented bedding	Bedding collected directly from devoted cage	50 ml	Fear behavior (this study)
	Cougar mountain lion	<i>Puma concolor</i>	Scented bedding	Bedding collected directly from devoted cage	50 ml	Fear behavior (this study)
	African lion	<i>Panthera leo</i>	Scented bedding	Bedding collected directly from devoted cage	50 ml	Fear behavior (this study)
	Rat	<i>Rattus norvegicus</i> (Sprague-Dawley strain)	Scented bedding	Bedding collected directly from devoted cage	50 ml	Fear behavior (this study)
	Rat	<i>Rattus norvegicus</i> (Sprague-Dawley strain)	Gauze scented with bodily secretions	Gauze scented with liquid urine (1ml, unless otherwise noted)	one 8-ply 5 x 5 inches gauze	Fear behavior (Papes et al., 2010; this study)
	Great horned owl	<i>Bubo virginianus</i>	Bodily shedding	Feathers taken from cage	1 g	Fear behavior (this study)
	Crested caracara hawk	<i>Polyborus plancus</i>	Bodily shedding	Feathers taken from cage	1 g	Fear behavior (this study)

	Cornsnake	<i>Pantheroph is guttatus</i>	Bodily shedding	Shed skin	1 g	Fear behavior (Papes et al., 2010; this study)
	Jararaca snake	<i>Bothrops jararaca</i>	Bodily shedding	Shed skin	1 g	Fear behavior (this study)
	Jararacussu snake	<i>Bothrops jararacussu</i>	Bodily shedding	Shed skin	1 g	Fear behavior (this study)
	Tarantula spider	<i>Theraphosi dae</i> family	Scented bedding	Bedding from devoted cage	50 ml	Fear behavior (this study)
	Domestic rabbit	<i>Orictolagus cuniculus</i>	Gauze scented with bodily secretions	Gauze scented with liquid urine (1ml)	one 8-ply 5 x 5 inches gauze	No behavior on mice
	Mouse	<i>Mus musculus</i>	Scented bedding (male, unless otherwise noted)	Bedding collected directly from devoted cage	50 ml	
Pure stimuli	Cat	<i>Felis catus</i>	Purified stimulus (cat Mup = Feld4)	Gauze scented with purified stimulus	10 mg	Fear behavior (Papes et al., 2010; this study)
	Rat	<i>Rattus norvegicus</i>	Purified stimulus (rat Mup13)	Gauze scented with purified stimulus	10 mg	Fear behavior (Papes et al., 2010; this study)
	Mouse	<i>Mus musculus</i>	Purified stimulus (mouse Mup24)	Gauze scented with purified stimulus	10 mg	Aggression (Chamero et al., 2007)
	Mouse	<i>Mus musculus</i>	Purified stimulus (mouse Mups 24+8+3+25)	Gauze scented with purified stimulus	10 mg total (equal amounts)	

Table S2 is provided as a separate Excel file.

Supplemental Table legends:

Table S1. List of olfactory stimuli used

Details for each heterospecific or conspecific stimulus used, including donating species information (common and scientific names), presentation forms (on gauze, as scented bedding or bodily sheddings), method of collection, amount used and type of behavior reported on mice.

Table S2. c-Fos cell counts in the brain of animals exposed to various stimuli

Each table cell represents the numbers of c-Fos-positive nuclei (mean $\pm$ s.e.m.) in TrpC2^{+/+} or TrpC2^{-/-} littermates exposed to each stimulus indicated on the top row ('odor') or to respective control odors ('ctrl'). The type of stimulus and respective olfactory controls are given in the last two rows for each stimulus. Abbreviations for each brain region follow those used in the Paxinos brain atlas (Paxinos and Franklin, 2004) and are the same used in the Figures and main text. On the rightmost part of each row, it is given the meanings of colors presented in heat maps in Figures 1 and 2 (numbers of c-Fos positive cells per unit area in each region). White color always corresponds to activity level observed in animals exposed to control odors. Scale of colors in each area was arbitrarily chosen to make the amplitude of the variance in c-Fos counts across stimuli evident.

Supplemental Video

Video S1. Schematic representation of dual c-Fos immunostaining / in situ hybridization.

The first segment shows the stimulation protocol and the image of a cell in the VMH where c-Fos protein is expressed in the nucleus (green), representing activation during the first olfactory stimulation period (with snake odors, in this case).

The second segment shows the stimulation protocol and a z-series across the VMH depicting a cell where immature c-Fos mRNA is detected by fluorescent in situ hybridization in two nuclear foci, related to the second, most recent, exposure period (red). The z-series is followed by its 2D reconstruction.

The third segment shows the stimulation protocol and a z-series across the VMH depicting a cell where both c-Fos protein and mRNA are detected by fluorescent in situ hybridization in the nucleus, related to the the first and second stimulations, respectively (green and red). The z-series is followed by its 2D reconstruction at the end.

Supplemental Experimental Procedures

Mice

Animals were eight-weeks-old male mice, unless otherwise noted. TrpC2^{+/+} and TrpC2^{-/-} littermates were obtained from heterozygous mating couples, which were produced by backcrossing the TrpC2^{-/-} knockout line (Stowers et al., 2002) into the C57Bl6/J background for at least 10 generations. To ensure the identification of instinctive

behaviors, animals had no previous exposure to odors from other animal species, and subjects exposed to conspecific chemosignals were kept individually caged for at least 4 days. All subjects were exposed to odor, monitored for behavior, and subsequently processed for immunostaining or in situ hybridization, ensuring that the cellular responses and behaviors were analyzed from the same individuals and no animals were re-used for behavioral analysis. All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee.

Stimuli

In principle, olfactory stimuli should ideally be presented in the same form and amount, such as equal volumes of scented bedding. However, because home cage bedding may contain noxious compounds from feces or urine, we decided to use gauze scented with bodily secretions (urine, skin secretions) or bodily sheddings (feathers, fur, skin) whenever possible. Table S1 presents a complete list of stimuli and collection methods. Cat-scented gauze was obtained by rubbing a medical gauze against the fur of a domestic cat, particularly around the neck region, which is constantly licked by the subject (see also Papes et al., 2010). Shaved cat fur (1g) was also used in some experiments. Fifty milliliters of scented bedding (fine wood chips) were used for leopard cat, mountain lion, african lion, tarantula spider, rat, and male and female mice. Alternatively, rat urine was used in some experiments by placing 1 ml of urine on pieces of medical gauze. For all stimuli deposited on gauzes, the gauze was unscented in a dessicator under vaccum overnight before adding the stimulus. For each snake species, we used 1 g of stimulus (around four 5x5 cm pieces) of shed skin. Avian predator stimuli

(hawk and owl) were 1g of feathers, cut in small pieces. All stimuli (solid or liquid deposited on gauze) were attached to 'binder clips' to visually confirm their position and prevent the spreading of stimuli in the cage. Control mice were exposed to unscented control odors, as indicated in Table S2. For Mup protein or ESP peptide exposures, gauze was scented with 10 mg of recombinant protein (as fusion with maltose-binding protein, MBP), and gauze scented with MBP alone was used as control.

