

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



LEONARDO MINETE CARDOZO

**IDENTIFICAÇÃO DE RECEPTORES MOLECULARES PARA
LIGANTES DETECTADOS PELO ÓRGÃO VOMERONASAL**

ORIENTADOR: PROF. DR. FABIO PAPES

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Leonardo Minete Cardozo
F. Papes
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética
Animal e Evolução.

Campinas
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C179e Cardozo, Leonardo Minete, 1988-
Identificação de receptores moleculares para ligantes detectados pelo Órgão Vomeronasal / Leonardo Minete Cardozo. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

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

1. Olfato. 2. Feromônios. 3. Receptores acoplados à proteína G. 4. Genes de expressão imediata. I. Papes, Fabio, 1975-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Identification of molecular receptors for ligands detected by the Vomeronasal Organ

Palavras-chave em Inglês:

Smell

Pheromones

G protein-coupled receptors

Immediate Early Genes

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Fabio Papes [Orientador]

Isaias Glezer

Ana Carolina de Mattos Zeri

Data da defesa: 27-02-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 27 de fevereiro de 2012

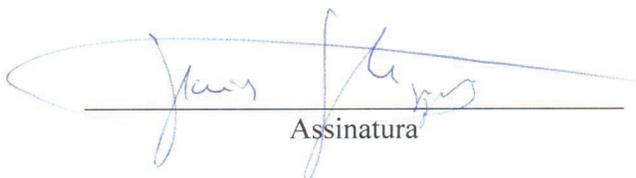
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabio Papes
orientador



Assinatura

Prof. Dr. Isaias Glezer



Assinatura

Dra. Ana Carolina de Mattos Zeri



Assinatura

Prof. Dr. Li Li Min

Assinatura

Dr. Jorg Kobarg

Assinatura

Aos meus pais, Rita e Fábio

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo amor, incentivo e companhia ao longo de toda a minha vida.

Aos meus pais, Rita e Fábio, pela sólida educação e pelo apoio incondicional, cada um à sua maneira. Agradeço imensamente por sempre permitirem que eu fosse atrás dos meus sonhos, mesmo às vezes sem entendê-los.

Ao meu irmão Thiago, pela companhia de muitos anos e afinidade natural, e por ser alguém com quem eu sempre poderei contar.

Ao Leandro, pela longa e inabalável amizade.

Aos amigos de laboratório, Thiago, Felipe Beato, Márcio, Renato, Laila, Guilherme, César, Mateus, Felipe Tolentino, Fábio Conte, Natália, Alessandro e Gabriel, pela companhia, risadas e distração ideais e necessárias para a realização de um bom trabalho.

Ao Thiago, pela paciência e ajuda nos primeiros experimentos, me ensinando a importância do zelo e carinho com o trabalho.

À Laila, pela meiguice e sensibilidade, e pelo toque feminino indispensável ao laboratório.

Ao Guilherme, Mateus, Alessandro e Gabriel, pelo imprescindível auxílio em diversas situações, pela dedicação ao trabalho, pelas dúvidas que me fizeram pensar, e pela honra de poder participar do crescimento científico e intelectual de vocês.

Às técnicas do laboratório, Laila e Natália, por tornarem viável este trabalho.

Ao Prof. Fabio Papes, por compartilhar seu conhecimento, e também suas dúvidas. E por me ensinar que a sorte em ciência depende de trabalho árduo.

À Cátia, pela adorável companhia e ternura, como só um cão pode ter.

Aos meus amigos, Marília, Mainara, Giseli, Marcos e Iuri, pela cumplicidade, ajuda nos momentos difíceis, risadas nos momentos alegres, enfim, por serem minha segunda família.

Ao Iuri, pela amizade e carinho, pela confiança e lealdade, equilíbrio e apoio. E por me ensinar a admirar a verdadeira beleza, aquela que não envelhece, apesar do tempo.

À Marília, pela importante contribuição neste trabalho ao realizar com criatividade e destreza alguns dos desenhos que ilustram esta tese.

À FAPESP e à CAPES, pelo suporte financeiro que permitiram a realização deste trabalho.

A todas as pessoas com as quais convivi ou não, e que contribuíram para fazer de mim quem sou.

A morte (ou sua alusão) torna preciosos e patéticos os homens. Estes comovem por sua condição de fantasmas; cada ato que executam pode ser o último; não há rosto que não esteja por dissolver-se como o rosto de um sonho. Tudo, entre os mortais, tem o valor do irrecuperável e do inditoso. Entre os Imortais, ao contrário, (...) nada pode ocorrer uma só vez, nada é preciosamente precário.

Jorges Luís Borges, *O Imortal* (1949)

Sem imaginação não é possível produzir nada de novo.

Jostein Gaarder, *O mundo de Sofia* (1991)

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. O Sistema Olfatório de mamíferos e seus subsistemas.....	4
1.2. Os receptores do Sistema Olfatório	10
1.3. Codificação dos odores e processamento da informação no Bulbo Olfatório	16
1.4. O Sistema Olfatório Vomeronasal e a indução de comportamentos inatos.....	23
1.5. Identificação de relações receptor-ligante no Sistema Olfatório	25
2. OBJETIVOS.....	29
3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	31
4. RESULTADOS	37
4.1. Desenvolvimento de uma metodologia para a utilização de Genes de Expressão Imediata (IEGs) para detecção de neurônios ativados por estímulos quimiossensoriais no sistema olfatório.....	38
4.2. Identificação das famílias dos receptores de cairomônios fobiogênicos de predadores - Desenho e emprego de sondas específicas para as famílias de receptores do VNO.....	51
4.3. Desenho e validação das sondas clado-específicas para as subfamílias V2R	55
4.4. Caracterização das subfamílias de receptores dos neurônios responsivos aos cairomônios fobiogênicos de predadores.....	62
4.5. Experimentos futuros.....	66
5. DISCUSSÃO.....	67
5.1. Estabelecimento de um método robusto para identificação dos receptores olfatórios no VNO.....	68
5.2. Caracterização de receptores responsivos aos Cairomônios Fobiogênicos de Predadores..	70
6. CONCLUSÕES	75
7. METODOLOGIA.....	77
7.1. Exposição dos animais aos estímulos fobiogênicos e retirada do VNO.....	78
7.2. Síntese de ribossondas de RNA para a hibridação <i>in situ</i>	78
7.3. Hibridação <i>in situ</i>	79
7.4. Imunohistoquímica	83
8. REFERÊNCIAS.....	85
9. APÊNDICES - Estratégias alternativas para a identificação de receptores dos odores fobiogênicos de predadores	95
9.1. Imunohistoquímica anti-MUP em células sensoriais dissociadas	96
9.2. Co-imunoprecipitação de proteínas de membrana do VNO e rMUP	97
9.3. Pseudotipagem viral.....	100
9.4. Metodologia dos apêndices.....	101
9.5. Referências específicas dos apêndices.....	103
ANEXOS - Autorizações da Comissão de Ética no Uso de Animais e da Comissão Interna de Biossegurança	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Cavidade nasal de um camundongo, evidenciando os órgãos olfatórios e a primeira estação de processamento olfatório no cérebro	5
Figura 2 – O Órgão Vomeronasal (VNO) na cavidade nasal.....	8
Figura 3 – Neurônios sensoriais do sistema olfatório expressam o marcador característico <i>OMP</i>	10
Figura 4 – Receptores do Sistema Olfatório.....	12
Figura 5 – O Órgão Vomeronasal (VNO)	14
Figura 6 – Receptores do Órgão Vomeronasal.....	16
Figura 7 – Representação de estímulos olfatórios pelos receptores de odores.....	18
Figura 8 – Organização celular no Sistema Olfatório Principal.....	20
Figura 9 – Organização anatômica no Sistema Olfatório Acessório.....	22
Figura 10 – Estratégia geral utilizada para a identificação dos receptores dos CFPs	33
Figura 11 – Sequência de experimentos para identificação dos receptores de CFPs no VNO	34
Figura 12 – Imunohistoquímica de IEGs em cortes de VNO.....	39
Figura 13 - Ribossondas para genes utilizados nos ensaios de hibridação <i>in situ</i>	41
Figura 14 – Influência da temperatura de hibridação no resultado da hibridação <i>in situ</i>	43
Figura 15 – Testes da indução da expressão de IEGs pelos CFPs	45
Figura 16 – Teste da influência do tempo na expressão de <i>Egr-1</i> após exposição aos estímulos fobiogênicos de predadores	46
Figura 17 – Teste da concentração ideal de sonda <i>Egr-1</i>	48
Figura 18 – Efeito da alteração das temperaturas de hibridação e lavagem sobre o sinal de <i>Egr-1</i> em hibridação <i>in situ</i> fluorescente do VNO	50
Figura 19 – Análise de máxima verossimilhança para os genes das subunidades alfa de proteína G expressos no VNO.....	51
Figura 20 – Amplificação por RT-PCR visando à síntese de sondas específicas das subunidades alfa de proteína G, características de cada zona do VNO.	52
Figura 21 – Neurônios responsivos aos CFPs de gatos e ratos não expressam V1Rs.....	53
Figura 22 - Neurônios responsivos aos CFPs de gatos expressam V2Rs.....	54
Figura 23 – Subfamílias escolhidas para o desenho de sondas clado-específicas.....	55
Figura 24 – Similaridade de sequências intra-clado são maiores que 75%.....	57

Figura 25 – Desenho de sondas clado-específicas.	58
Figura 26 – Validação da equivalência das marcações utilizadas nos ensaios de hibridação <i>in situ</i> fluorescente.....	59
Figura 27 – Validação das sondas e teste da percentagem de similaridade necessária para ocorrência de hibridação cruzada.	60
Figura 28 – Teste da percentagem mínima de similaridade de sequência necessária para ocorrência de hibridação cruzada.	61
Figura 29 – Subfamílias prioritariamente selecionadas para a caracterização dos neurônios responsivos aos CFPs de gatos	62
Figura 30 – Caracterização dos neurônios responsivos aos odores fobiogênicos de gatos quanto à subfamília de receptores expressos.....	63
Figura 31 – Quantificação dos neurônios responsivos aos CFPs de gatos que expressam receptores do clado A4.....	65
Figura 32 – Restrição do número de candidatos a receptores de CFPs de gatos.....	65
Figura 33 – Comparação dos resultados obtidos em ensaios de marcação indireta da ativação neuronal no VNO, através da expressão de IEGs.....	69
Figura 34 – A região extracelular dos V2Rs concentra as variações na sequência de aminoácidos.....	72
Figura 35 - Imunohistoquímica anti-rMBP em células dissociadas do VNO.	97
Figura 36 – Purificação de rMUP.....	99
Figura 37 - SDS-PAGE do ‘pulldown’ de proteínas de membrana do MOE e do VNO, utilizando como “isca” a proteína recombinante rMUP.....	100
Figura 38 – Esquema explicativo da estratégia de pseudotipagem viral.....	101

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- AOB** – Bulbo Olfatório Acessório
- CFPs** – Cairomônios Fobiogênicos de Predadores
- ESP1** – Peptídeo Secretado por Glândula Exócrina 1
- GCD** – Células Guanilato Ciclase D+
- GFP** – Proteína Fluorescente Verde
- GG** – Gânglio de Grueneberg
- GPCRs** – Receptores Acoplados à Proteína G
- IEGs** – Genes de Expressão Imediata
- IRES** – Sítio Interno de Entrada de Ribossomo
- MBP** – Proteína de Ligação à Maltose
- MHC** – Complexo Principal de Histocompatibilidade
- MOB** – Bulbo Olfatório Principal
- MOE** – Epitélio Olfatório Principal
- MUP** – Proteína Majoritária da Urina
- NG** – Glomérulos do “Colar”
- ORs** – Receptores de Odores
- OSNs** – Neurônios Olfatórios Canônicos
- SO** – Órgão Septal de Masera
- TAARs** – Receptores Associados a Traços de Amina
- V1Rs** – Família de Receptores Vomeronasais do tipo 1
- V2Rs** – Família de Receptores Vomeronasais do tipo 2
- VNO** – Órgão Vomeronasal

RESUMO

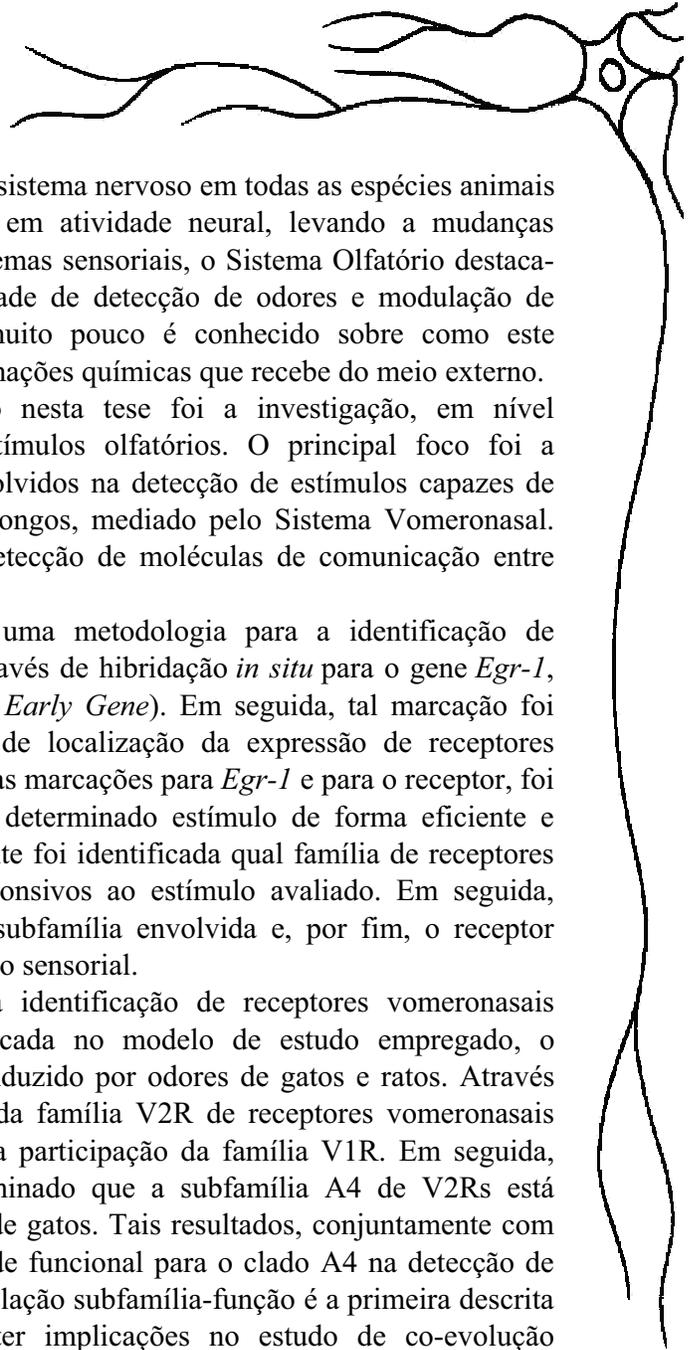
Uma propriedade fundamental do sistema nervoso em todas as espécies animais é a transformação dos estímulos sensoriais em atividade neural, levando a mudanças comportamentais e endócrinas. Dentre os sistemas sensoriais, o Sistema Olfatório destaca-se por sua complexidade molecular, capacidade de detecção de odores e modulação de comportamentos inatos. Entretanto, ainda muito pouco é conhecido sobre como este Sistema detecta, processa e interpreta as informações químicas que recebe do meio externo.

O objetivo do trabalho exposto nesta tese foi a investigação, em nível molecular, do processo de detecção de estímulos olfatórios. O principal foco foi a identificação dos receptores moleculares envolvidos na detecção de estímulos capazes de induzir comportamento de medo em camundongos, mediado pelo Sistema Vomeronasal. Este subsistema olfatório está associado à detecção de moléculas de comunicação entre animais.