Recombinant Mup protein and ESP peptide expression

The cDNA for rat major urinary protein, Mup13 (Logan et al, 2008), was amplified by PCR from a Sprague Dawley liver sample using oligonucleotides 5' ATCGGATCCCATGCAGAAGAAGCTAGTTCCACAAGAG 3' and 5' ATCAAGCTTTCATCCTCGGGCCTGGAGACAG 3'. The amplicon was cloned into pMAL-c2x bacterial expression vector (New England Biolabs) into *Bam*HI and *Eco*RI restriction sites, and expressed as a fusion protein with Maltose Binding Protein, following the manufacturer's recommendations. Protein was eluted from an amylose affinity resin using maltose and then exchanged into 1x PBS using a YM10 column prior to exposures. Recombinant MBP was used as a control. The same procedure was applied for production of the recombinant cat Mup, except that the corresponding cDNA was synthesized *in vitro* based on the published sequence of Fel-d-4 (cat Mup; Genbank accession number NM_001009233) (Smith et al., 2004), and for the mouse Mups (nomenclature following Logan et al., 2008). The ESP1 peptide expression vector, gently provided by Dr. Stephen Liberles, is based on pMAL-c5x (Haga et al., 2010) and bacterial expression followed the same protocol described above.

Behavioral assays

For defensive avoidance behavior, individually caged mice were habituated for 2 days in the dark in the procedure room and assayed on day 3. The amounts used for each stimulus are indicated in Table S1. In all cases, the animal was placed in the procedure room on day 3 and the stimulus was deposited on the side opposite to the air inlet. Mice were exposed and filmed for 30 min in the dark. Movies were scored blindly for avoidance time, following previously published protocol (Papes et al., 2010). Avoidance behavior was defined as the amount of time animals spent more than 20 cm away from the stimulus. To compare avoidance times where needed, ANOVA was applied, followed by Tukey-Kramer Honest Significantly Different post-hoc analysis. For aggressive behavior assays, C57Bl6/J male mice (8–12 weeks old) were isolated for one week and then exposed to castrated adult mice swabbed with 40 µl of test solution (male mouse urine or equivalent amounts of rat and rabbit urine) for 10 min in their home cages. Tests were videotaped and analyzed to measure total duration of aggressive contact consisting of biting, wrestling and kicking. One round of urine and no-urine controls were performed with each resident mouse before and after sample testing. For reproductive behavior assay, the resident was a male mouse, prepared the same way as in the aggressive behavior assays. Subjects were exposed to eight-weeks old sexually naive, receptive females, or to receptive females that had been previously anesthetized and odorized with snake skin odors, or to snake skin itself wrapped around a mouse-shaped unscented toy. Each assay ran for 15 min and the filmed behaviors were scored for mounting time.

c-Fos immunostaining

For brain activity analyses, the expression of the surrogate marker of neuronal activity c-Fos was assayed by immunostaining. Each animal was individually caged and habituated to the procedure room where the exposures were conducted for 2h on two consecutive days, in the dark. On the third day, each cage was brought to the procedure room and the stimulus was introduced in the animal's home cage on the side opposite to the air inlet. Each animal was exposed for 30 minutes, at which time the stimulus was removed from the cage; the subject remained in the dark without further stimulation for an additional period of 60 min, after which it was quickly euthanized and dissected to remove the brain. Brains were fixed overnight in 4% paraformaldehyde, equilibrated in 20% sucrose/1X PBS and sectioned on a Leica 1000S vibrating-blade microtome. Fifty micrometer coronal sections were collected for the entire brain, and suitable sections were chosen for subsequent c-Fos immunostaining based on comparisons to a reference brain atlas (Paxinos and Franklin, 2004). Sections were blocked as free-floating sections for 1 hr with 1% blocking reagent (Invitrogen), pre-incubated in 1% BSA/1x PBS/0.3% Triton X-100, followed by incubation with the anti-c-Fos primary antibody (rabbit polyclonal; Ab5; Millipore) diluted 1:1500 in 1% BSA/1x PBS/0.3% Triton X-100 for 36 hr at 4°C under gentle agitation. Sections were washed three times in 1xPBS/0.1% Triton X-100, 15 min each, and incubated for 3 hr at room temperature with Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Invitrogen) diluted 1:500 in 1% BSA/1x PBS/0.3% Triton X-100. After two washes in 1x PBS/0.1% Triton X-100, 15 min each, sections were counterstained with To-Pro-3 nuclear stain

(Invitrogen) diluted 1:1000 in 1x PBS, washed twice in 1x PBS, 15 min each, and mounted onto glass microscope slides with ProLong Gold (Invitrogen). Dry mounted sections were imaged on a Leica TCS SP5 confocal fluorescence microscope. The number of c-Fos positive nuclei was counted blindly for each individual. After image acquisition, the nuclear stain channel was computationally false-colored as purple, to facilitate contrast with the green fluorescence channel (c-Fos).

Positioning of cFos positive cells on a reference VMH outline

For each animal analyzed, the clear boundaries of the VMH were recognized by nuclear staining and demarcated with an elliptical outline. The long and short axes of the outline were delineated to divide the ellipse into four quadrants. The coordinates of each cFos positive nucleus in the section were calculated as a percentage of the total length along both the long (dorsomedial-ventrolateral) and short (dorsolateral-ventromedial) VMH axes, taking the center of the ellipse as a reference point. Each cell was then positioned on a reference VMH elliptical reference outline using these parameters, and the longer dorsomedial-ventrolateral axis received arbitrary units from 0 (ventrolateral side) to 100 (dorsomedial side).

RNA probe design and validation

For the design of cRNA probes to V2R vomeronasal receptors, we investigated whether different receptor genes harbor specific regions anywhere in the coding or non-coding regions. However, nucleotide and protein similarities among the members of each clade were found to be very high (>80%), though members from different clades usually share

less than 70% nucleotide sequence identity. These similarity levels are constant throughout the entire gene sequence, including exons, introns and untranslated regions. Contrary to previously published data (Isogai et al., 2011), one could not obtain probes that permit discrimination between cells expressing different receptors in the same clade, even under highly stringent hybridization conditions. For each clade, we chose probes based on one or two receptors, and each probe exhibits 80% minimum nucleotide similarity with other receptor member in the same clade, but 72% maximum allowed similarity with receptors in other clades. The rate of co-labeling of cells with two differently labeled probes in the same clade was high in prior validation experiments (usually >90% concordance). Each cRNA probe was produced with rNTPs labeled with haptens DNP (Egr1) and/or DIG (V2R) (Roche) from a 1kb suitable fragment cloned into pGEM-T-Easy vector (Promega), using SP6 or T7 RNA polymerases (Roche). VNO neurons in the basal zone co-express receptors in the V2R A/B/D families plus one receptor in the V2R C family (Silvotti et al., 2007). Since C family members are widely expressed in these neurons, we did not include probes for them in our investigation of the molecular identity of neurons activated by each olfactory stimulus.

RNA *in situ* hybridization

Slides containing 16µm cryostat coronal VNO sections were air-dried for 10 minutes, followed by fixation with 4% paraformaldehyde for 20 minutes, and treatment with 0.1M HCl for 10 min, with 0.1% H₂O₂ for 30 min and with 250mL of 0.1M triethanolamine (pH 8.0) containing 1mL of acetic anhydride for 10 min, with gentle stirring. Slides were always washed twice in 1x PBS between incubations. Hybridization was then performed

with DNP (1µg/mL) or DIG (600ng/mL) labeled cRNA probes at 58°C in hybridization solution (50% formamide, 10% dextran sulfate, 600mM NaCl, 200µg/ml yeast's tRNA, 0.25%SDS, 10mM Tris-Hcl pH8,0, 1X Denhardt's solution, 1mM EDTA pH 8,0) for 16h. Slides were washed once in 2x SSC, once in 0.2x SSC and once in 0.1x SSC at 60°C (30min, 20min and 20min, respectively), followed by a quick incubation in 0.1x SSC at room temperature. Slides were then permeabilized in 1x PBS, 0.1% Tween-20 for 10 min, and washed twice in TN buffer (100mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl) for 5 min at room temperature, followed by blocking in TNB buffer (100mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.05% blocking reagent (Perkin Elmer)), and incubation overnight at 4°C with rabbit anti-DNP (Invitrogen) primary antibody diluted 1:600 in TNB buffer. Signal development proceeded with the tyramide signal amplification kit (Perkin Elmer), following the manufacturer's instructions. Briefly, slides were incubated in tyramide-biotin (1:50 in amplification diluent with 0.0015% H₂O₂ (Perkin Elmer)) for 15 min, followed by incubation in streptavidin-HRP (1:100 in TNB) for 1h, followed by incubation in tyramide-Alexa 546 (1:100 in amplification diluent with 0.0015% H₂O₂ (Life technologies)) for 15min. Prior to each incubation, slides were washed 6 times with TNT buffer for 5 min under mild agitation. Sections were then treated with 3% H₂O₂ in 1x PBS for 1h to block peroxidases from the first signal development. Slides were then blocked in TNB for 90 min, followed by incubation overnight at 4°C with anti-DIG-POD (Roche) diluted in TNB (1:400). Signal development for DIG probe was performed using tyramide signal amplification kit (Perkin Elmer) and tyramide-Alexa488 dye. Samples were counter-stained with To-Pro 3 nuclear stain (Invitrogen) diluted 1:1000 in 1x PBS,

washed twice in 1x PBS and mounted with ProLong Gold (Invitrogen). Dry mounted sections were imaged on a Leica TCS SP5 confocal fluorescence microscope.

Dual immunostaining / in situ hybridization

Animals were individually caged in Cage #1 and habituated in the dark for 90 minutes per day on the previous 2 days before the exposure. The habituation protocol guarantees that the animals are exposed to olfactory stimuli in a context relevant to the generation of behaviors. On the exposure day, half of the soiled bedding from the animal's cage was transferred to another cage (Cage #2). The first exposure to olfactory stimulus was performed in Cage #1 for 20 min, and the animals were then transferred to Cage #2 for 60 min without olfactory stimulation. They were then transferred back to Cage #1 for a second period of olfactory stimulation for 20 min (same or different stimulus). All of these steps were conducted in the dark. At the end of the exposures, animals were anesthetized with ketamine/xylazine, and quickly perfused with 4% paraformaldehyde fixative. Brains were further fixed overnight with RNase-free fixative and equilibrated in RNase-free 20% sucrose. Fourty micrometer sections were collected on a VT100S vibratome (Leica) in 1x PBS-DEPC. Chosen sections encompassing the MeA and VMH were subjected to a new method for the combined detection of *c-Fos* mRNA and protein. *Pre-treatment of sections and probe hybridization:* Free-floating sections were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min, permeabilized in 0.2 M HCl / H₂O-DEPC for 10 min, incubated in 0.1% H₂O₂ / 1x PBS-DEPC to inactivate endogenous peroxidase for 30 min and acetylated in 0.1 M Triethanolamine-HCl pH 8.0 with acetic anhydride for 10 min. Sections were then incubated in hybridization solution

containing 400 ng/mL of each of two 1kb digoxigenin-labeled cRNA probes in a 5x SSC humidified chamber for 16h, at 58-60°C. Probes correspond to two fragments of the c-Fos mRNA (fragments were obtained by reverse transcription-PCR using the following oligonucleotides: Probe 1: 5' CAGCGAGCAACTGAGAAGAC 3' and 5' GCTGCATAGAAGGAACCGGAC 3'; Probe 2: 5' GGAGCCAGTCAAGAGCATCAG 3' and 5' AATGAACATTGACGCTGAAGGAC 3'). Hyb solution also contained 50% deionized formamide, 600 mM NaCl, 200 µg/mL yeast tRNA, 0.25% SDS, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1x Denhardt's solution, 1mM EDTA pH 8.0 and 10% dextran sulfate.

Washes and antibody incubation: Sections were washed in 2x, 0,2x and 0,1x SSC solutions (20 min each), permeabilized in 0.1% Tween 20/ 1x PBS and blocked in 100 mM Tris-Cl/ 150 mM NaCl/ 0.5% Blocking Reagent (Perkin Elmer). Next, sections were incubated with alkaline phosphatase-conjugated anti-digoxigenin antibody (Roche; 1:400) for 2 nights, at 4°C.

Signal amplification and immunostaining: Sections were incubated in tyramide-biotin (Perkin Elmer; 1:50) in amplification diluent containing 0,0015% H₂O₂, then incubated with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (Perkin Elmer; 1:100) in 100 mM Tris-Cl/ 150 mM NaCl/ 0.5% Blocking Reagent, and finally incubated in Alexa Fluor 546-tyramide (Invitrogen; 1:100) in amplification diluent containing 0,0015% H₂O₂. Peroxidase from the first signal was inactivated by treatment with 3% hydrogen peroxide for 30 min and 0.1 HCl for 10 min, prior to blocking and anti-c-Fos primary antibody (Ab5; Millipore) incubation in regular c-Fos immunostaining as detailed before. Nuclear counterstaining was performed with TO-PRO-3 (Invitrogen; 1:1000) and sections were mounted on glass slides with liquid mountant ProLong®

Gold Antifade Reagent (Invitrogen) and imaged on a Leica TCS SPE5 confocal microscope.

Since time elapsing between the two episodes of stimulation is sufficiently long in our protocol, c-Fos mRNA is indicative of activation during the last exposure, because virtually no mRNA derived from the first exposure remains (Figures S4A, S4B for the MeA, and S6A for the VMH). Conversely, the c-Fos protein is indicative of the first exposure, because not enough time transpired after the second exposure onset to allow c-Fos protein to be synthesized at high levels (Figures S4C and S4D for the MeA, and S6B for the VMH). This strategy enabled us to parse out the activation profiles derived from both stimulations with great precision.

This method was based on the catFISH procedure (Guzowski *et al.*, 1999; Guzowski *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2011). However, our method enables better resolution in the assignment of brain activity resulting from each of two consecutive olfactory stimulations, because the two exposure episodes are separated by a longer time period (1h). Moreover, because the *c-Fos* gene encodes a transcription factor, the co-detection of its mRNA and protein inside the same subcellular compartment (nucleus) makes it unequivocal to determine if the cell produced mRNA, protein or both.