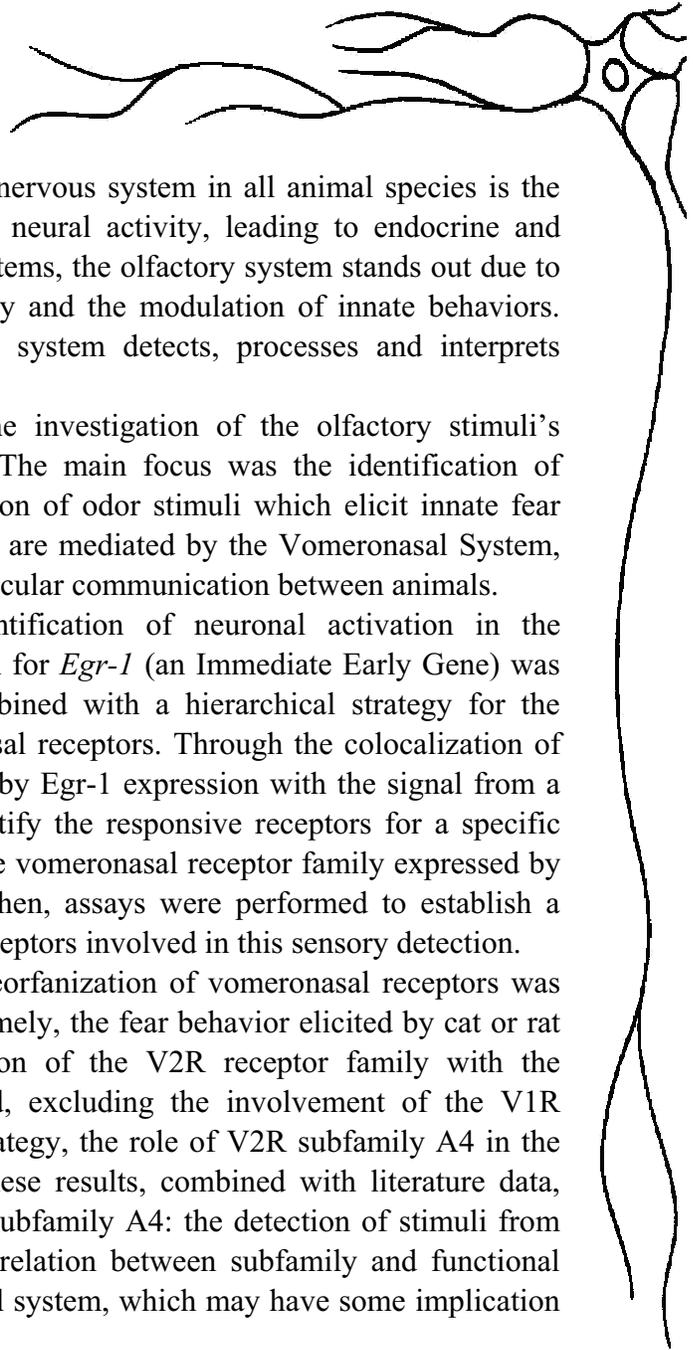
Primeiramente, foi estabelecida uma metodologia para a identificação de ativação neuronal no Órgão Vomeronasal, através de hibridação *in situ* para o gene *Egr-1*, um Gene de Expressão Imediata (*Immediate Early Gene*). Em seguida, tal marcação foi combinada com uma estratégia hierárquica de localização da expressão de receptores vomeronasais. Através da colocalização entre as marcações para *Egr-1* e para o receptor, foi possível identificar receptores responsivos a determinado estímulo de forma eficiente e robusta. De maneira progressiva, primeiramente foi identificada qual família de receptores vomeronasais é expressa nos neurônios responsivos ao estímulo avaliado. Em seguida, foram realizados ensaios para determinar a subfamília envolvida e, por fim, o receptor específico envolvido neste processo de detecção sensorial.

A estratégia estabelecida para a identificação de receptores vomeronasais associados a determinado estímulo foi aplicada no modelo de estudo empregado, o comportamento de medo em camundongos induzido por odores de gatos e ratos. Através deste método, foi determinada a associação da família V2R de receptores vomeronasais com a detecção destes estímulos, excluindo a participação da família V1R. Em seguida, seguindo a estratégia hierárquica, foi determinado que a subfamília A4 de V2Rs está associada à detecção de odores provenientes de gatos. Tais resultados, conjuntamente com dados da literatura, sugerem uma especialidade funcional para o clado A4 na detecção de estímulos de predadores mamíferos. Esta correlação subfamília-função é a primeira descrita para os receptores vomeronasais, e pode ter implicações no estudo de co-evolução predador-presa.

A estratégia hierárquica estabelecida para a identificação de relações receptor-ligante no Órgão Vomeronasal permite um avanço na compreensão molecular da organização dos órgãos sensoriais olfatórios, possibilitando os estudos das vias neurais subjacentes à deflagração de comportamentos específicos modulados por estimulação sensorial.



ABSTRACT



A fundamental property of the nervous system in all animal species is the transformation of sensory stimulation into neural activity, leading to endocrine and behavioral changes. Among the sensory systems, the olfactory system stands out due to its molecular complexity, detection capacity and the modulation of innate behaviors. However, little is known about how this system detects, processes and interprets chemosignals from the environment.

The goal of this work was the investigation of the olfactory stimuli's detection process at the molecular level. The main focus was the identification of molecular receptors involved in the detection of odor stimuli which elicit innate fear behavior in mice. These kinds of behaviors are mediated by the Vomeronasal System, an olfactory subsystem associated with molecular communication between animals.

First, a protocol for the identification of neuronal activation in the Vomeronasal Organ by *in situ* hybridization for *Egr-1* (an Immediate Early Gene) was established. Next, this approach was combined with a hierarchical strategy for the localization of the expression of vomeronasal receptors. Through the colocalization of the signal for neuronal activation provided by *Egr-1* expression with the signal from a group of receptors, it was possible to identify the responsive receptors for a specific stimulus efficiently and robustly. Firstly, the vomeronasal receptor family expressed by the responsive neurons was determined. Then, assays were performed to establish a given subfamily and, finally, the specific receptors involved in this sensory detection.

The outlined strategy for the deorfanzation of vomeronasal receptors was applied in the experimental model used, namely, the fear behavior elicited by cat or rat odors. Using this approach, the association of the V2R receptor family with the detection of these stimuli was determined, excluding the involvement of the V1R family. Next, following the hierarchical strategy, the role of V2R subfamily A4 in the detection of cat odors was established. These results, combined with literature data, suggest a functional specialization for the subfamily A4: the detection of stimuli from mammalian predators. This is the first correlation between subfamily and functional specialization described for the vomeronasal system, which may have some implication in the studies of co-evolution predator-prey.

The hierarchical strategy designed for the identification of receptor-ligand relationships in the Vomeronasal Organ led to an improvement in the molecular understanding of the organization of an olfactory sensory organ, which will allow future studies on the neural circuits responsible for the generation of behavior response elicited by a sensory stimulation.



Introdução

1. INTRODUÇÃO

Uma propriedade fundamental do sistema nervoso em todas as espécies animais é a transformação dos estímulos sensoriais em atividade neural, levando subsequentemente à geração de mudanças comportamentais e endócrinas em resposta à estimulação inicial. Dentre os sistemas sensoriais, o sistema olfatório destaca-se por ser, provavelmente, o mais importante para a maioria dos animais terrestres (Farbman 1992). A olfação é a modalidade sensorial que dota a maioria dos organismos da habilidade para detectar alimentos, predadores e parceiros sexuais em potencial.

Os primeiros estudos sobre a olfação datam de 55 A.C., quando o filósofo e poeta romano Lucrécio, baseado nos escritos do filósofo grego Demócrito, especulou que os animais são capazes de “cheirar átomos” de diferentes formas e tamanhos que emanam dos objetos (Lancet 1986). Depois disso, muito pouco sobre o sistema olfatório foi relatado até o início do século XIX, quando estudos anatômicos e fisiológicos começaram a ser realizados. Entretanto, a compreensão da lógica de detecção de odores por este sistema só começou a ser desvendada ao final do século XX, com o advento da Biologia Molecular. Estes estudos culminaram com a concessão do Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2004, pela descoberta das bases moleculares da percepção de odores no Sistema Olfatório (Prêmio Nobel 2012).

O Sistema Olfatório de mamíferos, assim como o de insetos, é dividido em diversos subsistemas localizados em regiões distintas da cavidade olfatória (Kaupp 2010). Neste trabalho, será dada especial atenção ao sistema olfatório de camundongos, o qual é o organismo modelo utilizado em nossos ensaios experimentais. O sistema olfatório de camundongos é semelhante aos dos demais mamíferos, inclusive humanos.

O Sistema Vomeronasal ou Sistema Olfatório Acessório, um dos principais subsistemas olfatórios em roedores, representa o objeto de estudo neste trabalho, e por isso, será mais extensivamente descrito. A descrição dos demais sistemas terá um intuito comparativo, além de auxiliar na compreensão do funcionamento geral do sistema olfatório.

1.1. O Sistema Olfatório de mamíferos e seus subsistemas

O Sistema Olfatório de mamíferos apresenta quatro principais subsistemas (Figura 1), os quais serão descritos a seguir.

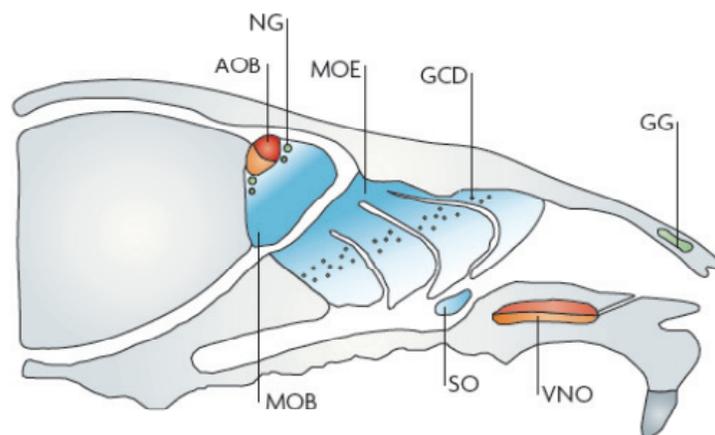


Figura 1 – Cavidade nasal de um camundongo, evidenciando os órgãos olfatórios e a primeira estação de processamento olfatório no cérebro. Os órgãos olfatórios são o Epitélio Olfatório Principal (Main Olfactory Epithelium - MOE), o Órgão Vomeronasal (Vomerolnasal Organ - VNO), o Órgão Septal de Maser (Septal Organ of Maser - SO), o Gânglio de Grueneberg (Grueneberg Ganglion - GG) e as células guanilato ciclase D⁺ (guanylate cyclase D-containing cells - GCDs). Neurônios sensoriais do MOE e do SO projetam axônios para o Bulbo olfatório Principal (Main Olfactory Bulb - MOB). De forma análoga, neurônios sensoriais do VNO lançam seus axônios em direção ao Bulbo olfatório Acessório (Accessory Olfactory Bulb – AOB), enquanto que neurônios sensoriais do GG e as GCDs projetam seus axônios para os glomérulos do “colar” (Necklace Glomeruli – NG). Figura retirada de Kaupp 2010.

1.1.1. Sistema Olfatório Principal

O Sistema Olfatório Principal é o subsistema que responde pela percepção geral de odores. Este é formado pelo Epitélio Olfatório Principal (Main Olfactory Epithelium – MOE); Bulbo Olfatório Principal (Main Olfactory Bulb - MOB), primeira estação de processamento da informação olfatória no cérebro (Figura 1), que é inervada por axônios dos neurônios do MOE; e centros cerebrais hierarquicamente superiores, onde tal informação sensorial é interpretada e armazenada (Munger et al. 2009).

Uma grande variedade de moléculas de odores voláteis presentes no ar apresenta-se embebida no fluido que circunda os cílios dos neurônios sensoriais olfatórios, onde estão localizados os receptores de odores, responsáveis pela detecção das moléculas odoríferas (Su et al. 2009).

O MOE é composto por uma gama variada de células sensoriais, dentre as quais os neurônios sensoriais olfatórios canônicos (Olfactory Sensor Neurons - OSNs) correspondem a maior parte. Toda esta gama de células é responsável pela detecção geral de odores no

organismo, além de participar da detecção de alguns feromônios, demonstrando a versatilidade de funções do MOE (Zufall e Leinders-Zufall 2007). Os OSNs expressam componentes da cascata de sinalização mediada por adenosina 3':5' monofosfato cíclico (cAMP) para transduzir sinais provenientes dos odores (Firestein et al. 1991; Firestein 2001). Por outro lado, há neurônios no MOE que expressam guanilil ciclase D (GC-D), os quais apresentam um mecanismo de transdução de sinal baseado em guanosina 3':5' monofosfato -cíclico (cGMP). Estas duas subpopulações de neurônios ilustram a diversidade encontrada no MOE, o qual abriga ainda outros tipos de neurônios (Munger et al. 2009). As diferentes subpopulações de neurônios do MOE fazem distintas conexões na primeira estação de processamento olfatória no cérebro, o MOB (Figura 1), o que sugere que tais subpopulações são especializadas no processamento de diferentes estímulos quimiossensoriais.

Os neurônios sensoriais constituem apenas uma fração das células que compõem o MOE. Há também células de suporte, um tipo de células-da-glia, as quais possuem microvilos voltados para o lúmen; e células basais, uma população de células-tronco responsável pela regeneração dos neurônios sensoriais (Graziadei e Monti Graziadei 1979). A contínua regeneração do epitélio olfatório e das conexões axonais dos neurônios recém-formados, inclusive na fase adulta, constitui uma das principais peculiaridades do sistema olfatório (Mori e Yoshihara 1995). Quando o nervo olfatório é lesionado ou quando o epitélio olfatório é destruído, as células basais dão origem a uma nova população de células sensoriais, reconstituindo o epitélio completamente após 30-60 dias (Simmons e Getchell 1981).

1.1.2. Sistema Vomeronasal

O Sistema Olfatório Acessório ou Vomeronasal é formado por neurônios sensoriais do órgão vomeronasal (Vomeronasal Organ - VNO), estrutura tubular encontrada na cavidade nasal da maioria dos vertebrados (Figura 1). O VNO de mamíferos abre-se para a cavidade nasal, permitindo a entrada dos estímulos olfatórios. Os neurônios do VNO mantêm sinapses com o bulbo olfatório acessório (Olfactory Accessory Bulb - AOB), o qual transmite as informações provenientes do VNO para outras regiões do encéfalo, onde as respostas comportamentais são geradas (Dulac e Torello 2003).

O VNO foi descrito pela primeira vez no começo do século XIX, sendo primeiramente denominado Órgão de Jacobson (Trotier e Doving 1998; tradução em inglês). Entretanto, os estudos sobre este órgão só se tornaram mais frequentes a partir da década de 1970, com o avanço nos estudos sobre feromônios, e na especulação sobre o requerimento de um órgão especializado para a detecção destas moléculas (Halpern, 1987). Teorias baseadas em estudos anatômicos sugeriam na época a existência de uma dualidade funcional no sistema olfatório, onde o MOE e o VNO corresponderiam a órgãos sensoriais cujas projeções axonais constituiriam vias distintas no cérebro, associadas a diferentes funções (Raisman 1972; Scalia e Winans 1975). Atualmente, os dados obtidos demonstram que a hipótese de dualidade do sistema olfatório foi comprovada, porém com clara sobreposição funcional entre os subsistemas (Brennan e Zufall 2006).

O estímulo olfatório alcança a superfície epitelial do VNO através de um mecanismo de bombeamento vascular produzido pelos grandes vasos que irrigam o órgão. Alterações de constrição/dilatação dos vasos ocasionam variações de pressão local que induzem a entrada de ar no VNO (Meredith 1994). Tal sistema é notadamente frequente em situações de investigação do ambiente. Por isto, especulava-se que o VNO seria especializado na detecção de moléculas não-voláteis, que entrariam na cavidade vomeronasal após contato direto, enquanto o MOE detectaria odores voláteis. No entanto, tal divisão entre os subsistemas com base na natureza dos odores também não se mostrou rígida, uma vez que o VNO responde também a odores voláteis (Xu et al. 2005) e que o MOE participa da detecção de peptídeos tipo MHC de classe I, os quais são compostos não-voláteis (Spehr et al. 2006).

O VNO é um órgão localizado no septo nasal, envolto pelo osso vômer. O órgão apresenta um lúmen em formato crescente quando visualizado em corte transversal, tendo o epitélio onde estão presentes os neurônios sensoriais localizado na parte côncava medial, voltada para o lúmen (Figura 2). Diversas glândulas estão localizadas próximas ao VNO, e suas secreções são direcionadas para o lúmen do órgão. Foi demonstrado que tais secreções contêm proteínas candidatas a carreadores de moléculas, embora a função de transporte e participação no processo de detecção de odores não tenha sido comprovada (Halpern e Martínez-Marcos 2003; Matsushita et al. 2000).