Statistical analyses

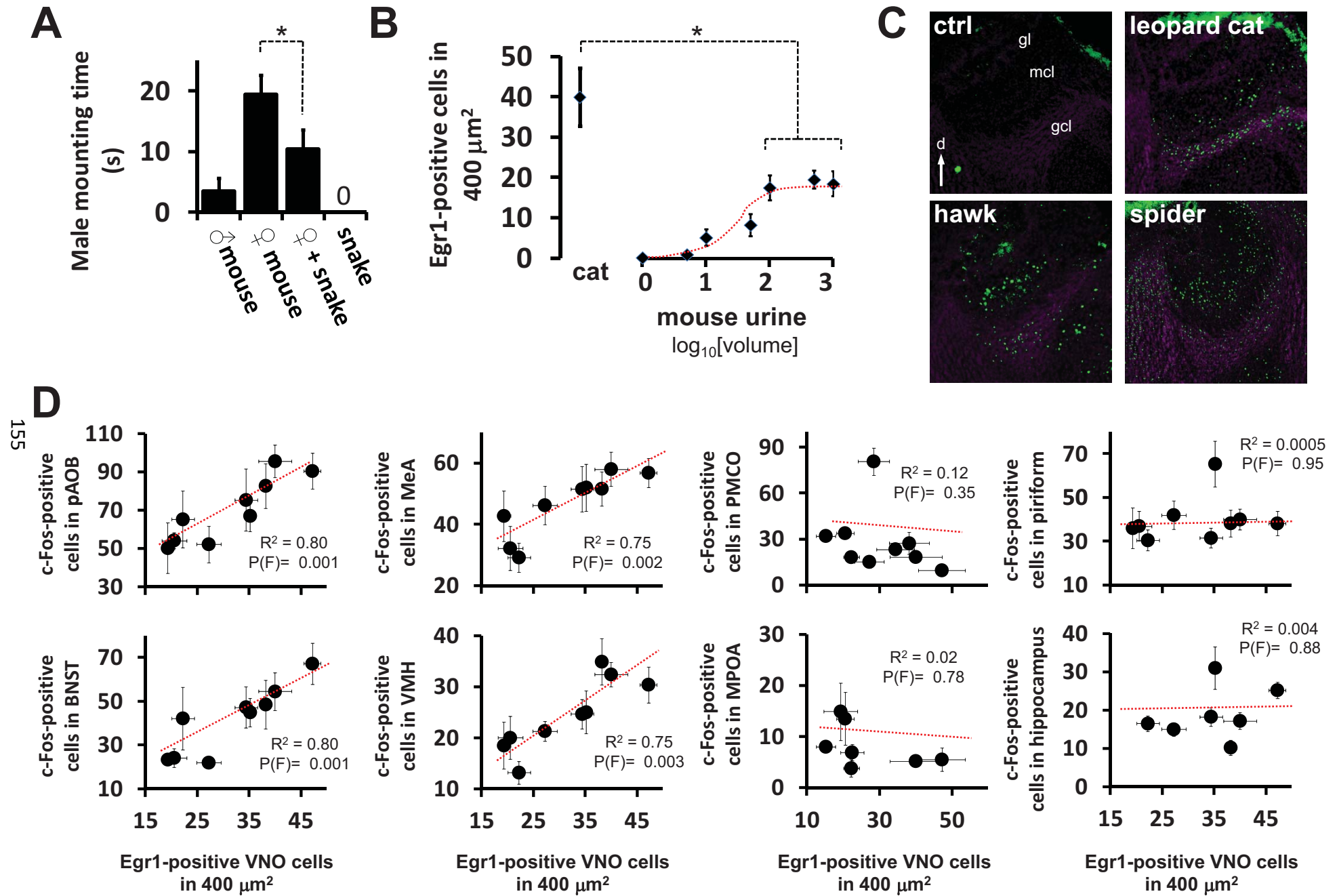
Statistical analyses were performed using R and Stat packages, and XLSTAT add-on in Excel. For comparing mean behavioral output measurements and numbers of c-Fos positive cells in each brain region, we applied one-way Analysis of Variance (ANOVA), followed by Tukey-Kramer HSD post-hoc analysis. In Figures 7 and S7, error bars in

black dots denote standard deviation to indicate the variance in the position of activated cells along the long VMH axis for each stimulus. Red dots in the same figures are mean ($\pm$ standard deviation) for the position of all cells in each compared category (for example, predator versus non-predator odors). To compare red dot means in two groups, we applied unpaired two-sample Welch's t-test assuming unequal variances, and the P values indicate the probability that the null hypothesis (means are equal) is true. For evaluating the contribution of several parameters in the distribution of activity in the VMH, we applied Multivariate ANOVA (MANOVA) to calculate correlation indices between the position of the active ensemble in animals exposed to each odor (in a 0 to 100 arbitrary scale along the long VMH axis) and several variables (predator versus non-predator, heterospecific versus conspecific, type of V2R receptor expressed in activated VNO neurons and taxonomic group). For visually comparing distributions of active cells in the VMH for two stimulus groups in Figures 7 and S7, we used univariate beanplots (Kampstra et al., 2008) with data collected from all animals in each group in scale categories ranging from 0 to 100 (in 0.5 intervals) along the main VMH axis. Comparisons between these distributions were performed with the Kolmogorov-Smirnov distribution comparison test (KS test), applied on cumulative ranks for the intervals mentioned above. In this case, P values indicate the probability that the null hypothesis (the distributions are equal or were drawn from like populations) is true. P values greater than 0.05 led to rejection of the null hypothesis in all tests.

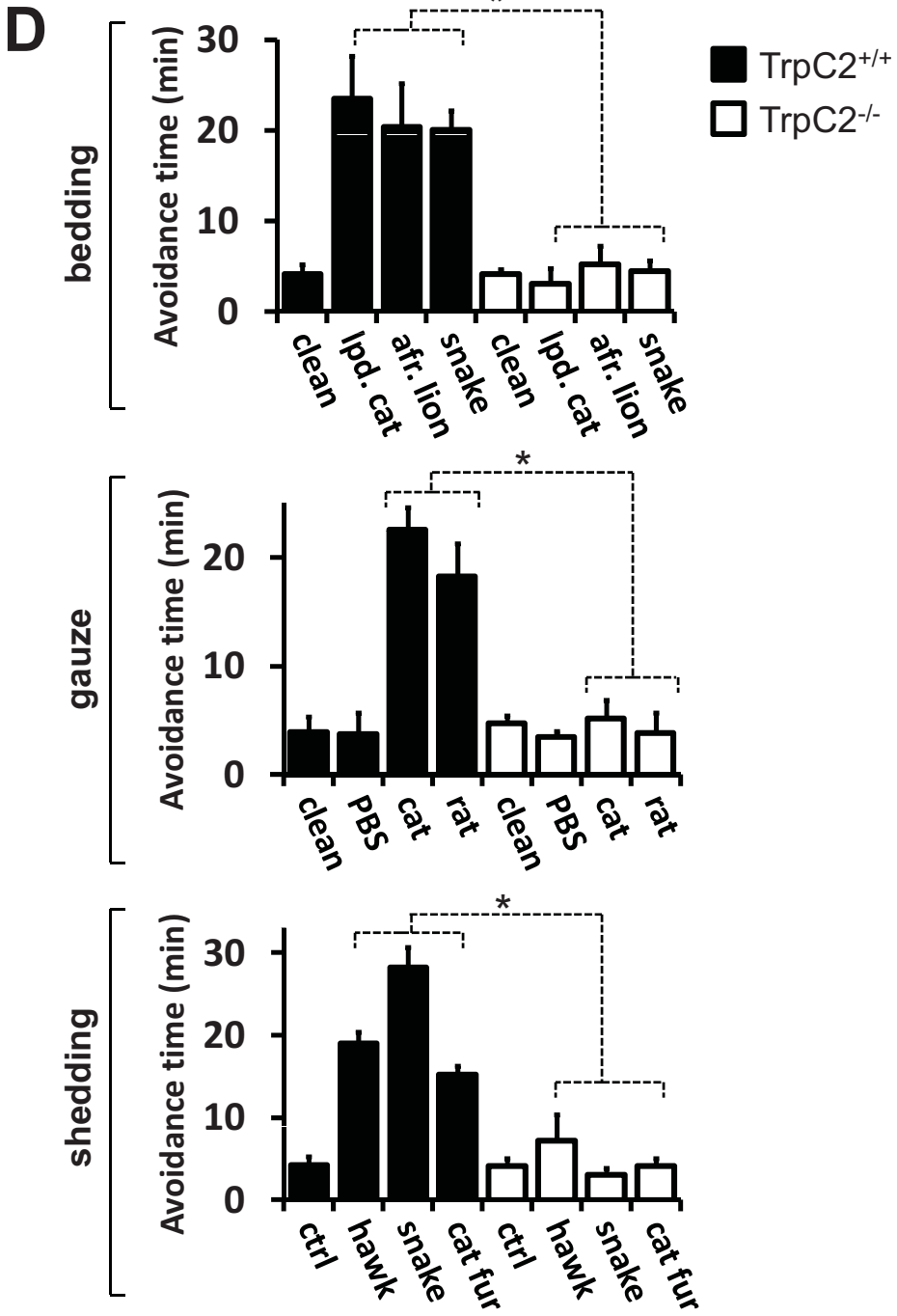
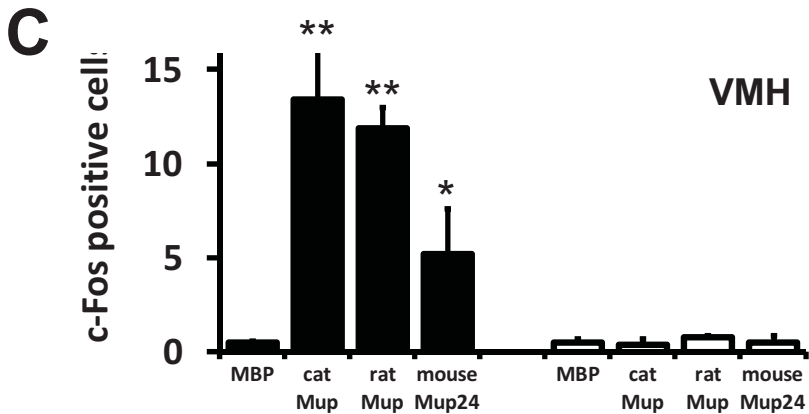
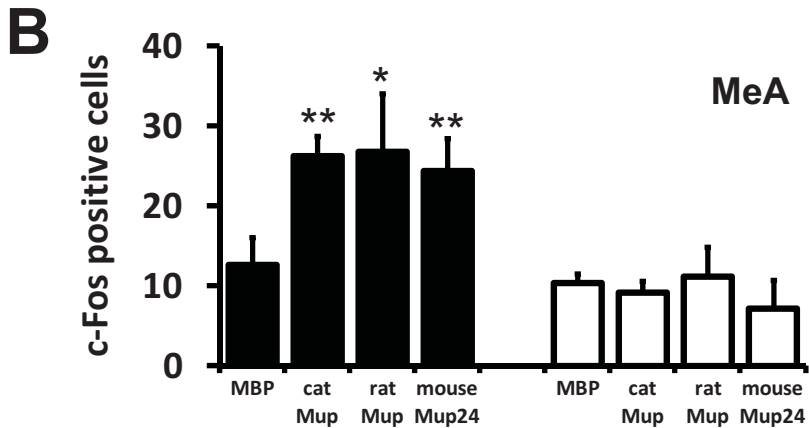
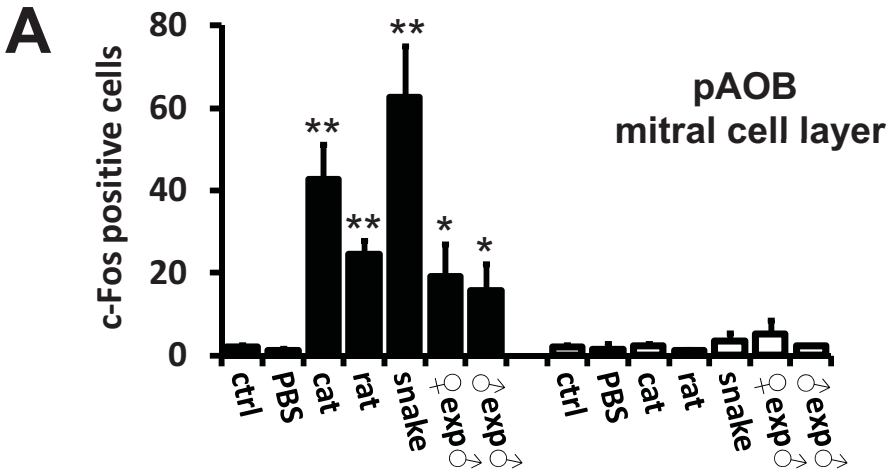
Supplemental References

- Guzowski, J. F., McNaughton, B. L., Barnes, C. A. and Worley, P. F. (2001) Imaging neural activity with temporal and cellular resolution using FISH. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 579–584.
- Guzowski, J. F., McNaughton, B. L., Barnes, C. A. and Worley, P. F. (1999) Environment specific expression of the immediate-early gene *Arc* in hippocampal neuronal ensembles. *Nature Neurosci.* 2, 1120–1124.
- Kampstra, P. (2008) Beanplot: a boxplot alternative for visual comparison of distributions. *J. Stat. Soft.* 28: code snippet 1.
- Logan, D.W., Marton, T.F., and Stowers, L. (2008) Species specificity in major urinary proteins by parallel evolution. *PLoS ONE* 3:e3280.
- Paxinos, G., and Franklin, K.B.J. (2004) *The mouse brain in stereotaxic coordinates.* Elsevier, USA.
- Silvotti, L., Moiani, A., Gatti, R., and Tirindelli, R. (2007) Combinatorial co-expression of pheromone receptors, V2Rs. *J. Neurochem.* 103, 1753-1763.
- Smith, W., Butler, A.J., Hazell, L.A., Chapman, M.D., Pomés, A., Nickels, D.G., and Thomas, W.R. (2004) Fel d 4, a cat lipocalin allergen. *Clin Exp Allergy* 34, 1732-1738.

Carvalho et al., Figure S1



Carvalho et al., Figure S2

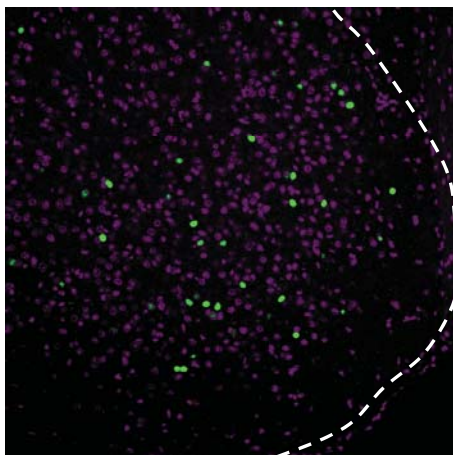
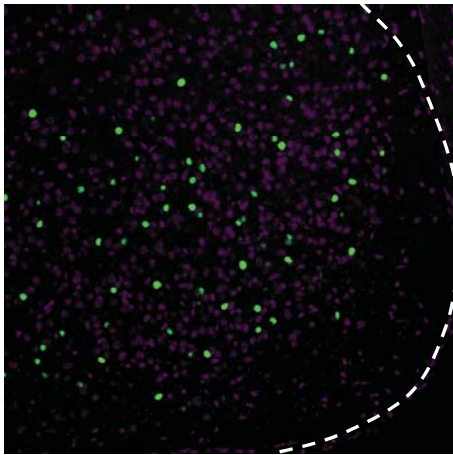
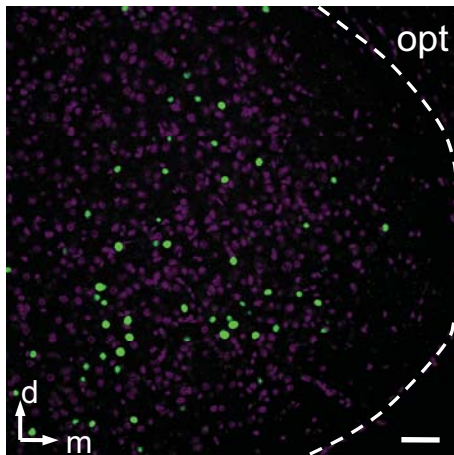


A cat odor

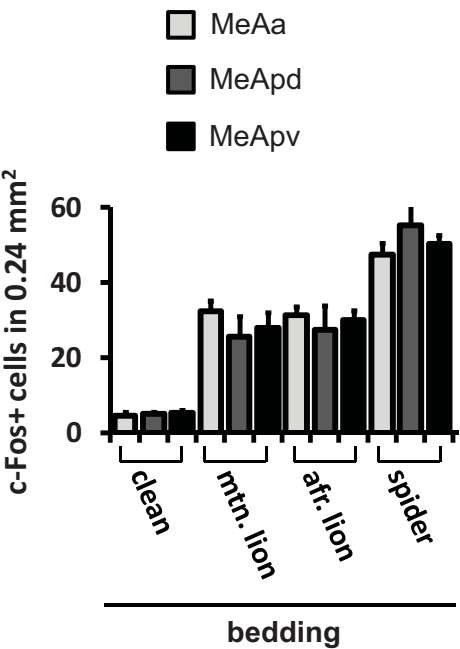
anterior MeA (MeAa)
(bregma = -1.15 mm)

(bregma = -1.46 mm)

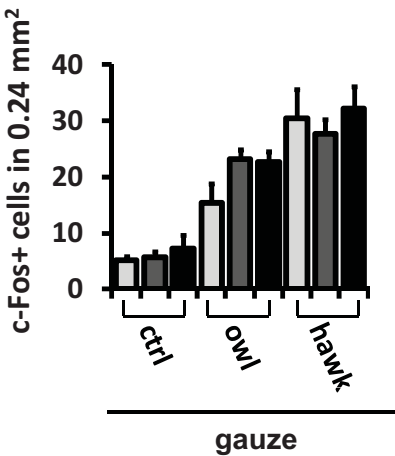
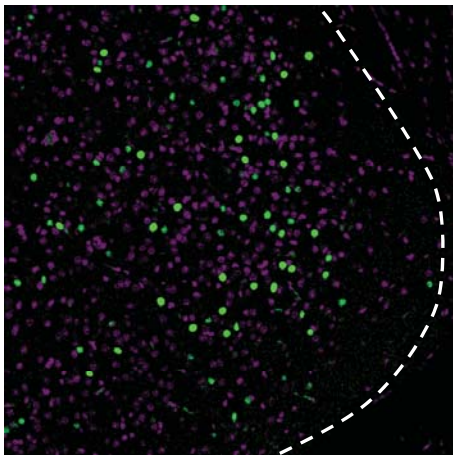
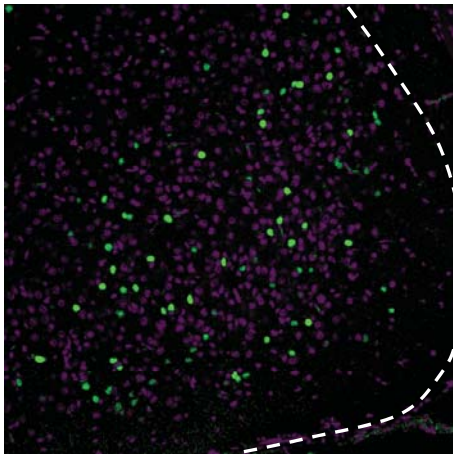
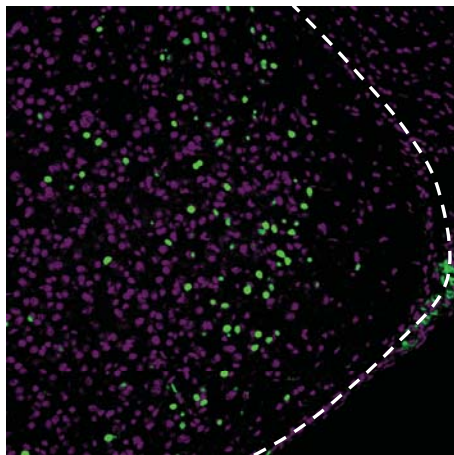
posterior MeA (MeAp)
(bregma = -1.70 mm)



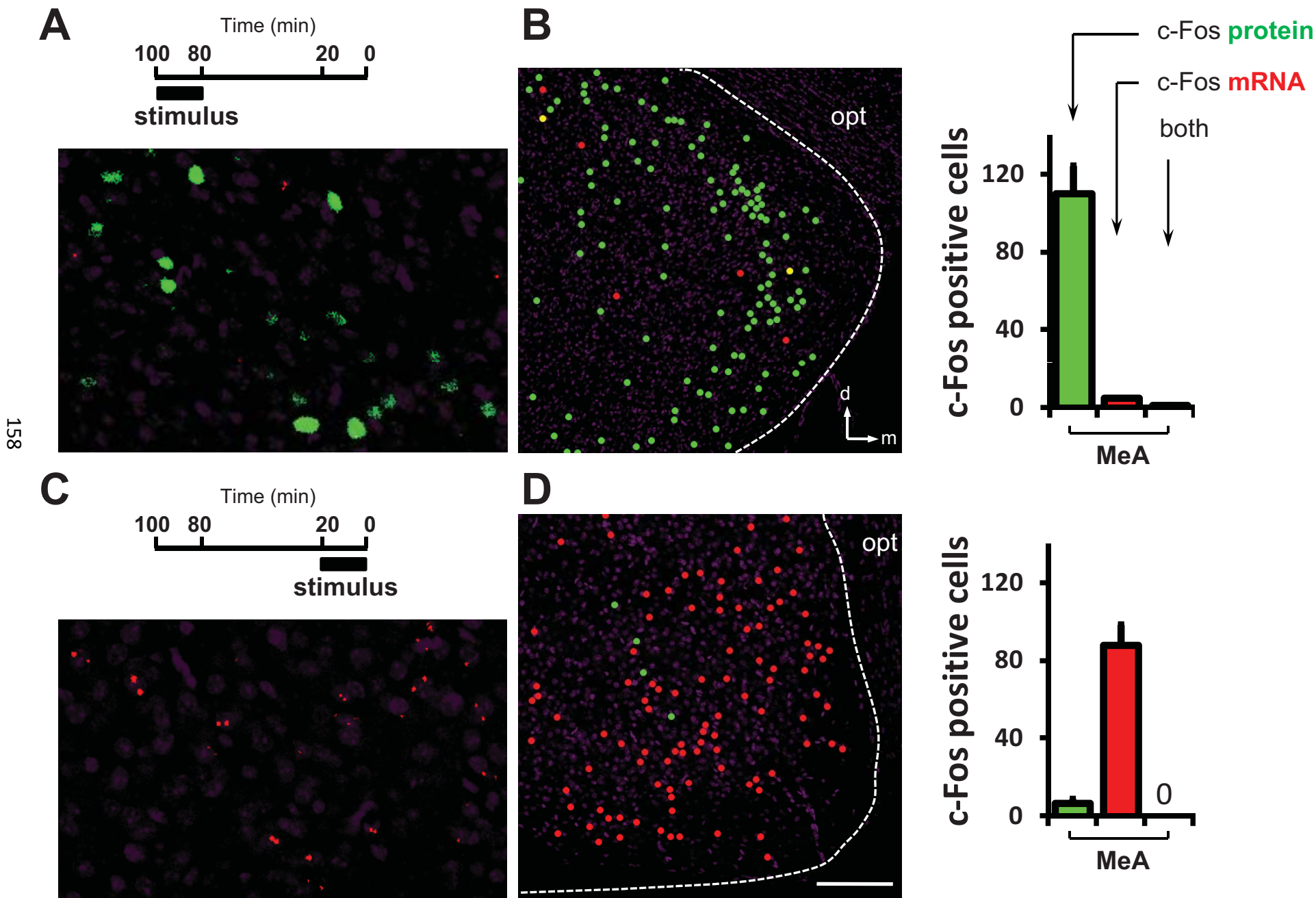
C



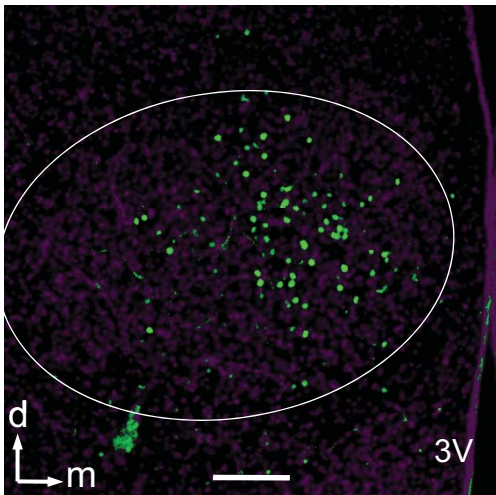
B snake odor



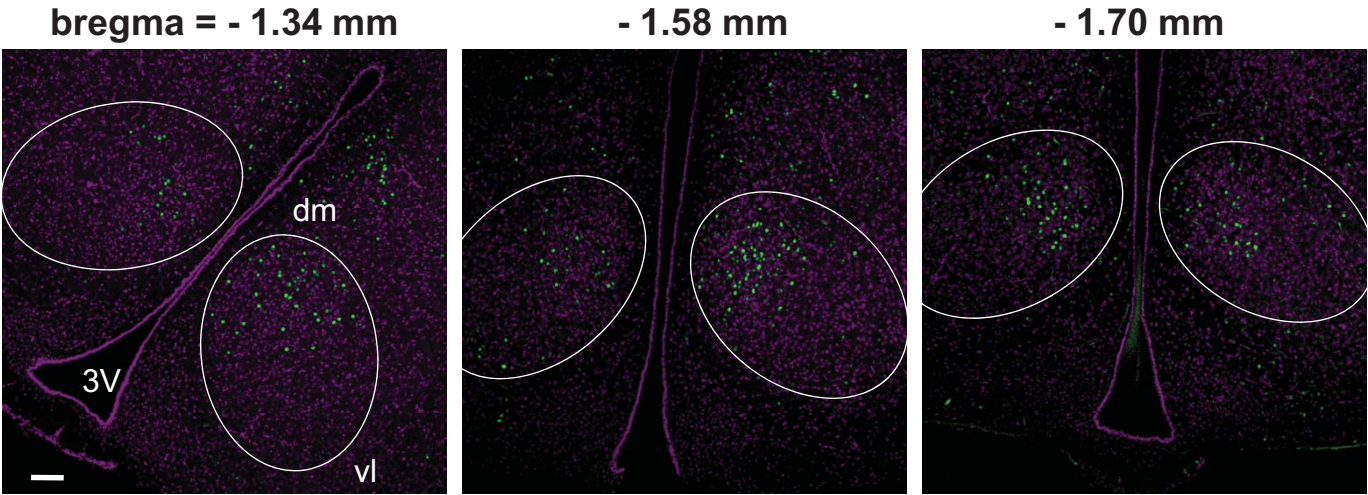
Carvalho et al., Figure S4



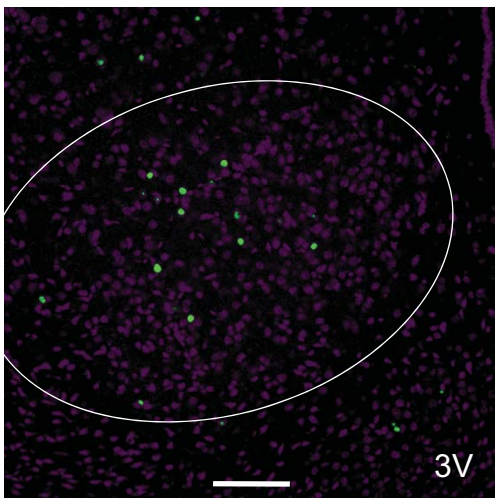
A african lion



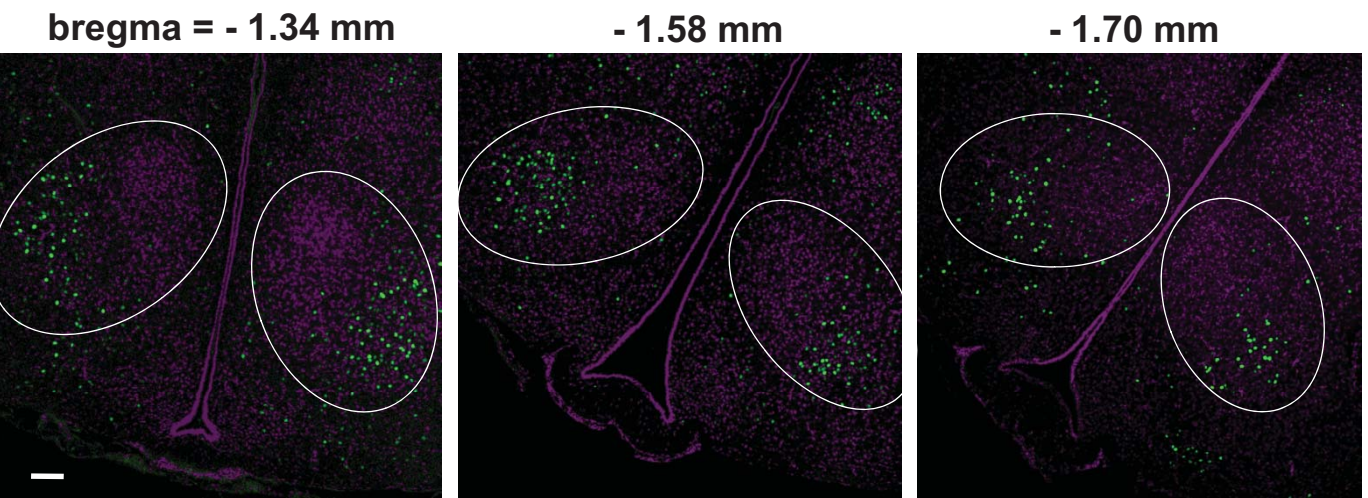
C cat odor



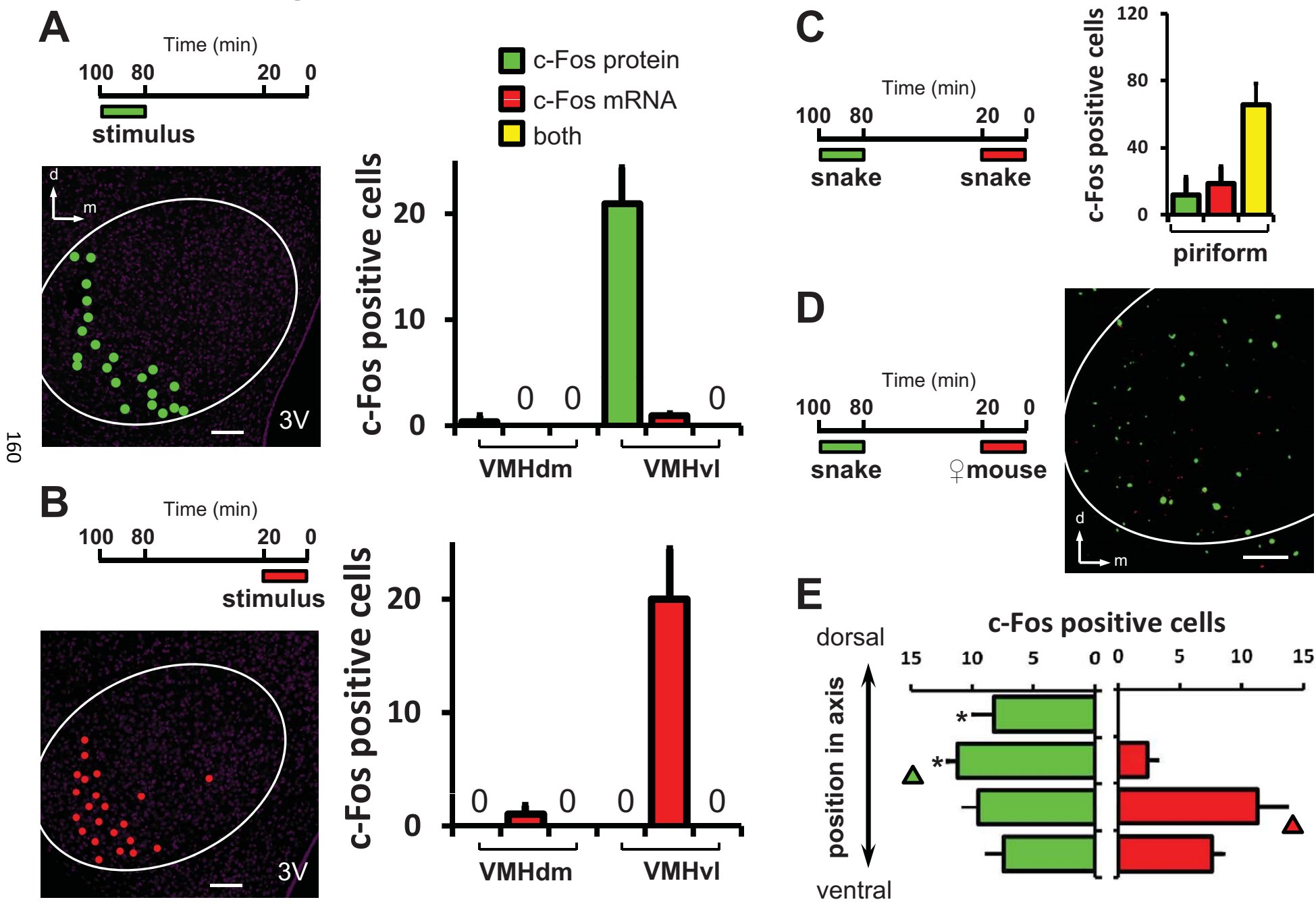
B rat Mup

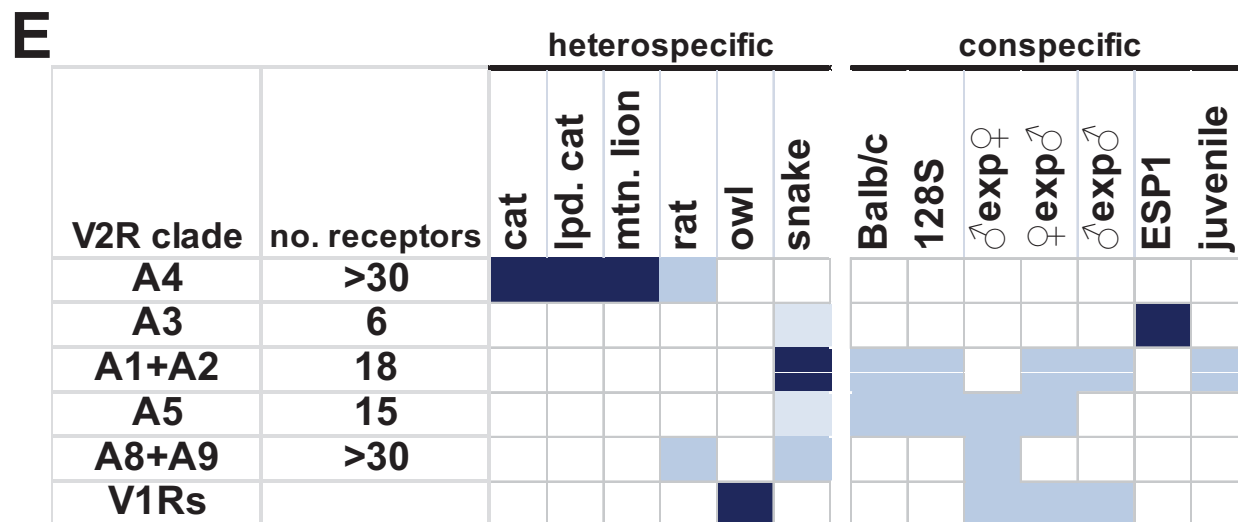
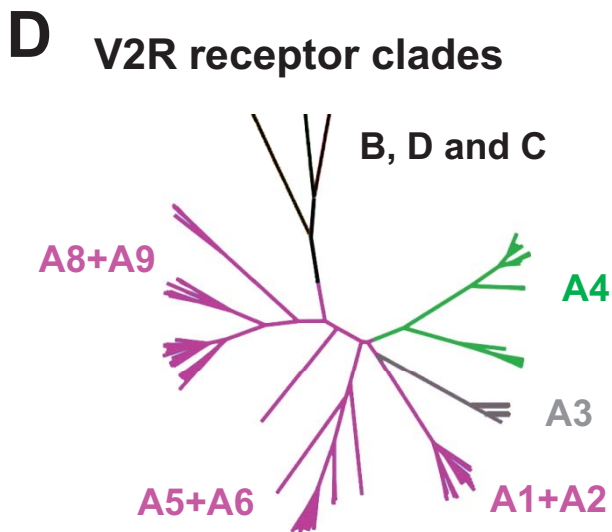


D snake odor



Carvalho et al., Figure S6





11.2 Documentação da Comissão de Ética no Uso de Animais

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEAA/Unicamp**

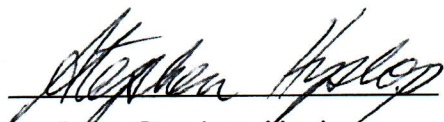
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1883-1**, sobre "**Estudo molecular do sistema olfativo em mamífero**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Fábio Papes**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEAA/Unicamp em **1º. de junho de 2009**.

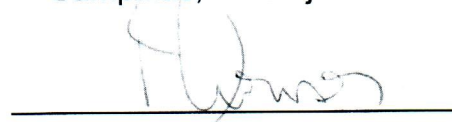
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1883-1**, entitled "**Molecular studies of the olfactory system in mammals**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **June 1, 2009**.

Campinas, 1º. de junho de 2009.



Prof. Dr. Stephen Hyslop
Presidente em exercício



Fátima Alonso
Secretária Executiva



UNICAMP



536/2012



DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o projeto CIBio/IB-2009/II-03 (NB-2), intitulado "Estudo Molecular dos Sistemas Olfativos em Mamíferos", cujo pesquisador responsável é o Prof. Dr. FÁBIO PAPES, encontra-se devidamente aprovado e regularizado junto a CIBio/IB-UNICAMP e a CTNBio, conforme legislação vigente.

Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
24 de janeiro de 2012.

Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI
Presidente da CIBio
Instituto de Biologia - UNICAMP

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "Caracterização molecular e funcional de receptores da classe OR expressos no Órgão Vomeronasal de mamíferos":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

(X) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. IB-2009/II-03 Instituição: Unicamp.

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 1883-1(A), Instituição: Unicamp.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



Aluno: Thiago Seike Nakahara

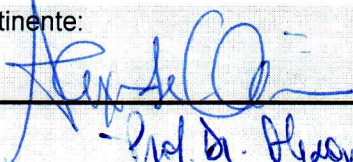


Orientador: Fabio Papes

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



Prof. Dr. Alexandre L.R. Oliveira
Presidente CEUA UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



Prof. Dr. MARCELO LANCELOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP