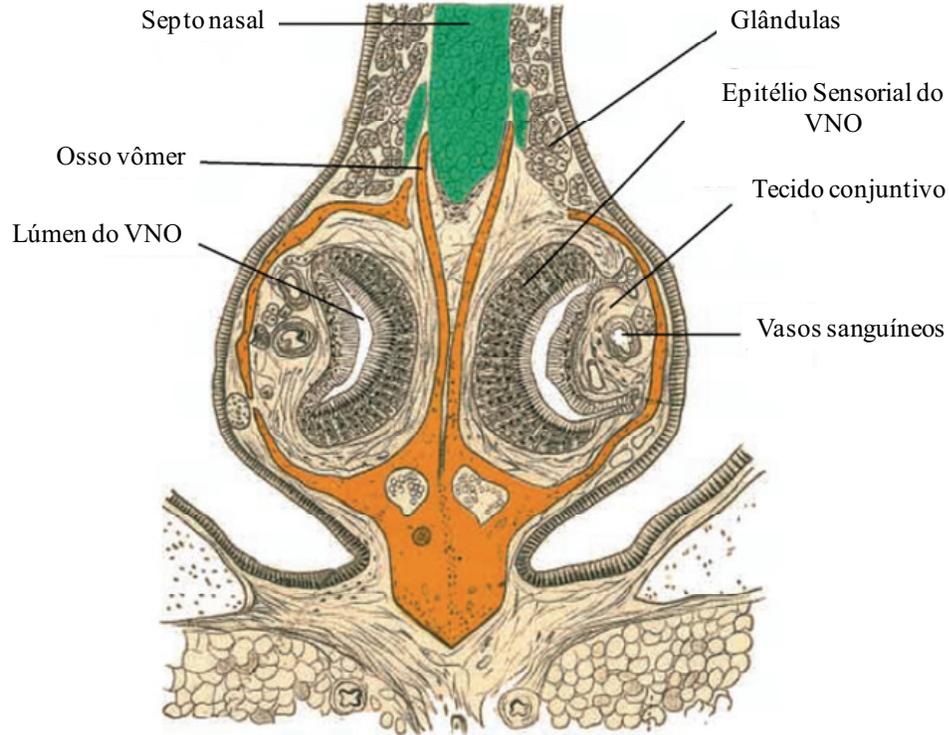


Figura 2 – O Órgão Vomeronasal (VNO) na cavidade nasal. Esquema de um corte histológico coronal através da região medial da cavidade nasal, mostrando a localização dos dois VNOs, órgão par inserido na parte inferior do septo nasal. Figura modificada a partir de Doving e Trotier, 1998.

O VNO está presente em humanos na fase embrionária, sendo vestigial em adultos. Sua função na detecção de ferômonios ainda é questão de debates, apesar do acúmulo de dados indicando a ausência de genes de receptores funcionais e de conexões do órgão vestigial com outras regiões do cérebro (Trotier 2011). O canal iônico *Trpc2*, essencial para a funcionalidade do VNO em camundongos (Stowers et al. 2002), apresenta-se como um pseudogene em humanos (Wes et al. 1995). Portanto, apesar de ainda controverso, as evidências apontam para a ausência de função do VNO em humanos.

O epitélio do VNO é formado pelos neurônios sensoriais, pelas células de suporte e pelas células basais, as quais são células-tronco com função de regeneração contínua do epitélio, assim como o MOE. Estas células basais concentram-se nas margens do epitélio, embora também ocorram na região central, próxima à lâmina basal (ver Figura 5; Capello et al. 1999; Giacobini et al. 2000). A regeneração do epitélio, antes considerada como resultante da migração

horizontal das células recém-formadas pelas células basais marginais, atualmente vem sendo creditada à migração vertical das células basais centrais e marginais, assim como ocorre no MOE e no VNO de répteis (Halpern e Martínez-Marcos 2003).

A participação do VNO na detecção de feromônios e outros compostos que levam à indução de resposta comportamental inata será discutida em seção específica abaixo (seção 1.4 da Introdução).

1.1.3. Órgão Septal de Maser

O órgão septal de Maser (Septal Organ of Maser – SO) é um pequeno aglomerado de neurônios sensoriais, localizados na base do septo nasal (Figura 1; Rodolfo-Maser 1943). O SO apresenta neurônios olfatórios canônicos (OSNs), assim como o MOE, os quais expressam um subconjunto dos receptores de odores (odorant receptors – ORs), expressos majoritariamente no MOE (Kaluza et al. 2004; Tian e Ma 2004). Dessa forma, os neurônios do SO respondem a uma gama de odores que também é detectada pelo MOE (Grosmaître et al. 2007; Ma et al. 2003). Os neurônios do SO projetam seus axônios para uma pequena região do MOB, aparentemente compartilhada parcialmente pelos neurônios do MOE (Levai e Strotmann 2003).

1.1.4. Gânglio de Grueneberg

O gânglio de Grueneberg (Grueneberg ganglion – GG) é um conjunto de neurônios sensoriais olfatórios localizados na extremidade dorsal da cavidade nasal, presente também em humanos (Grueneberg 1973). Os neurônios sensoriais do GG expressam alguns receptores encontrados em outros órgãos do sistema olfatório, como o Vmn2r1 (ou V2R83; Fleischer et al. 2006), expresso na camada basal do VNO. Entretanto, não está claro como os estímulos químicos atingem estes receptores, uma vez o GG não tem comunicação com a cavidade nasal (Fuss et al. 2005). Apesar disso, foi demonstrado que tais neurônios são ativados em resposta à feromônios de alarme voláteis, e são necessários para a geração de comportamentos de defesa (Brecht et al. 2008).

1.1.5. O Marcador do Sistema Olfatório – Gene *OMP*

O Sistema Olfatório apresenta um gene marcador característico, descoberto em ratos na década de 1970 (Keller e Margolis 1976). Este gene codifica a ‘Proteína Marcadora do Sistema Olfatório’ (Olfactory Marker Protein – OMP), que é expressa em todos os órgãos olfatórios descritos em camundongos (Figura 3). Animais transgênicos ‘knock-out’, nos quais o gene para OMP foi mutado, apresentam falhas na modulação da amplitude e cinética da resposta aos odores (Buiakova et al. 1996). Apesar disso, sua função molecular é ainda pouco clara.

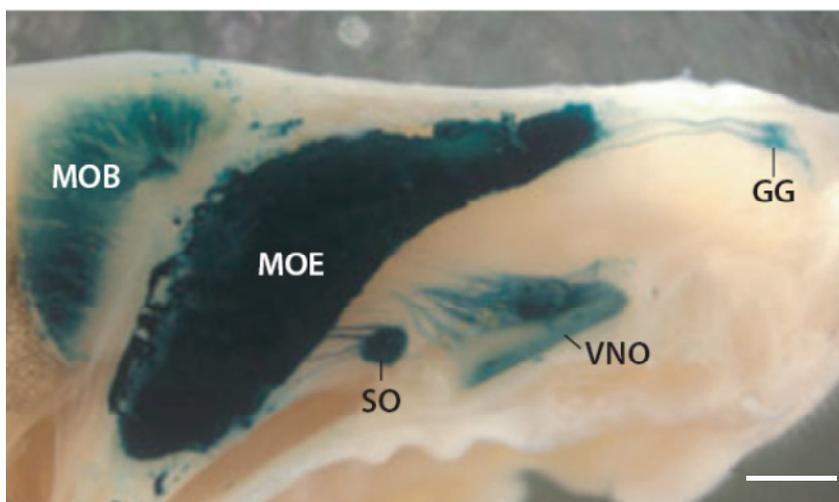


Figura 3 – Neurônios sensoriais do sistema olfatório expressam o marcador característico OMP. Corte sagital do crânio de um camundongo transgênico *OMP-IRE5-tau: lacZ* (Mombaerts et al 1996), evidenciando a cavidade nasal e o bulbo olfatório. A marcação azul (X-gal) corresponde às regiões onde o gene da ‘Proteína Marcadora do Sistema Olfatório’ (Olfactory Marker Protein – OMP) é expresso. Todos os órgãos olfatórios descritos até o momento podem ser observados, assim como a região do bulbo olfatório. Siglas: GG – Gânglio de Grueneberg; MOB – Bulbo olfatório Principal; MOE – Epitélio Olfatório Principal; SO – Órgão Septal de Masera; VNO – Órgão Vomeronasal. Barra: 500µm. Figura retirada de Munger et al, 2009.

1.2. Os Receptores do Sistema Olfatório

Todos os receptores do Sistema Olfatório de camundongos descritos são receptores acoplados à proteína G (GPCRs), apresentando sete domínios transmembrana alfa-hélices (Figura 4A). Estes receptores constituem 4 grandes famílias multigênicas: receptores olfatórios (Odorant Receptors – ORs), receptores associados a traços de amina (Trace amine-associated receptors – TAARs), e receptores vomeronasais tipos 1 e 2 (V1Rs e V2Rs; Nei et al. 2008).

1.2.1. ORs

Os ORs foram primeiramente descritos em elegante estudo realizado pelos ganhadores do Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2004, Linda Buck e Richard Axel (Buck e Axel 1991). Os ORs são receptores majoritariamente expressos no MOE, também sendo encontrados no SO, e em algumas células do GG e do VNO (Munger et al. 2009). Estes receptores são responsáveis pela detecção geral de odores. A expressão de ORs foi detectada fora do sistema olfatório, na língua, testículo, placenta e cérebro, porém sua função nestes órgãos é desconhecida (Feldmesser et al. 2006).

Os ORs compreendem à maior família multigênica de mamíferos, apresentando mais de 1000 genes em camundongos e ratos (Figura 4B; Zhang et al 2007). Estes genes são expressos em éxons únicos, sem íntrons. A hipótese mais aceita para a expressão destes genes é conhecida como “um receptor - um neurônio”, em que cada neurônio sensorial expressa apenas um dentre todos os ORs (Ngai et al. 1993; Ressler et al. 1993; Vassar et al. 1993; Mombaerts 2004a). Experimentos utilizando animais transgênicos (Serizawa et al. 2000) e RT-PCR a partir de uma única célula (Malnic et al. 1999) confirmaram a expressão mutuamente exclusiva dos ORs. Além disso, foi demonstrado que a expressão do gene OR é monoalélica (Chess et al. 1994).

A confirmação da regra “um receptor – um neurônio” acarretou na formulação de hipóteses que pretendiam explicar o processo de escolha de ORs e a regulação gênica envolvida na manutenção da expressão de apenas um OR por célula, escolhido de forma randômica dentro de 4 zonas de expressão distintas no MOE (Ressler et al. 1993; Vassar et al. 1993). Uma destas hipóteses defendia que o processo de escolha de ORs seria semelhante ao dos receptores dos linfócitos do sistema imune, onde há rearranjo gênico para a escolha do receptor definitivo da célula. Esta hipótese foi descartada através da geração de uma linhagem de camundongos a partir do núcleo de um único neurônio olfatório (Eggen et al. 2004; Liet al. 2004). Foi demonstrado que estes animais apresentavam o mesmo padrão de expressão de um animal selvagem, eliminando a possibilidade de ocorrência de rearranjos irreversíveis de DNA durante a escolha de ORs. Apesar disso, o mecanismo de escolha de ORs ainda não é muito bem compreendido (McClintock 2010). Recentemente, verificou-se que a heterocromatina participa do processo, silenciando os genes ORs não-expressos (Magklara et al. 2011).

Os ORs são expressos não somente na ponta dos dendritos, voltados para o lúmen do MOE, onde é presumido que ocorra a detecção de odores, mas também na ponta dos axônios, onde desempenham papel no direcionamento axonal no bulbo olfatório (Mombaerts et al., 1996; Barnea et al., 2004; Strotmann et al., 2004).

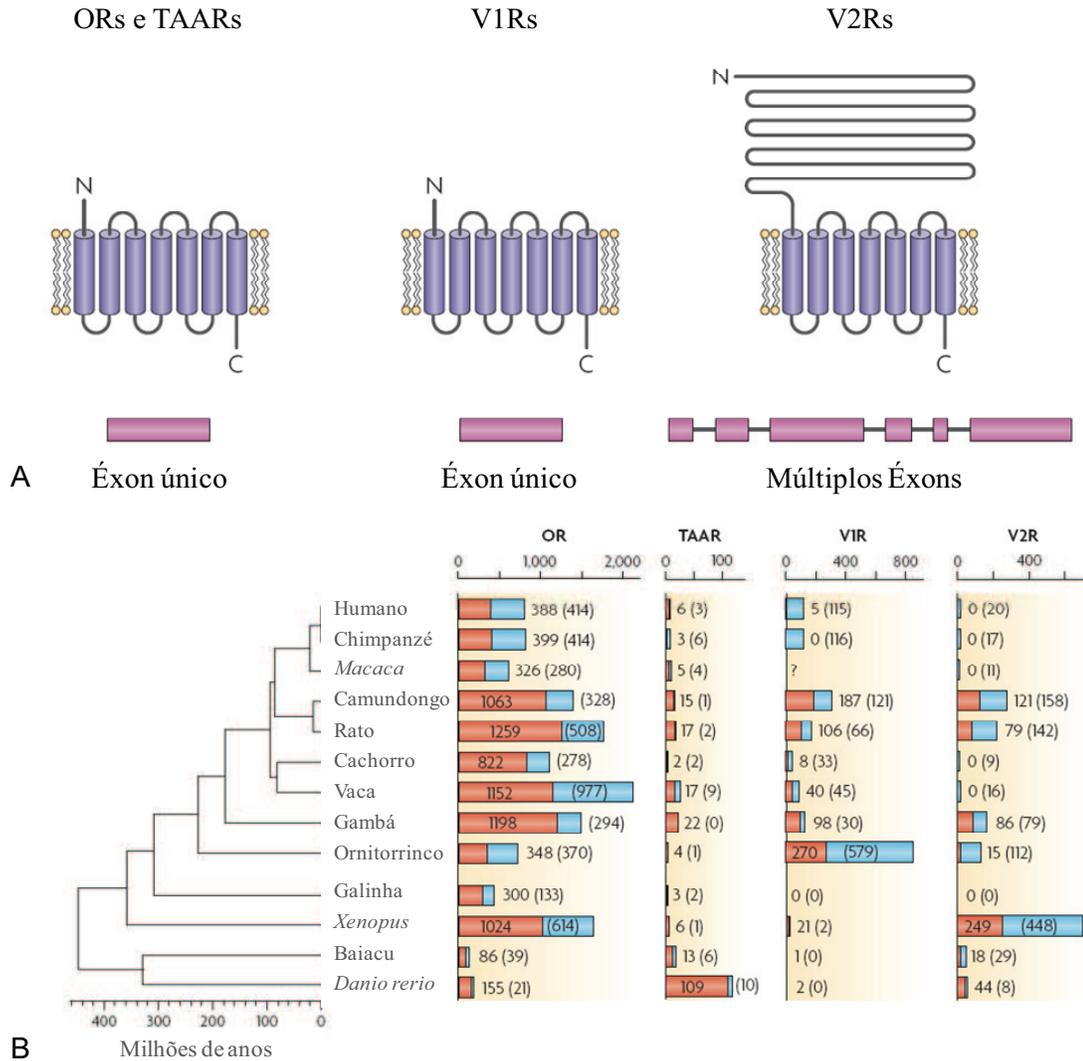


Figura 4 – Receptores do Sistema Olfatório. (A) Desenho esquemático da estrutura molecular dos GPCRs do sistema olfatório de mamíferos, evidenciando os sete domínios transmembrana. A organização destes genes no genoma (éxons únicos ou múltiplos) também é indicada. (B) Distribuição dos genes de receptores olfatórios em diversos vertebrados, no qual as barras vermelhas indicam os genes funcionais (intactos), enquanto que as barras azuis indicam os pseudogenes. Pontos de interrogação indicam dados não existentes. Figura modificada a partir de Nei et al. 2008.

1.2.2. V1Rs

A família de receptores V1R foi a primeira do VNO a ser descrita (Dulac e Axel 1995). Estes receptores pertencem à classe A (receptores semelhantes à rodopsina) dos GPCRs e, assim como os ORs, os genes *V1R* não apresentam íntrons (Figura 4A; Zhang et al. 2004; Shi et al. 2005; Nei et al. 2008). Estes receptores são expressos por neurônios cujos corpos celulares estão localizados na metade apical do epitélio do VNO, voltada para o lúmen (Figura 5). Alguns neurônios V1R⁺ também são encontrados no MOE, embora sua função neste órgão não seja conhecida (Munger et al. 2009).

Os neurônios V1R⁺ expressam uma subunidade alfa de proteína G característica, denominada G α i2, a qual participa no processo de transdução de sinais gerado pela detecção de odores (Figura 6; Shinohara, Kato e Asano 1992; Halpern et al. 1995; Berghard e Buck 1996). Estes neurônios estão associados com a detecção de pequenos compostos voláteis, que atuam como feromônios capazes de gerar alterações fisiológicas e comportamentais, tais como a aceleração da puberdade, a indução do estro e a agressividade entre machos (Leinders-Zufall et al. 2000; Boschat et al. 2002).

A família V1R consiste num total de 308 genes em camundongos, dos quais 187 são aparentemente funcionais (Figura 4B; Shi e Zhang 2007). A maioria dos genes está localizada nos cromossomos 6, 7 e 13 (Zhang et al. 2004; Shi et al. 2005). Em humanos, mais de 90% dos genes *V1R* foram convertidos em pseudogenes, com apenas 5 V1Rs estando aparentemente intactos, sendo expressos no MOE (Rodriguez et al. 2000; Rodriguez e Mombaerts 2002).

1.2.3. V2Rs

A família V2R constitui a segunda família de receptores identificada no VNO (Herrada e Dulac 1997; Matsunami e Buck 1997; Ryba e Tirindelli 1997). Cinco éxons participam da constituição da região codificadora deste receptor (Figura 4A; Shi e Zhang 2007; Yang et al. 2005; Young e Trask 2007; Touhara e Vossahl 2009).

Em camundongos, a família V2R compreende 121 genes intactos de um total de 279 genes, incluindo pseudogenes (Figura 4B; Shi e Zhang 2007; Young e Trask 2007). Genes V2Rs intactos não foram encontrados no genoma humano, sugerindo que tais genes passaram por uma mudança mais dramática que os V1Rs ao longo da evolução de primatas (Rodriguez e Mombaerts 2002).

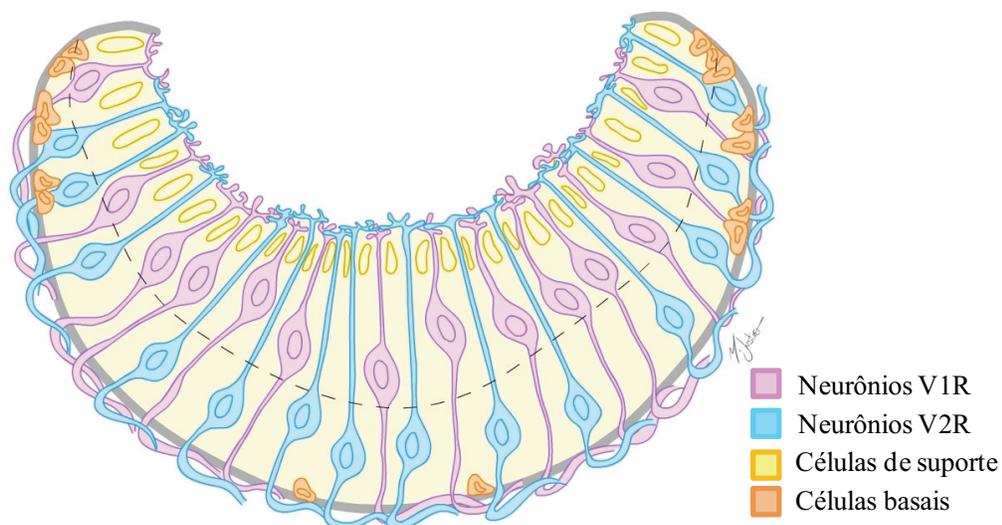


Figura 5 – O Órgão Vomeronasal (VNO). Esquema de corte transversal do epitélio do VNO, indicando os tipos celulares que o compõem. Os neurônios cujos corpos celulares estão localizados na metade apical, próxima ao lúmen do órgão, expressam receptores da família V1R, enquanto que os neurônios localizados na metade basal expressam receptores da família V2R. Desenho de Marília Lopes Justino.

A expressão dos V2Rs é restrita aos neurônios cujos corpos celulares estão localizados na metade basal do epitélio vomeronasal (Figura 5). Estes neurônios expressam a subunidade $G_{\alpha o}$ de proteína G, marcador característico da região basal do epitélio do VNO (Figura 6; Herrada e Dulac 1997; Matsunami e Buck 1997; Ryba e Tirindelli 1997). A função destes receptores está associada à detecção de moléculas não-voláteis tais como peptídeos ligantes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), peptídeos secretados por glândulas do animal como os peptídeos ESP1 (‘Exocrine Gland-Secreting Protein 1), e pequenas proteínas da família das lipocalinas conhecidas como ‘Proteínas Majoritárias da Urina’ (Major Urinary Proteins –MUPs; Leinders-Zufall et al. 2004; Kimoto et al. 2005; Chamero et al. 2007; Papes et al. 2010).

Os receptores V2R apresentam uma peculiaridade em relação aos demais GPCRs olfatórios, apresentando uma extensa porção N-terminal localizada no meio extracelular (Figura 4A). Essa característica é comum a receptores metabotrópicos sensíveis a cálcio e glutamato e à família T1R de receptores gustativos (Mombaerts 2004b). Tal região apresenta maior variabilidade de aminoácidos entre as sequências V2R, o que condiz com a suposição de que esta

seja a região envolvida na detecção de ligantes (Herrada e Dulac 1997; Matsunami e Buck 1997; Ryba e Tirindelli 1997; Yang et al. 2005).

Os neurônios $V2R^+$ são uma exceção à regra “um neurônio - um receptor”. Foi demonstrado que estes neurônios co-expressam dois receptores, sendo um membro da subfamília C e outro membro das subfamílias A, B e D (Figura 6B; Martini et al. 2001; Silvotti et al. 2007). O grupo das subfamílias A, B e D contém 115 genes intactos e camundongos, enquanto a subfamília C apresenta apenas 7 membros. Dois destes sete membros, *Vmn2r1* e *Vmn2r2*, são abundantemente expressos na camada basal do VNO, correspondendo a 29% e 52% dos neurônios, respectivamente. A co-expressão entre um gene da subfamília C e um das subfamílias A, B e D ocorre de forma não-randômica, sendo aparentemente sequencial e dependente, onde a subfamília C é expressa após a escolha de um receptor das subfamílias A, B e D (Ishii e Mombaerts 2011). Não se sabe, porém, se o receptor do clado C participa da detecção de odores, a qual é consensualmente relacionada com os receptores do clado A, B e D.

Recentemente, uma subdivisão da camada basal do VNO foi proposta, devido à expressão diferencial de receptores do tipo MHC classe I não-clássicos, denominados H2-Mv ou M10. Tais receptores são expressos pela metade mais basal dos neurônios $V2R^+$, sendo ausentes na camada apical (Loconto et al. 2003; Ishii et al. 2003). Além disso, os neurônios $M10^+$ projetam axônios para uma região distinta dos neurônios $M10^-$ (Ishii e Mombaerts, 2008). A função destes receptores permanece desconhecida, embora tenha sido sugerido que estes seriam necessários para a correta expressão dos $V2R$ na superfície celular (Loconto et al. 2003).

1.2.4 TAARs

A última família de receptores do sistema olfatório descoberta é uma pequena família de receptores associados a traços de amina (Trace-Amine Associated Receptors – TAARs), um grupo de GPCRs mais relacionado com receptores dopamina e serotonina do que com ORs (Figura 4; Borowsky et al 2001; Liberles e Buck 2006).

Oito dos nove genes *Taar* de camundongos são expressos em neurônios distintos (sem sobreposição) do MOE e do GG. Não há registro de expressão de ORs em neurônios $Taar^+$ (Liberles e Buck 2006). Sua função está relacionada com a detecção de feromônios (comunicação intra-específica), como aminas biogênicas e compostos da urina (Liberles e Buck 2006).

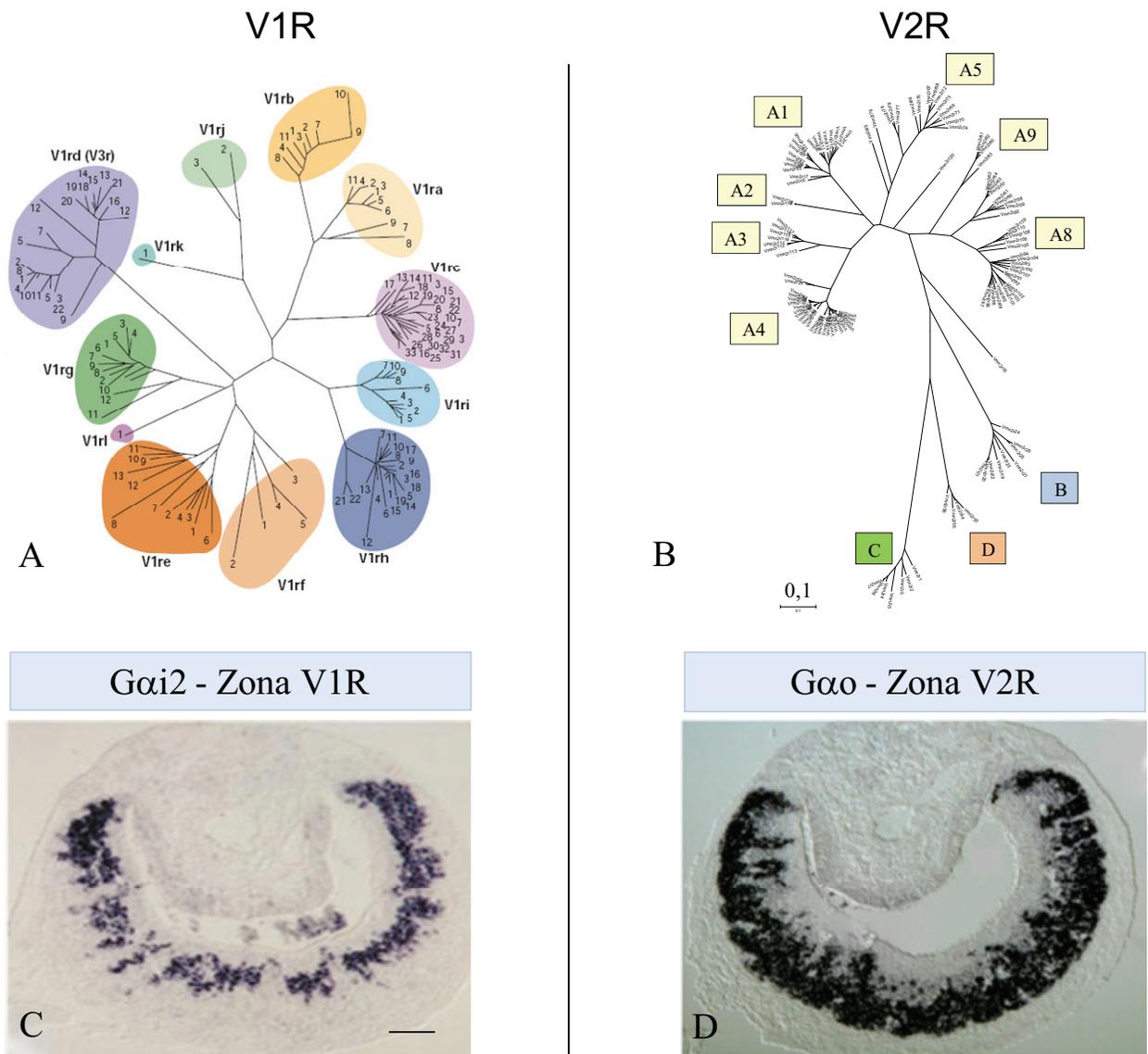


Figura 6 – Receptores do Órgão Vomeronasal. (A e B) Árvore filogenética de V1Rs e V2Rs de camundongos feita a partir do alinhamento de seqüências de aminoácidos, evidenciando as famílias e subfamílias de receptores. (C e D) Zonas do VNO, delimitadas pela região de expressão de *Gai2* e *Gao*. Hibridação *in situ* em cortes de VNO. Barra: 100μm. Figuras: (A) Yang et al. 2005 ; (C e D) Herrada e Dulac, 1997.

1.3. Codificação dos Odores e Processamento da Informação no Bulbo Olfatório

As bases moleculares do sistema olfatório começaram a ser desvendadas há duas décadas (Buck e Axel 1991), o que contrasta com outros sistemas sensoriais mais bem estudados,

como os sistemas visual e auditivo (Halpern e Martínez-Marcos, 2003). Entretanto, os últimos anos foram intensos em relação aos avanços obtidos sobre o funcionamento deste sistema, e atualmente foi estabelecido um modelo simplificado da representação dos odores pelo sistema olfatório.

1.3.1. Codificação dos odores pelos receptores do Sistema Olfatório

As famílias de receptores do Sistema Olfatório são as maiores famílias gênicas de mamíferos. Dos cerca de 25000 genes de camundongos, 1 em cada 20 genes codifica para um receptor do sistema Olfatório (~1300 genes intactos de receptores). Em humanos, que também apresentam ao redor de 25000 genes, a proporção é de 1 receptor olfatório em cada 60 genes (~400 genes intactos de receptores). Estes números ilustram a grande diversidade de receptores que os animais apresentam a fim de detectar e diferenciar o universo de odores aos quais são potencialmente expostos. Apesar de ser um número expressivo, a quantidade de receptores descritos é infinitamente menor que a quantidade de moléculas de odores presentes no ambiente. Este fato é um indício de que os receptores atuam de forma combinada para discernir a grande variedade de odores existentes.

De fato, a maioria das moléculas de odores é detectada por mais de um receptor e, um mesmo receptor detecta diversos odores, provavelmente agrupados pelas suas características químicas (Malnic et al. 1999; Araneda et al. 2000; Firestein et al. 2001). Com base nestas observações, foi formulado um modelo consensual para a detecção de odores pelos ORs (Figura 7A), em que os receptores detectam diferentes feições de uma molécula de odor, a qual é composta por diversos ‘epítomos’ ou ‘determinantes’, que são detectados pelos receptores. Portanto, como cada neurônio sensorial olfatório expressa apenas um dentre todos os possíveis receptores de odores, uma molécula de odor é representada pela ativação combinada de neurônios expressando diferentes receptores. Além disso, a intensidade de ativação de determinado receptor também deve fazer parte desta codificação (Malnic et al. 1999; Firestein et al. 2001). Através desta representação combinatorial, o sistema olfatório é capaz de distinguir moléculas extremamente semelhantes, associando-as a sensações completamente distintas. Por exemplo, a diferença de alguns átomos em uma molécula pode levar a sensações tão distintas quanto o perfume de rosas e o odor de ranço (Figura 7B).

Experimentos realizados com enantiômeros, os quais são compostos com idêntica composição molecular e que diferem somente no arranjo tri-dimensional dos seus grupos atômicos (moléculas-espelho) demonstraram que o sistema olfatório é capaz de discernir entre tais compostos, através da ativação de receptores específicos para cada um deles, combinado com a ativação de receptores compartilhados (Rubin e Katz 2001).

O modelo de representação dos odores foi proposto somente para os ORs, mas é consenso extrapolar tal modelo para os demais receptores do Sistema Olfatório. Experimentos realizados com VIRs sugerem que o mesmo modelo de codificação dos odores pode ser aplicado para esta família de receptores (Isogai et al. 2011).

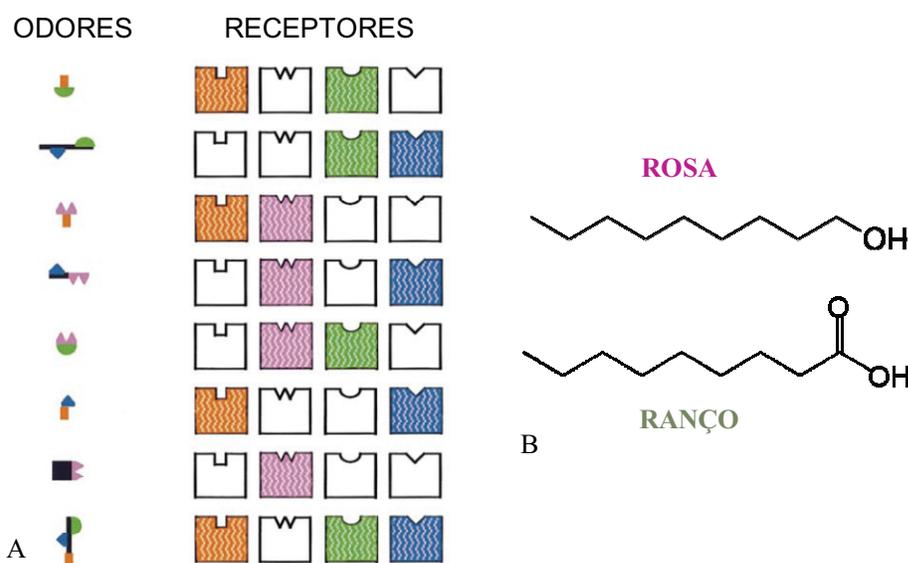


Figura 7 – Representação de estímulos olfatórios pelos receptores de odores A: Modelo de representação dos odores pelos receptores do Sistema Olfatório. Os receptores representados com cores são os receptores responsáveis pela detecção das moléculas de odores esquematizadas em cada linha. A identidade das moléculas de odores é definida pela combinação de receptores que as detectam. B: Exemplo ilustrativo da divergência de sensações que moléculas semelhantes estruturalmente são capazes de ocasionar. Isto é possível através da ativação de diferentes combinações de receptores, que são processadas pelo sistema nervoso central, culminando em diferentes sensações. Figura: (A) Modificada a partir de Malnic et al. 1999.

1.3.2. Organização do Bulbo Olfatório Principal

O bulbo olfatório principal (Main Olfactory Bulb - MOB) representa a primeira estação de processamento cerebral da informação detectada pelo MOE, recebendo as projeções axonais dos neurônios sensoriais olfatórios (OSNs). O bulbo olfatório fica posicionado em

posição anterior no cérebro murino, ocupando a parte ventral do prosencéfalo. Em posição adjacente, está localizado o MOE, separado do bulbo pela placa cribiforme, porção óssea perfurada por onde trafegam os feixes de axônios dos neurônios sensoriais olfatórios. No bulbo estão situados os neurônios de segunda-ordem da via olfatória, denominados células mitrais, bem como interneurônios. Estas células realizam os primeiros estágios de processamento da informação olfatória (Kandel et al. 2000). Os corpos celulares das células mitrais ocupam uma camada bem definida no MOB, e cada célula mitral envia um único dendrito em direção a um único glomérulo na porção mais superficial do bulbo (Figura 8). Cada glomérulo é uma estrutura globosa, envolta em células periglomerulares, e diferentes glomérulos estão dispostos lado a lado na parte cortical do bulbo. No interior de cada glomérulo, os dendritos das células mitrais estabelecem sinapses com axônios provenientes dos neurônios sensoriais olfatórios. As células mitrais enviam axônios ao longo do trato olfatório para outras regiões do cérebro, e, portanto, podem ser considerados neurônios de projeção. Além das células mitrais, o bulbo possui neurônios e interneurônios que participam das conexões neurais locais, como as células granulares (Kandel et al. 2000).

No MOE, como descrito anteriormente, cada OSN expressa apenas um dentre as centenas de genes de ORs. Além disso, os axônios dos OSNs que expressam o mesmo receptor OR convergem para dois glomérulos específicos em cada MOB, um em posição mais medial e um em posição lateral. Portanto, cada glomérulo do MOB representa um único tipo de receptor na interface sensorial (Figura 8). Cada célula mitral projeta seus dendritos para apenas um glomérulo, mantendo o mapa olfatório formado no MOE (Ressler et al. 1994; Vassar et al. 1994; Mombaerts et al. 1996). Dessa forma, para cada população de neurônios funcionalmente idêntica (isto é, expressando o mesmo receptor), há dois glomérulos por bulbo. A posição topográfica destas estruturas é conservada entre os bulbos direito e esquerdo e entre diferentes indivíduos da mesma espécie (Munger et al. 2009; Sakano 2010).

A organização das posições dos glomérulos no MOB parece obedecer algumas regras: ORs que detectam feições moleculares semelhantes tendem a projetar axônios para glomérulos vizinhos, criando áreas no MOB dedicadas a determinados grupos moleculares como aldeídos e álcoois (Rubin e Katz 1999; Uchida et al. 2000; Meister e Bonhoeffer 2001; Mori et al. 2006). Dentro de cada área, propriedades moleculares secundárias como tamanho da cadeia

carbônica parecem estabelecer alguma organização entre os glomérulos (Uchida et al. 2000; Mori et al. 2006).

Uma das grandes questões a respeito da organização dos sistemas olfatórios refere-se ao processo de direcionamento dos axônios dos neurônios quimiossensoriais. Estes neurônios são gerados no epitélio sensorial durante toda a vida do indivíduo. Durante este processo, o neurônio sensorial em diferenciação passa a expressar um dentre os milhares de possíveis receptores olfatórios e, em seguida, envia um único axônio para se conectar com o glomérulo adequado no bulbo olfatório, ou seja, aquele que já possui axônios de neurônios olfatórios expressando o mesmo receptor (neurônios cognatos). Como este processo de direcionamento axonal ocorre é uma das questões-chave no estudo atual do Sistema Olfatório, e ainda não foi totalmente elucidada.

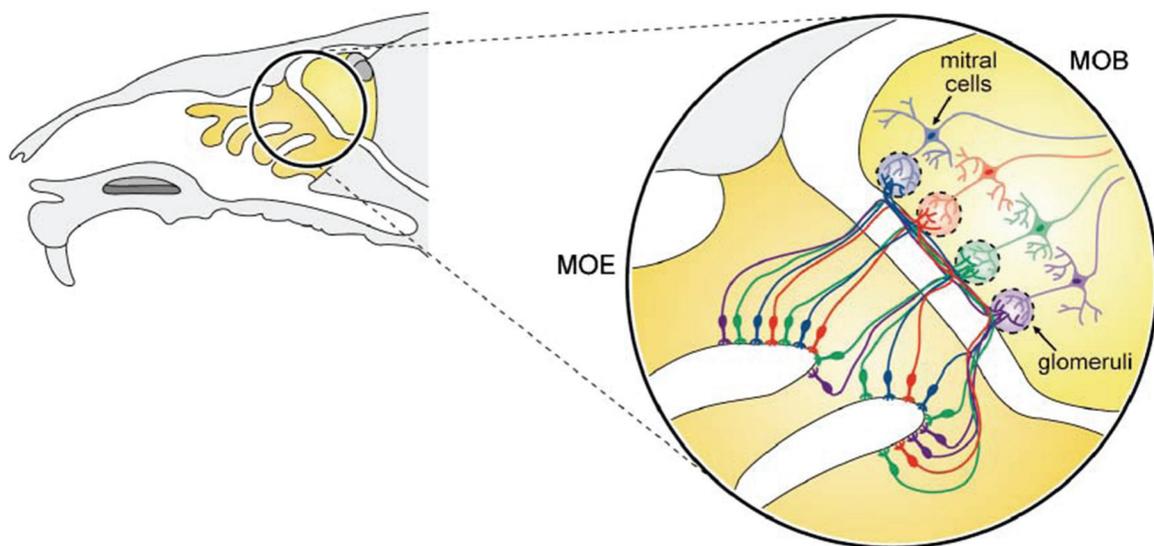


Figura 8 – Organização celular no Sistema Olfatório Principal. Os OSNs do MOE que expressam determinado receptor lançam seus axônios para os mesmos glomérulos no MOB, formando um mapa olfatório neste órgão, em que cada glomérulo (há 4 para cada receptor, em geral) representa um OR. Além disso, cada célula mitral (neurônios de segunda ordem) projeta dendritos para apenas um glomérulo olfatório. Esquema retirado de Dulac e Wagner, 2006.

As células mitrais do MOB lançam suas projeções para diversas regiões do cérebro, dentre elas o córtex olfatório ou piriforme, principal região de processamento da informação olfatória provinda do MOE. A organização do mapa de odores existente na região do MOB parece se desfazer no córtex piriforme (Stettler e Axel 2009; Ghosh et al. 2011; Miyamichi et al.

2011; Sosulski et al. 2011). Estudos recentes apontam que a informação do córtex piriforme é organizada de maneira associativa, e não inata, uma vez que foi demonstrado que um conjunto específico de neurônios do córtex piriforme pode ser associado à resposta de distintos odores e a indução de comportamentos divergentes (Choi et al. 2011).

1.3.3. Organização do Bulbo Olfatório Acessório

O Bulbo Olfatório Acessório (Accessory Olfactory Bulb - AOB) é localizado em posição dorsal-posterior em relação ao MOB. Sua organização contrasta com a do MOB em muitos aspectos. Anatomicamente, embora semelhante ao MOB, o AOB apresenta glomérulos irregulares e heterogêneos, dificultando a sua delimitação. Os neurônios sensoriais do VNO projetam seus axônios não para um ou dois glomérulos do AOB, como é o caso do MOB, mas para 10 a 30 glomérulos distintos. De maneira geral, tais glomérulos recebem axônios de neurônios expressando o mesmo VR, assim como no MOB, porém pode haver exceções (Belluscio et al. 1999; Rodriguez et al. 1999; Del Punta et al. 2002a).

Há uma divisão nítida no AOB, a qual acompanha a divisão do VNO, na qual neurônios V1Rs (camada apical do VNO; $G\alpha i2^+$) projetam seus axônios para a porção anterior do AOB, enquanto que neurônios V2Rs (camada basal do VNO; $G\alpha o^+$) direcionam seus axônios para a porção posterior do AOB (Figura 9; Shinohara et al. 1992; Jia e Halpern 1996).

Contrastando com o observado para o MOB, onde a posição dos glomérulos parece ser invariante (Mombaerts et al. 1996), a localização dos glomérulos no AOB parece ser pouco conservada entre indivíduos, mesmo entre os dois AOBs do mesmo indivíduo (Rodriguez et al. 1999). Portanto, a representação espacial dos receptores vomeronasais no AOB apresenta organização complexa, além de ser sujeita à variação individual. Esta é uma das características mais contra-intuitivas deste sistema, uma vez que o VNO está associado a comportamentos inatos e estereotipados (invariáveis entre indivíduos) (Dulac e Wagner, 2006).

Além da complexidade organizacional relacionada às projeções axonais dos neurônios do VNO e à posição variável dos glomérulos, há um terceiro fator que dificulta a determinação de um mapa olfatório no AOB. As células mitraes (neurônios de segunda ordem) deste órgão projetam seus dendritos para mais de um glomérulo (Takami e Graziadei, 1990 e 1991). Além disso, não está claro se tais glomérulos correspondem a receptores idênticos. As

últimas evidências apontam para uma interação heterotípica seletiva, ou seja, a mesma célula mitral projeta dendritos para glomérulos de receptores distintos, porém relacionados (Wagner et al. 2006; Dulac e Wagner et al. 2006).

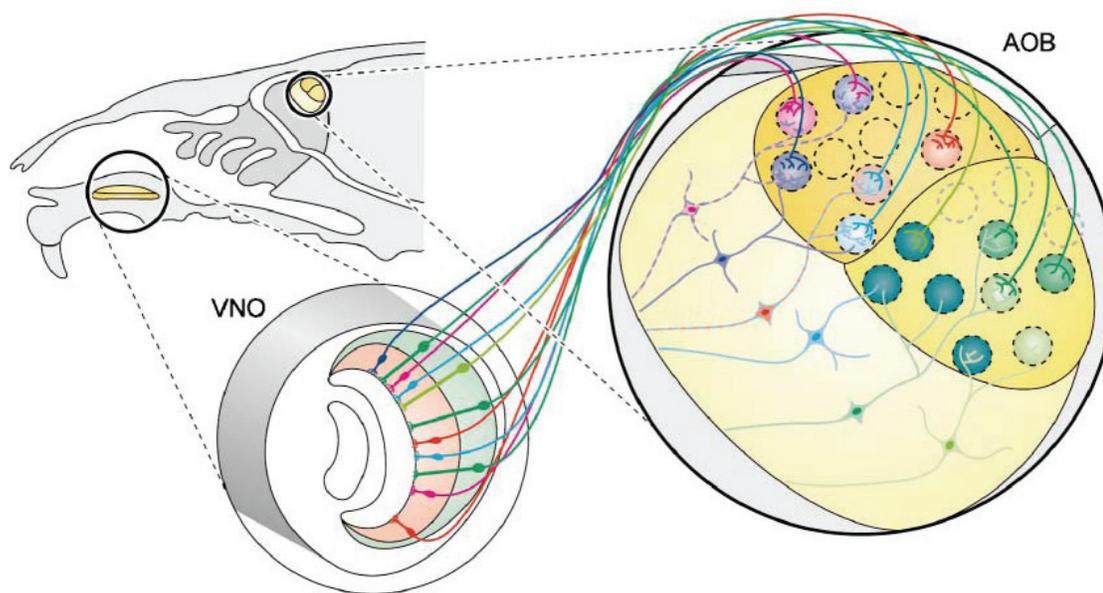


Figura 9 - Organização anatômica no Sistema Olfatório Acessório. Os neurônios sensoriais do VNO que expressam determinado receptor lançam seus axônios para múltiplos glomérulos no AOB. Cada glomérulo recebe axônios de neurônios expressando o mesmo receptor, assim como no MOB. Uma célula mitral pode projetar dendritos para glomérulos de mesma ou de diferentes origens, criando um complexo mapa organizacional. Esquema retirado de Dulac e Wagner, 2006.

Estudos recentes apontam que neurônios vomeronasais disparam potenciais de ação espontâneos, tão intensos quanto os provocados por estímulos olfatórios (Arnson e Holy 2011). Tal fato, agregado à complexa organização do AOB, constitui um panorama que dificulta a compreensão de como os odores são representados pelo Sistema Vomeronasal. Além disso, a falta de estudos mais detalhados sobre receptores do VNO e seus ligantes dificultam a compreensão da organização deste sistema. Até pouco tempo, apenas dois VRs haviam sido caracterizados quanto aos ligantes que detectam (Boschat et al. 2002; Haga et al. 2007; Haga et al. 2010), um receptor V1R para 2-heptanona e um receptor V2R para ESP1 ('Exocrine Gland Secreting Peptide'). Trabalhos recentes, como o de Isogai et al. (2011) procuraram caracterizar outros VRs quanto aos seus ligantes. Estudos da interação receptor-ligante configuram o primeiro passo para uma maior compreensão de como o Sistema Vomeronasal é organizado. A

investigação da relação entre receptores e os estímulos olfativos do Órgão Vomeronasal é o foco principal do trabalho desenvolvido na presente tese.

1.4. O Sistema Olfatório Vomeronasal e a Indução de comportamentos inatos

O Sistema Vomeronasal é tradicionalmente associado à detecção de semioquímicos (compostos de comunicação entre animais). Dentre estes compostos, os mais bem descritos são os feromônios, moléculas associadas à comunicação intra-específica (Tirindelli et al. 2009). Estes compostos desencadeiam mudanças hormonais e de comportamento de forma inata (pré-programada) e estereotipada, ou seja, invariável entre indivíduos de uma mesma espécie (Dulac e Torello, 2003; Tirindelli et al., 2009). Funções descritas para os feromônios incluem a indução de comportamentos sexuais, de agressividade, alarme, territorialidade e amamentação.

Um dos mais conhecidos comportamentos mediados pelo VNO é o efeito Bruce, ou bloqueio seletivo da gravidez (Bruce 1959; Halpern e Martínez-Marcos 2003). Fêmeas expostas a odores de machos estranhos antes da implantação do embrião abortam a gravidez, o que não ocorre quando o macho é o mesmo do momento da cópula. O efeito fisiológico da exposição ao macho estranho é um decréscimo na produção de prolactina, levando ao bloqueio da gravidez (Bellringer et al. 1980). Este efeito sugere que a fêmea cria uma memória olfatória durante a cópula com os odores do macho com o qual está copulando, de modo a inibir o bloqueio da gravidez. Modificações sinápticas no AOB ocorrem simultaneamente ao estabelecimento desta memória olfatória, sugerindo a participação destas alterações no processo de consolidação da memória (Matsuoka et al. 1997). Tais alterações sinápticas decorrentes da exposição aos odores do ambiente devem estar relacionadas com a complexa organização celular do AOB. Evidências apontam que proteínas da família das MUPs ('Major Urinary Proteins') são os estímulos olfatórios responsáveis pela indução do Efeito Bruce (Brennan et al. 1999). Estas proteínas apresentam dezenas de variantes no genoma de camundongos, e são secretadas abundantemente na urina (Logan et al. 2008). O efeito Bruce ilustra um comportamento inato mediado pelo VNO que é dependente do aprendizado e do estabelecimento de uma memória olfatória.

O estudo da indução de comportamentos inatos mediados pelo VNO é fundamental para a compreensão da organização molecular deste subsistema olfatório, bem como das vias neurais envolvidas em respostas comportamentais deflagradas por estimulação sensorial. Diversas respostas comportamentais são conhecidas e associadas ao VNO. Entretanto, não se conhecem os mecanismos moleculares envolvidos na indução e processamento destas respostas. Neste contexto, o presente trabalho se propôs a estabelecer um método para a investigação da relação receptor-ligante no VNO e aplicá-lo ao estudo do comportamento de medo induzido por odores de predadores em camundongos.

1.4.1 Os odores de predadores e a indução do comportamento de medo em roedores

A habilidade dos animais em detectar de maneira inata os odores de predadores representa uma grande vantagem seletiva. Tal habilidade está presente mesmo em linhagens de roedores mantidas por centenas de gerações em laboratório (Dielenberg e McGregor 2001; Takahashi et al. 2005; Papes et al. 2010). Comportamentos específicos de medo e fuga em camundongos são induzidos pelos odores de predadores, tais como distanciamento, ‘congelamento’, entre outros (Blanchard et al. 2001).

Os odores de predadores são semioquímicos denominados cairomônios, sinais químicos liberados por uma espécie e detectados por outra, para benefício da espécie receptora e prejuízo da espécie doadora. Por isso neste trabalho tais odores são denominados Cairomônios Fobiogênicos de Predadores (ou CFPs). Recentemente foi demonstrado que estes CFPs são detectados pelo VNO em camundongos (Papes et al., 2010; Shaul et al. 2010). Pela primeira vez, foi demonstrado que o VNO de mamíferos está relacionado com a detecção de compostos associados à comunicação interespecífica. Além disso, estes cairomônios foram purificados e identificados como uma proteína da família das ‘Proteínas Majoritárias da Urina’ (Major Urinary Proteins – MUPs; Papes et al. 2010). Estas, como o nome sugere, estão presentes na fração de proteínas contidas na urina de mamíferos, sendo também secretadas pelas glândulas mamárias, salivares e lacrimais (Finlayson et al. 1965; Skoza e Paigen 1978). Tais proteínas pertencem ao grupo das lipocalinas, correspondente a proteínas de transporte de pequenas moléculas orgânicas. Estas pequenas moléculas carregadas pelas MUPs apresentam função feromonal (Tirindelli et al. 2009).

Curiosamente, o estímulo de predadores que gera comportamentos defensivos em camundongos é da mesma família do estímulo que causa comportamentos agressivos entre machos de roedores (Chamero et al. 2007). Foi demonstrado que MUPs purificadas da urina de camundongos agem como feromônios, sendo essenciais para a deflagração de comportamento agressivo entre machos desta espécie. Tal divergência de comportamentos induzida por moléculas tão semelhantes é intrigante, uma vez que estas devem compartilhar receptores envolvidos na sua detecção, e que de alguma forma, levam à indução de respostas comportamentais distintas. A determinação dos receptores específicos associados à detecção de MUPs de camundongos e de MUPs de predadores irá auxiliar a solucionar esta questão.

1.5. Identificação de relações receptor-ligante no Sistema Olfatório

A identificação de relações receptor-ligante no Sistema Olfatório é crucial para a compreensão molecular da organização deste sistema (Mombaerts 2004b). Visando a este objetivo, diversas estratégias foram empregadas nos últimos anos na tentativa de elaboração de um método para identificação de receptores associados a determinado odor. Todas as técnicas desenvolvidas se baseiam na regra “um neurônio – um receptor”, a qual estabelece que um neurônio sensorial expressa apenas um dentre as centenas de genes de receptores olfatórios.

1.5.1 Gene targeting

Este método consiste na criação de linhagens de camundongo na qual a expressão de um marcador, em geral fluorescente, é associada à expressão de um determinado receptor olfatório. A associação da expressão é realizada através da substituição do gene selvagem do animal por uma construção contendo o gene para o receptor, um sítio interno para início da tradução (Internal Ribosomal Entry Site – IRES), e o gene para o marcador fluorescente. A sequência IRES permite que um mRNA bicistrônico seja funcional em camundongos (Kim et al. 1992), o que garante a correta formação da proteína do receptor, independente da proteína do marcador fluorescente. Dessa maneira, os neurônios que expressam determinado receptor são evidenciados por marcação fluorescente, podendo ser avaliados quanto à resposta a determinado grupo de odores, geralmente através de eletrofisiologia em neurônios dissociados, ou ensaio de cálcio intracelular (descrito na seção 1.5.3; Mombaerts 2004b).

Este método foi utilizado para a identificação da primeira relação de receptor-ligante no órgão vomeronasal. Para tanto, foi criada uma linhagem de camundongos na qual a expressão do receptor V1rb2 foi associada à da proteína fluorescente verde (Green Fluorescent Protein - GFP), através da construção V1rb2-IRES-GFP. Ensaios foram realizados com neurônios fluorescentes dissociados submetidos a medições de eletrofisiologia, e foi identificado que o receptor em questão detecta 2-heptanona, um constituinte da urina que promove a extensão do ciclo estral (Boschat et al. 2002).

1.5.2. Expressão heteróloga

A expressão de receptores do Sistema Olfatório em sistemas heterólogos, notadamente ORs em células HEK, constitui o principal método utilizado até o momento para a identificação de relações receptor-ligante (Mombaerts 2004b; Touhara 2007). As dificuldades envolvendo esta estratégia estão associadas à expressão instável das proteínas dos receptores olfatórios na membrana celular, uma vez que moléculas específicas são requeridas (Saito et al. 2004). Apesar do sucesso da aplicação desta técnica para a identificação de ligantes para dezenas de receptores olfatórios, a técnica apresenta limitações. Relações receptor-ligante identificadas através de expressão heteróloga podem não indicar as relações existentes *in vivo* (Oka et al. 2006). Além disso, para o caso do VNO, não é conhecido nenhum sistema heterólogo eficiente para a expressão de receptores vomeronasais até o momento.

1.5.3 RT-PCR de células individuais e ensaio de cálcio intracelular

O PCR feito com o cDNA de poucos neurônios sensoriais dissociados (Single-Cell RT-PCR) é um método que foi aplicado para a identificação da relação receptor-ligante de alguns ORs (Mombaerts 2004b; Touhara 2007). Este método se baseia em uma pré-amplificação do cDNA total da célula, que precede a amplificação do fragmento-alvo. Esta amplificação é possível através da adição de uma cauda poli-A ao cDNA recém-sintetizado, que permite a amplificação do cDNA total através de PCR prévio com primer poli-T (Brady et al. 1990).

O método de identificação de receptores a partir de RT-PCR de células individuais é utilizado em combinação com outras técnicas capazes de indicar ativação neuronal decorrente da exposição a determinado estímulo olfatório. Em geral, o ensaio de cálcio intracelular é a metodologia utilizada. Neste método, um corante fluorescente artificial é introduzido nos

neurônios sob análise, funcionando como indicador da entrada de cálcio na célula após disparo de potencial de ação.

A combinação destas técnicas representa um método factível, porém laborioso e sujeito a contaminações, devido à dificuldade de captura de células individuais nas condições adequadas (Mombaerts 2004).

1.5.4 Genes de Expressão Imediata

Uma maneira indireta para medir a ativação neuronal baseia-se na detecção da expressão de ‘genes de expressão precoce ou imediata’ (‘Immediate Early Genes’ – IEGs), dentre os quais se destacam os genes *c-Fos*, *c-Jun*, *Homer1a*, *Arc2* e *Egr1*. Os IEGs têm sido utilizados para a detecção da ativação de neurônios em diversas regiões do cérebro (Sagar et al. 1988). Quando um neurônio sofre disparo de potencial de ação, mRNAs e proteínas de um ou mais destes IEGs são produzidos na célula de forma transitória, e podem então ser detectados através do uso de técnicas de Biologia Molecular, como hibridação *in situ* ou imunohistoquímica.

Funcionalmente, diferentes IEGs estão relacionados com atividades distintas, e há indícios de que diferentes IEGs são ativados através de diferentes vias de transdução de sinal intracelular (Clayton 2000). Os IEGs mais conhecidos, *c-Fos* e *Egr-1*, atuam como fatores de transcrição, enquanto outros estão associados à estrutura das sinapses ou à sinalização intracelular (Clayton 2000; Kóvacs 2008).

Uma estratégia baseada na utilização de IEGs foi utilizada com sucesso na identificação do receptor vomeronasal para o peptídeo ESP1 (Exocrine Gland-Secreting Peptide). Este peptídeo é secretado pelas glândulas lacrimais de machos de camundongos e está envolvido no aumento da receptividade sexual em fêmeas (Haga et al. 2007; Haga et al. 2010). A estratégia empregada combinou a marcação para neurônios ativados pelo peptídeo ESP1 através de imunohistoquímica para *c-Fos* com sondas e anticorpos específicos para receptores vomeronasais (Haga et al. 2007). Recentemente, uma estratégia semelhante foi empregada para caracterizar o perfil de relações entre receptor-ligante no órgão vomeronasal, utilizando uma gama variada de estímulos olfatórios (Isogai et al. 2011). Neste caso, os neurônios ativados eram marcados através de hibridação *in situ* para *Egr-1*.

A estratégia de identificação de receptores vomeronasais envolvendo IEGs apresenta vantagens em relação às alternativas descritas anteriormente por ser a de mais simples e rápida aplicação. Além disso, este método permite a investigação das relações receptor-ligante *in vivo*, o que garante o significado biológico dos resultados obtidos, diferentemente das demais estratégias, realizadas em neurônios dissociados ou sistemas heterólogos. As condições do microambiente da detecção *in vivo*, a exemplo da presença do muco da cavidade nasal, parecem ser cruciais na detecção dos estímulos olfatórios (Oka et al. 2006).

Neste trabalho, foi testada uma combinação de técnicas para identificar os receptores expressos em neurônios do VNO ativados na presença de estímulos químicos específicos (caïromônios fobiogênicos de gatos e ratos). Como será detalhado no item ‘Estratégia Experimental’, a expressão de IEGs foi escolhida para identificar neurônios ativados após exposição aos CFPs (ver Apêndices para as demais estratégias testadas). Este método foi preferido em relação aos demais devido à facilidade de aplicação e aos exemplos de sucesso descritos na literatura na identificação de receptores vomeronasais.



Objetivos

2. OBJETIVOS

O objetivo central deste trabalho foi identificar os receptores envolvidos na detecção de odores específicos. Com isso, nosso propósito é contribuir para o entendimento do processo de detecção de compostos pelo sistema olfatório e sua representação no cérebro.

Neste contexto, o paradigma experimental utilizado neste trabalho baseou-se na capacidade de estímulos químicos provenientes de predadores de camundongos induzirem comportamentos de medo e fuga nestes animais (Papes et al. 2010). Dessa maneira, além de contribuir para o entendimento do modo de funcionamento do Sistema Olfatório, este trabalho almeja auxiliar na compreensão de como um comportamento estereotipado é induzido por estímulos químicos específicos.

Especificamente, os objetivos do trabalho foram:

- 1- Desenvolver uma metodologia para identificar os receptores que participam da detecção de determinado estímulo no Órgão Vomeronasal.
- 2- Aplicar a metodologia desenvolvida na caracterização dos receptores responsivos aos estímulos fobiogênicos de predadores.
- 3- Avaliar o resultado do item 2 e suas implicações para a compreensão da relação estímulo químico X resposta comportamental, bem como para o melhor entendimento da organização do sistema olfatório.



*Estratégia
Experimental*

3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Este trabalho visou, sobretudo, a identificar os receptores envolvidos na detecção dos odores de predadores que induzem comportamento de medo em camundongos (caimomônios fobiogênicos de predadores – CFPs). Para atingir tal objetivo, a abordagem empregada baseou-se na peculiar característica do sistema olfatório na qual cada neurônio olfatório expressa apenas um dentre as centenas de genes de receptores – ou seja, um neurônio - um gene de receptor (Ngai *et al.* 1993; Ressler *et al.* 1993; Vassar *et al.* 1993). Com isso, através de imunohistoquímica ou hibridação *in situ* utilizando anticorpos ou sondas específicas, seria possível identificar o receptor expresso por determinado neurônio sensorial.

Neste trabalho, a estratégia elaborada para a identificação dos receptores responsivos aos CFPs empregou marcadores capazes de evidenciar grupos específicos de neurônios olfatórios em combinação com marcadores que indicam ativação neuronal decorrente da exposição a determinado estímulo. Através da colocalização entre ambas as marcações, seria possível determinar os receptores envolvidos na detecção dos CFPs (o esquema apresentado na Figura 10 ilustra a estratégia geral).

O procedimento experimental empregado neste trabalho baseou-se na utilização de Genes de Expressão Imediata (IEGs) para marcar neurônios ativados (Haga *et al.* 2007). Como descrito na seção 1.5.4., a abordagem envolvendo IEGs foi escolhida pela facilidade de aplicação da técnica e pela rapidez na sua aplicação, além de possibilitar investigações *in vivo*, mais robustas e com significado biológico.

Os materiais utilizados nestes experimentos foram cortes de VNO de camundongos previamente expostos a odores de gatos ou a porção de alto peso molecular da urina de ratos, o qual representa um estímulo purificado (Papes *et al.* 2010). O emprego de tais estímulos possibilitaria, em tese, a identificação de neurônios específicos, gerando um resultado mais robusto e inequívoco em relação aos receptores essenciais para a deflagração do comportamento de medo a predadores em camundongos.

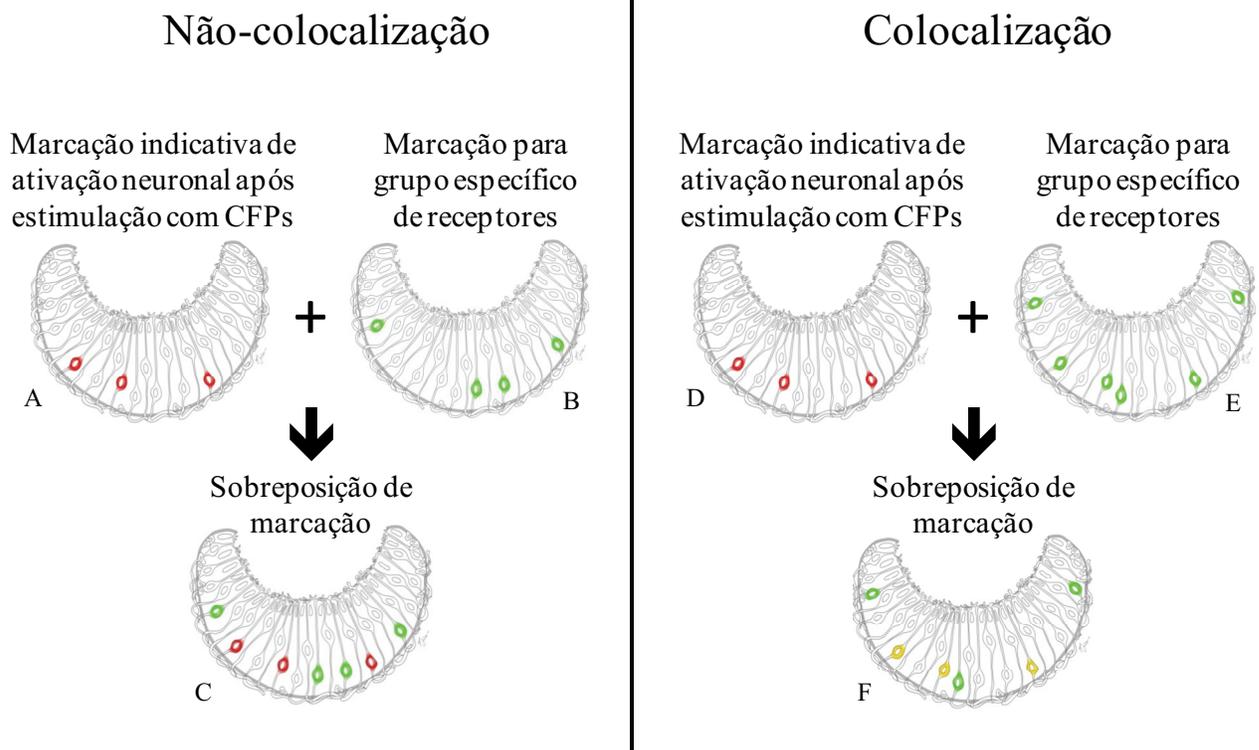


Figura 10- Estratégia geral utilizada para a identificação dos receptores dos CFPs. Os desenhos representam cortes transversais de VNO, em que se observam neurônios com marcação específica. “A, B e C” (assim como D, E e F) representam resultados obtidos em um mesmo corte de VNO submetido à hibridação *in situ* dupla. “A, B e C” representam um resultado negativo hipotético para a colocalização entre a marcação para ativação neuronal (A) e a marcação para grupo específico de receptores (B). “D, E e F” representam o resultado oposto, indicando que os neurônios responsivos aos CFPs fazem parte do grupo evidenciado em “E”. A coloração amarela representa a colocalização entre as marcações em verde e vermelho (F). Desenhos: Marília Justino.

A estratégia geral descrita na Figura 10 poderia ser muito laboriosa se apenas um receptor vomeronasal fosse marcado em cada ensaio experimental. A investigação dos 300 receptores do VNO (Figura 4B) um a um tornaria árdua a aplicação desta abordagem. Para simplificar e otimizar o trabalho, a sequência experimental proposta se baseia na utilização de marcadores para grupos de neurônios progressivamente mais específicos, a fim de se obter, ao final dos ensaios, os receptores específicos para os CFPs. Esta estratégia hierárquica pode ser dividida em três etapas (esquematizadas na Figura 11):

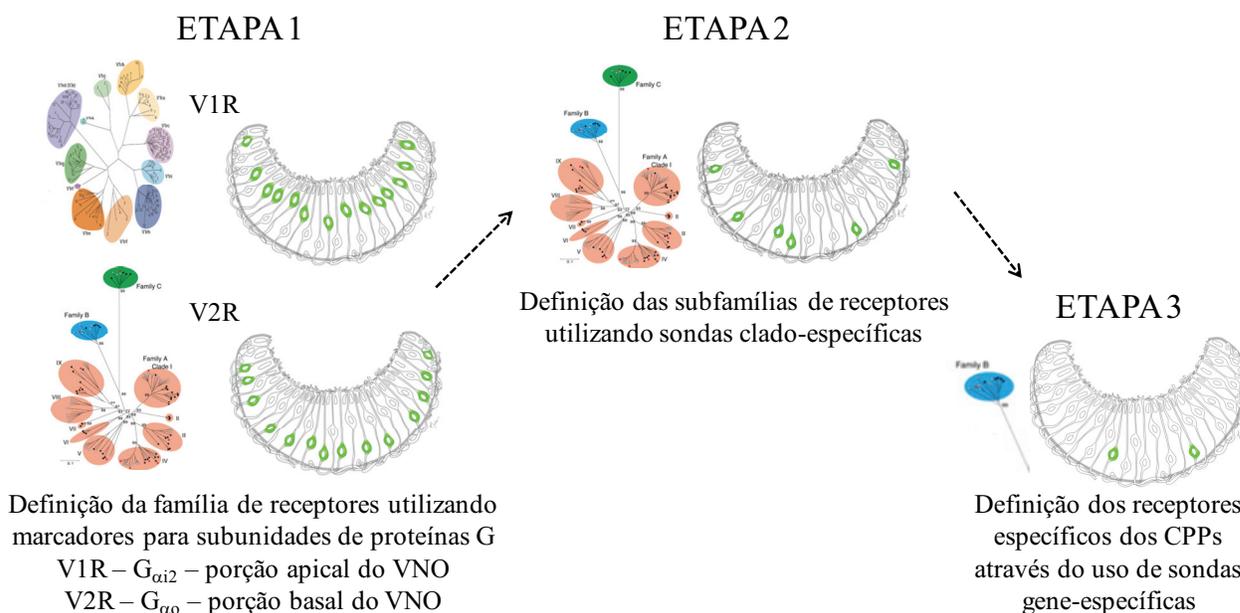


Figura 11 – Sequência de experimentos para identificação dos receptores de CFPs no VNO. As figuras representam cladogramas contendo os receptores olfatórios do VNO e cortes transversais de VNO, onde a marcação correspondente está indicada em verde. Detalhes da sequência experimental são encontrados no texto a seguir. Créditos das figuras: Cladograma V1R: Mombaerts 2004b; Cladograma V2R: Yang *et al.* 2005; Desenhos do VNO: Marília Justino.

1 – Primeiramente, os neurônios responsivos aos CFPs foram caracterizados quanto à expressão das isoformas $G_{\alpha i2}$ e $G_{\alpha o}$ de proteína G, os quais são marcadores moleculares das zonas apical e basal do VNO (vide Introdução - Shinohara, Kato e Asano 1992; Halpern, Shapiro e Jlia 1995; Berghard e Buck 1996). Estas zonas expressam classes distintas de receptores – V1R na zona apical e V2R na zona basal (Dulac e Axel 1995; Herrada e Dulac 1997; Matsunami e Buck 1997; Ryba e Tirindelli 1997). Desta forma, nesta fase, foi possível determinar a qual destas famílias de receptores pertence os receptores para os CFPs.

2- Em seguida, sondas específicas para cada subfamília de receptores V1R ou V2R foram utilizadas com o intuito de permitir a definição das subfamílias às quais pertencem os receptores dos CFPs, restringindo amplamente o universo de receptores sob análise (de cerca de 250 receptores para uma ou duas dezenas). As sondas para cada subfamília foram desenhadas de acordo com a similaridade de sequência entre os receptores (mais detalhes em Resultados).

3- Finalmente, sondas de hibridação *in situ* desenhadas especificamente para cada membro da subfamília identificada na fase anterior indicariam quais receptores são expressos pelos neurônios responsivos aos CFPs.

Em síntese, esta sequência experimental permitiria a obtenção do objetivo principal deste trabalho. Na seção Resultados, serão apresentadas as diversas etapas que foram empregadas tanto para o estabelecimento de um protocolo visando à apropriada implementação da abordagem descrita, bem como para a aplicação de tal estratégia rumo à identificação dos receptores de CFPs de gatos e ratos.

Estratégias alternativas à descrita também foram testadas neste trabalho, e encontram-se descritas na seção “Apêndices”.



Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Desenvolvimento de uma metodologia para a utilização de Genes de Expressão Imediata (IEGs) para detecção de neurônios ativados por estímulos quimiossensoriais no sistema olfatório

A detecção da ativação neuronal no sistema nervoso em geral, e em especial no sistema olfatório, é um dos entraves experimentais para o avanço da compreensão molecular deste sistema. Neste trabalho, um dos objetivos propostos era o de estabelecer uma metodologia capaz de identificar neurônios previamente ativados por determinado estímulo através da expressão de IEGs, marcadores indiretos da ativação neuronal, tradicionalmente utilizados em diversas regiões do sistema nervoso, porém escassamente empregados no VNO.

Um dos desafios para o estabelecimento de um método como o proposto envolvia a avaliação de diversos IEGs no VNO, a fim de encontrarmos o mais adequado para a aplicação em nossos experimentos futuros. Por isso, diversos IEGs foram testados: *Arc2*, *Homer1a*, *FosB*, *FosL1* e *Egr-1* (este último é também conhecido como KROX 24, Zif/268, NGF1-A). Foram realizados experimentos de imunohistoquímica e de hibridação *in situ* para a detecção da expressão destes genes após prévia estimulação com os estímulos olfatórios (Vide “Metodologia” para descrição do método utilizado para exposição aos estímulos olfatórios – previamente estabelecido por Papes et al. 2010).

4.1.1. Ensaios de imunohistoquímica para IEGs no VNO

A imunohistoquímica para IEGs foi testada paralelamente à hibridação *in situ* como metodologia para a identificação de neurônios do VNO ativados após estimulação com CFPs. A imunohistoquímica apresenta vantagens em relação à hibridação *in situ*, por se tratar de técnica mais simples, rápida, dispensando cuidados para a preservação do RNA do material. Além disso, há relatos de sucesso na utilização de imunohistoquímica para o IEG *c-Fos* para a identificação da ativação neuronal no VNO (*Kimoto et al.* 2005; Papes et al. 2010). No entanto, os anticorpos utilizados nestes trabalhos anteriores tiveram seu fornecimento comercial descontinuado. Desta forma, decidimos testar diferentes anticorpos comerciais para os IEGs *c-Fos* (2 versões policlonais e 1 versão monoclonal) e para *Egr-1* (1 versão monoclonal), buscando encontrar um anticorpo apropriado para a detecção de ativação nos neurônios vomeronasais. Estes foram os

IEGs testados por serem os mais comumente utilizados em outras regiões do sistema nervoso e que, portanto, apresentam anticorpos comercialmente disponíveis.

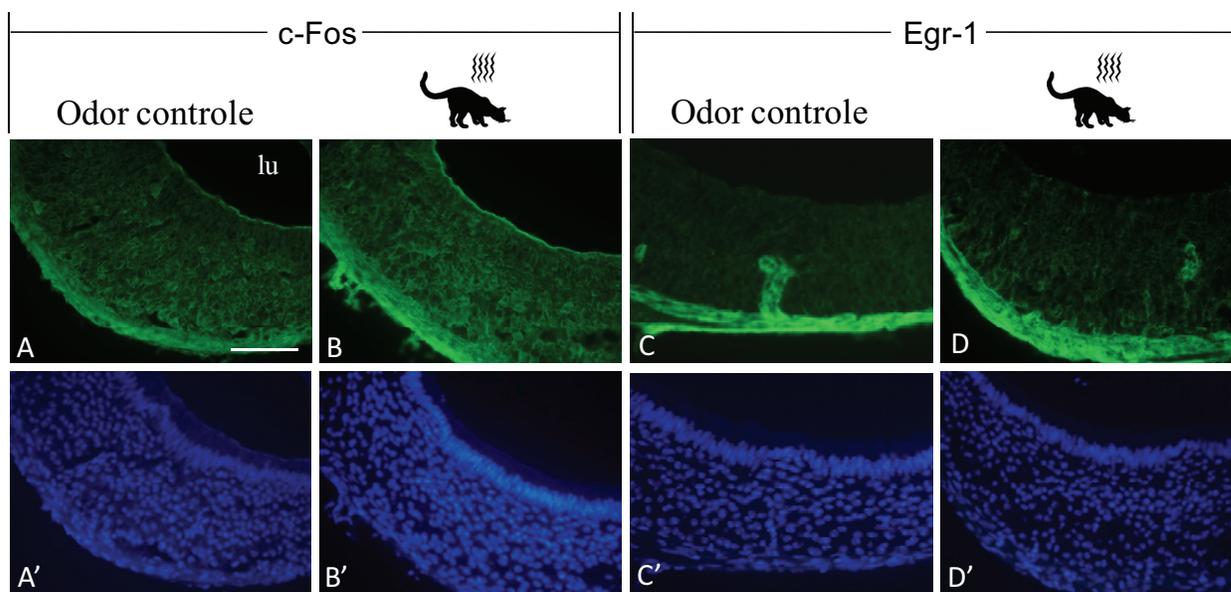


Figura 12 – Imunohistoquímica de IEGs em cortes de VNO. Imagens obtidas sob microscopia de fluorescência de imunohistoquímica realizada em cortes de VNO provenientes de animais expostos a estímulos fobiogênicos de gato por 45min. Notar a ausência de marcação diferencial no epitélio olfatório em relação aos controles. A: VNO de animal exposto a estímulo controle (gaze), anti-c-Fos policlonal; B: VNO de animal exposto a estímulos fobiogênicos, anti-c-Fos policlonal. C: VNO de animal exposto a estímulo controle (gaze), anti-Egr-1 monoclonal. D: VNO de animal exposto a estímulos fobiogênicos, anti-Egr-1 monoclonal. A', B', C', D': imagens evidenciando os núcleos celulares corados com o corante nuclear Hoechst 33258 (Sigma). "lu" = lúmen do VNO. Magnificação: 40x. Barra: 100µm.

Durante os ensaios de imunohistoquímica, testamos diversos métodos para a recuperação de antígenos. Estes métodos visam à permeabilização do material para exposição dos antígenos de modo a facilitar a interação antígeno-anticorpo. Os seguintes métodos foram testados: uso dos detergentes Triton X-100 ou SDS, incubação em solvente acetona, ou incubação a altas temperaturas (80°C). Diferentes tempos de fixação do material também foram empregados, com o intuito de evitar mascaramento do antígeno causado pelo excesso de fixação com solução de formaldeído (preparada a partir de paraformaldeído). Apesar da utilização destas variações, muitas vezes em conjunto com amplificação de sinal por tiramida, não obtivemos resultados satisfatórios nos testes realizados até o momento. Exemplos dos resultados de imunohistoquímica podem ser visualizados na Figura 12, onde é possível notar a ausência de

marcação diferencial no epitélio olfatório do VNO de animais submetidos à exposição com estímulos fobiogênicos, equivalendo-se ao observado no controle exposto à gaze limpa.

Diante destes resultados, concluímos que não foi possível utilizar imunohistoquímica para a detecção de neurônios ativados no VNO com os anticorpos contra Egr-1 e c-Fos disponíveis no mercado, apesar dos exemplos de sucesso anteriores (Kimoto *et al.* 2005; Papes *et al.* 2010). Vale ressaltar que estes anticorpos são utilizados com sucesso para a detecção da ativação neuronal em outras regiões do cérebro. Para excluir a hipótese de erro experimental, nossos anticorpos foram testados em cortes de cérebro, gerando resultados positivos, congruentes com o esperado (dados não mostrados).

4.1.2. Ensaios de hibridação *in situ* colorimétrica

A hibridação *in situ* de IEGs é uma das alternativas para marcação indireta da ativação neuronal no VNO, a qual pode ser combinada com marcações para receptores vomeronasais, de acordo com a estratégia experimental proposta (seção 3). Os ensaios de hibridação *in situ* foram planejados por permitir a avaliação de diversos IEGs, uma vez que não dependem da disponibilidade de anticorpos específicos, como ocorre com a imunohistoquímica.

Os experimentos de hibridação *in situ* foram realizados sobre cortes histológicos do VNO de animais previamente expostos a CFPs, ou seja, animais onde uma fração dos neurônios sensoriais vomeronasais foi ativada. Durante os ensaios de hibridação *in situ*, os seguintes controles foram utilizados: 1- controle negativo comportamental, utilizando-se animais expostos a gaze limpa e estéril; 2- controle negativo técnico, através da utilização de sondas sense; 3 - controle positivo, utilizando-se a sonda para OMP (sigla para “Olfactory Marker Protein”), cuja expressão é encontrada em todos os neurônios dos epitélios olfatórios (Keller e Margolis 1976; Johnson, Eller e Jafek 1993).

Foram produzidas sondas de RNA para diversos IEGs, bem como para o controle positivo OMP, utilizando RNA polimerases virais (Figura 13).

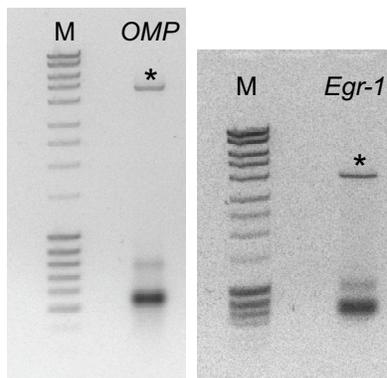


Figura 13 - Ribossondas para genes utilizados em ensaios de hibridação *in situ*. Exemplos de géis de agarose 1% utilizados para verificação da integridade de sondas anti-sense produzidas para os ensaios de hibridação *in situ*. Siglas: M- marcador molecular Mass Ruler (Fermentas) ; *OMP* - sonda para *OMP*; *Egr-1* - sonda para o IEG *Egr-1*; * - molde de DNA utilizado na transcrição.

Um experimento de hibridação *in situ* envolve diversas etapas ao longo de três dias de experimentação, consistindo, de maneira geral, na seguinte sequência de passos: Primeiramente, o material é submetido à fixação, necessária para evitar perdas de componentes do tecido durante as sucessivas lavagens durante o procedimento. Em seguida, promove-se a permeabilização do material, expondo os mRNAs do tecido, facilitando a interação entre a sonda e o RNA-alvo. Foram testados diferentes métodos para esta etapa, incluindo tratamento brando com proteinase K, incubação com HCl ou solução detergente, com o intuito de otimizar o método de permeabilização para maximizar o sinal ao final do experimento de hibridação e minimizar a degradação do tecido. Em seguida, o material é submetido à acetilação, visando à neutralização de cargas positivas no tecido através da incorporação de radicais acetato provenientes do anidrido acético. Tais cargas positivas, caso não neutralizadas, podem interagir inespecificamente com as ribossondas, levando a aumento do background ao final do experimento.

Após a acetilação, o material é finalmente incubado em solução de hibridação, composta de formamida e ácidos nucleicos, como tRNA de levedura e DNA de esperma de salmão, os quais ocupam sítios no tecido que poderiam interagir inespecificamente com as sondas de RNA. Diferentes soluções de hibridação foram testadas ao longo dos ensaios, diferindo na composição dos detergentes, sais e ácidos nucleicos. Após pré-incubação em solução de hibridação (pré-hibridação), o material é incubado em solução de hibridação contendo a sonda. Nesta etapa, as condições de incubação interferem na estringência da reação, ou seja, na

especificidade de interação entre a sonda e os ácidos nucleicos presentes no material, incluindo o mRNA alvo. De forma geral, temperaturas mais baixas e alta concentração de sal são menos estridentes, ou seja, permitem a interação da sonda de RNA com componentes com os quais exista baixa afinidade, enquanto altas temperaturas e concentração de sal baixa têm efeito contrário, aumentando a especificidade das interações. Temperaturas de hibridação diferentes (55-70°C) foram testadas ao longo dos experimentos.

Após hibridação por 16h, o material é submetido a lavagens em soluções com concentrações decrescentes de sal, a alta temperatura. O aumento da estringência ao longo das lavagens promove a dissociação da sonda de locais onde a interação é fraca, inespecífica, mantendo assim apenas a sonda que se associou fortemente ao mRNA correspondente, formando fragmentos de RNA dupla-fita. Após esta etapa, procede-se com um ensaio padrão de imunohistoquímica, utilizando-se anticorpo específico para a sonda marcada com digoxigenina (vide Metodologia).

4.1.3. Padronização do protocolo de hibridação *in situ* colorimétrica

Os primeiros ensaios de hibridação *in situ* realizados com cortes de VNO foram conduzidos com o objetivo de padronizarmos um protocolo adequado, ou seja, que gerasse resultados com marcação nítida e inequívoca, além de background reduzido. Para realizar tais ensaios, optamos por utilizar a sonda de *OMP*, cujo padrão de marcação é conhecido (Keller e Margolis 1976; Johnson, Eller e Jafek 1993) e que, portanto, atuaria com um ótimo indicador positivo em caso de sucesso no experimento. Como controle negativo, utilizamos cortes marcados com a sonda sense de *OMP*, os quais seriam úteis na avaliação do nível de background obtido nos ensaios.

Nesta fase, diversos protocolos de hibridação *in situ* foram testados, os quais variavam em inúmeros aspectos, como composição da solução de hibridação, tampões de lavagem, pré-tratamentos do material, etc. O protocolo escolhido para prosseguirmos para as próximas etapas foi o que, ao mesmo tempo tinha a execução mais simples e gerava resultados inequívocos e robustos, ou seja, capazes de serem reproduzidos sem dificuldade. Este protocolo encontra-se descrito em detalhes na seção 7, Metodologia.

Nestes primeiros testes, uma das variáveis que se mostrou determinante para a obtenção de bons resultados foi a temperatura de hibridação. Temperaturas de hibridação diferentes alteram fortemente o nível de background obtido, como pode ser observado na Figura 14.

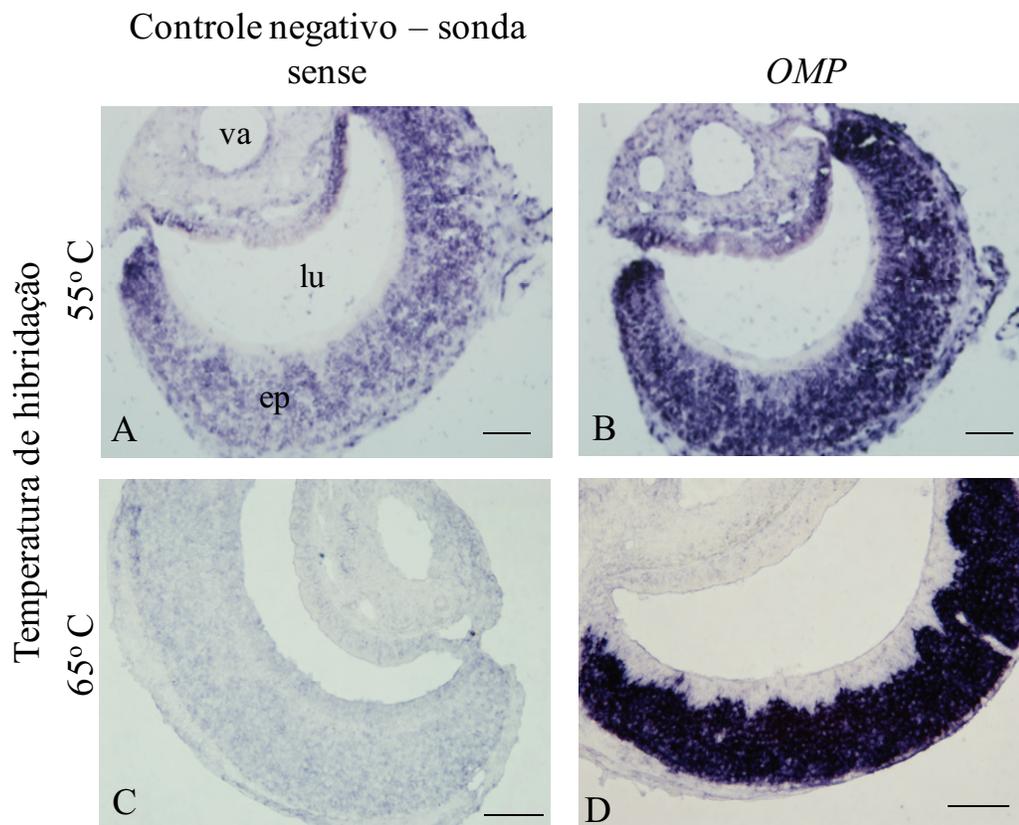


Figura 14 – Influência da temperatura de hibridação no resultado da hibridação *in situ*. Fotomicrografia de cortes do VNO após ensaio de hibridação *in situ*, no qual foi testado o efeito da temperatura de hibridação no resultado final. A coloração roxa indica a marcação correspondente à expressão do gene analisado. “A” e “C” indicam resultados com a sonda sense para OMP, mostrando o nível de background em cada temperatura testada. “B” e “D” representam os resultados obtidos para a sonda antisense de OMP, o qual é um marcador do epitélio neuronal olfatório. Em “D”, o nível de background é praticamente nulo, permitindo a visualização inequívoca da marcação. Siglas: ep - epitélio neuronal olfatório do VNO; lu - lúmen do VNO; va - vaso sanguíneo. Amplificação: 20x. Barra: 100µm.

O resultado ilustrado na Figura 14 permitiu a definição da temperatura de hibridação de 65°C como a mais adequada para a realização dos próximos ensaios. Como é facilmente notado na Figura 14, esta temperatura de hibridação mais alta possibilitou a redução do nível de background sem, contudo, prejudicar a observação da marcação realizada, o que poderia ocorrer no caso de temperaturas ainda maiores.

Estes primeiros resultados nos permitiram fixar 65°C como a temperatura de hibridação ideal para os próximos ensaios de hibridação *in situ*, ainda que sondas diferentes possam ter comportamentos ligeiramente distintos quanto aos parâmetros experimentais.

4.1.4. Definição de *Egr-1* como o IEG mais apropriado para o VNO

O protocolo padronizado permitiu a investigação de IEGs como potenciais indicadores indiretos de neurônios ativado no VNO. Os IEGs avaliados por hibridação *in situ* no VNO de animais expostos aos CFPs foram *Arc2*, *Homer1a*, *FosB*, *FosL1* e *Egr-1* (também conhecido como KROX 24, Zif/268, NGF1-A).

A avaliação dos IEGs foi feita em VNOs de animais submetidos aos CFPs de gatos, pois estes são de fácil obtenção. Nestes ensaios, o animal era sacrificado 45min após a exposição ao estímulo fobiogênico (ou à gaze limpa, no caso do controle).

Dentre os IEGs analisados (Figura 15), os resultados para *Arc2* não indicam marcação diferencial entre o controle e o exposto aos CFPs de gatos. No caso de *Homer1a*, embora haja mais marcação no material exposto, o nível de ‘background’ é elevado e dificulta a diferenciação de células positivamente marcadas. Já para *Egr-1*, foram observados resultados promissores, com células fortemente marcadas no material exposto previamente ao estímulo olfatório, e ausentes no controle. Portanto, a expressão de *Egr-1* representa um indicador indireto da ativação neuronal no VNO. Este resultado também foi encontrado por outro grupo, de forma independente: dentre os IEGs analisados no trabalho, *Egr-1* foi apontado como o mais adequado para a marcação de ativação neuronal no VNO (Isogai et al. 2011).

Este resultado indica que a expressão de *Egr-1* pode ser utilizada em combinação com marcadores específicos para receptores do VNO a fim de permitir a identificação dos receptores dos CFPs (vide “Estratégia experimental”).

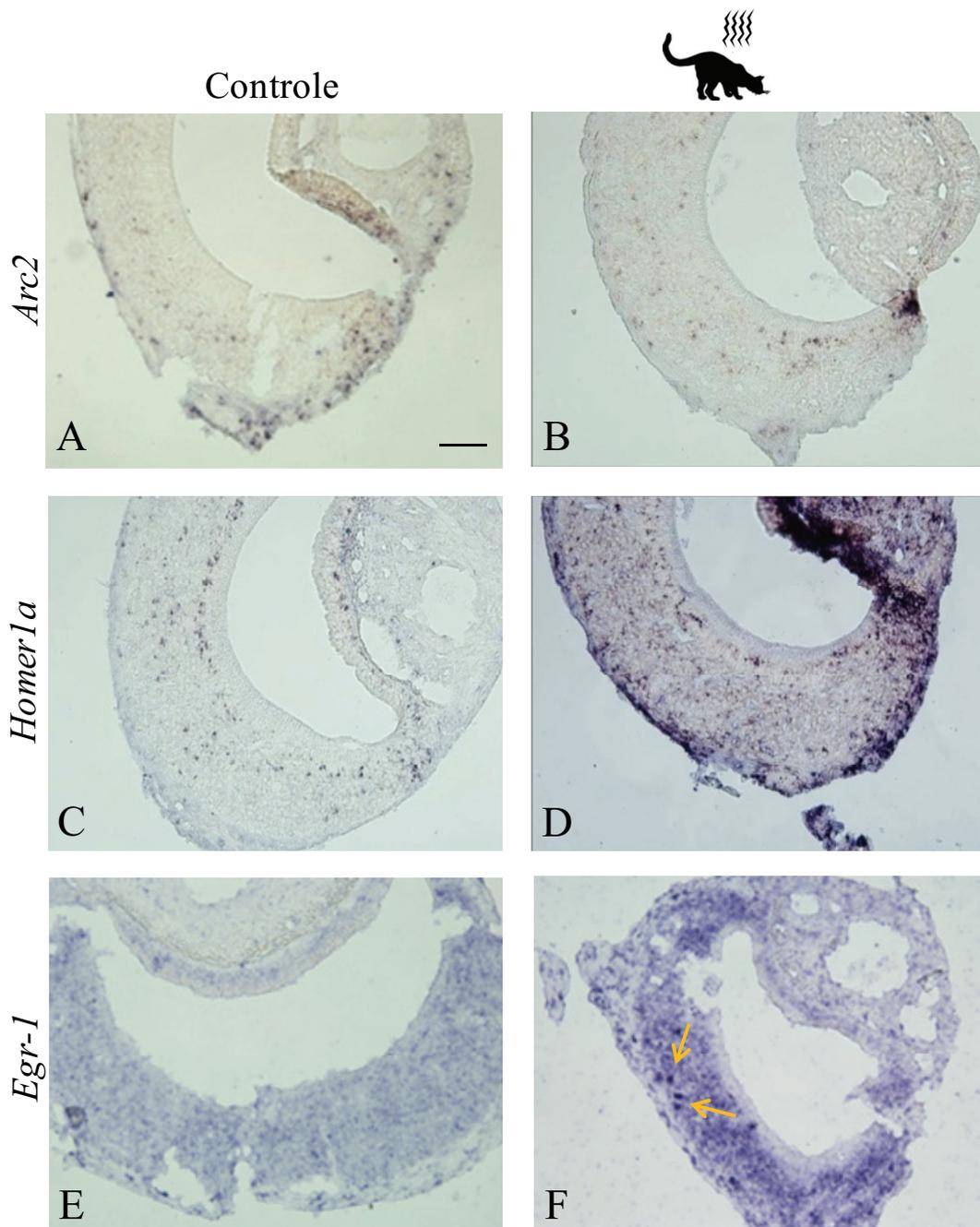


Figura 15 – Testes da indução da expressão de IEGs pelos CFPs. Fotomicrografia de cortes do VNO após ensaios de hibridação *in situ* para diferentes IEGs, indicados em cada linha. O controle corresponde ao VNO de animais expostos à gaze limpa e estéril. O CFP utilizado proveu de gatos. Notar que somente para *Egr-1* (E-F) é possível observar marcação diferencial entre o material exposto ao CFP (F) e o controle (E). As setas em laranja indicam exemplos de células *Egr-1* positivas, cuja marcação é facilmente discernível do background. Amplificação: 20x. Barra: 100µm.

4.1.5. Análise do 'time-course' de expressão de Egr-1 após exposição aos estímulos fobiogênicos de predadores

Um dos fatores que influenciam a robustez da hibridação *in situ* de *Egr-1* no VNO é, evidentemente, o nível de expressão de tal gene neste órgão. IEGs são expressos logo após o disparo do potencial de ação de um neurônio, atingindo um pico de expressão após determinado tempo, o qual é variável ao longo do sistema nervoso (Sagar et al. 1988). Logo, a determinação do tempo necessário para que *Egr-1* atinja o pico de expressão no VNO após estimulação com os CFPs (tempo no qual o animal seria sacrificado) iria otimizar a marcação obtida nos ensaios de hibridação *in situ*, possibilitando a observação mais precisa e acurada dos neurônios ativados.

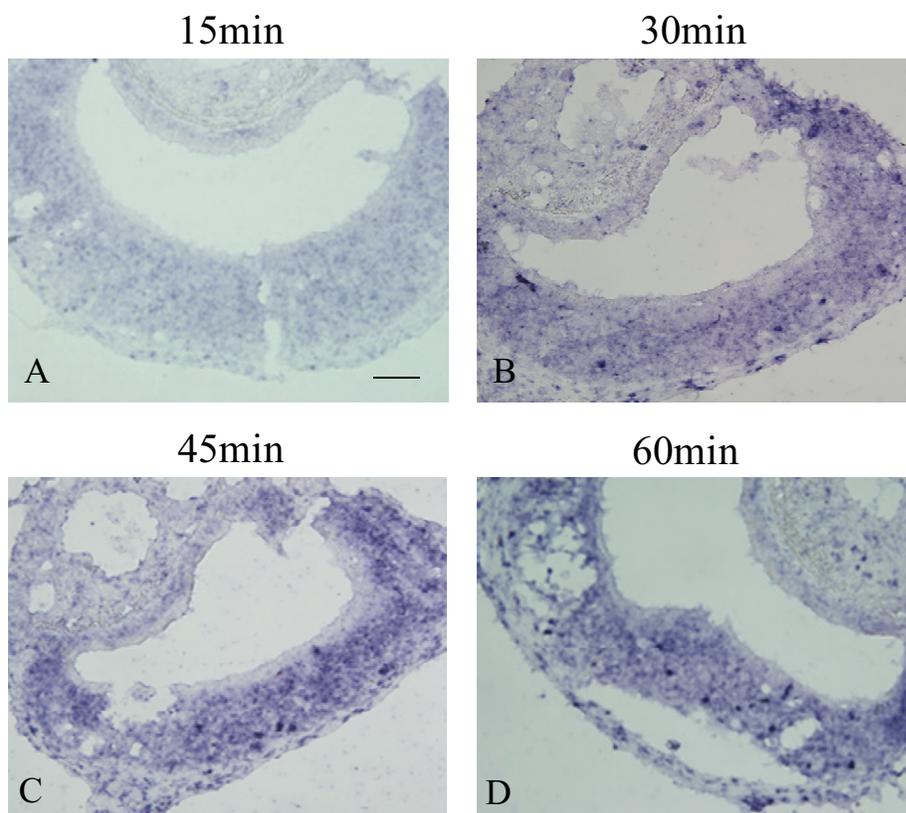


Figura 16 – Teste da influência do tempo na expressão de Egr-1 após exposição aos estímulos fobiogênicos de predadores. Fotomicrografias do resultado de hibridação *in situ* utilizando a sonda para *Egr-1* em VNOs de animais expostos aos CFPs de gato, e sacrificados após determinado tempo, indicado sobre a figura. Barra: 100 μ m.

Portanto, foram testados diferentes tempos para o sacrifício do animal, tomando como tempo zero o momento em que se iniciou a exposição do animal ao estímulo. O tempo de 45min

utilizado nos ensaios anteriores foi baseado em experiência prévia, e em trabalhos recentes da literatura (Isogai *et al*, 2011; Lin *et al*, 2010). Com base nestas informações, os tempos avaliados foram de 15, 30, 45 e 60min (Figura 16; posteriormente, 90min foram também testados, porém com resultados menos intensos do que 60min; dados não mostrados).

A observação da Figura 16 leva à conclusão imediata que 15min são insuficientes para a expressão do mRNA de *Egr-1* em níveis detectáveis através de hibridação *in situ*. Os demais tempos analisados apresentam resultados semelhantes, com algumas células fortemente marcadas. Como o tempo de 45min representa o tempo intermediário, este foi o tempo escolhido como padrão para os testes subsequentes nos experimentos executados nesta tese. Além deste fato, este tempo aproxima-se do utilizado em ensaios semelhantes realizados por outros grupos (Isogai *et al*, 2011; Lin *et al*, 2010), os quais utilizavam 40min de exposição.

4.1.6. Análise do efeito de concentração da sonda na redução do background e melhora da qualidade do resultado da hibridação *in situ* colorimétrica

O resultado obtido ao final da hibridação *in situ* colorimétrica ainda apresentava níveis de background elevados (vide Figura 16), mesmo com a determinação do tempo exato de dissecação do VNO após a exposição ao estímulo olfatório (seção anterior). Com o objetivo de reduzir o background de modo a observar o sinal de marcação de maneira clara e evidente, procedemos com ensaios para testar se a manipulação na concentração de sonda *Egr-1* poderia levar ao resultado desejado. Através de determinação empírica e consulta a trabalhos anteriores (Ishii, Omura e Mombaerts, 2004), foram testadas as seguintes concentrações de sonda: 50, 100 e 200ng.ml⁻¹ de solução de hibridação (Figura 8).

A redução na concentração da sonda (Figura 17) levou a uma drástica redução no background, evidenciando grandemente as células expressando *Egr-1*. O resultado obtido na Figura 17C é um exemplo do resultado almejado.

O sucesso na obtenção do resultado com níveis praticamente nulos de background possibilitou o avanço do trabalho para novas fases, envolvendo a combinação da marcação para *Egr-1* como indicador indireto da ativação neuronal no VNO com marcações específicas para grupos de neurônios no VNO, com o objetivo de identificarmos os receptores dos CFPs. Porém, a aplicação de tal estratégia necessita de uma técnica que permita marcação dupla, com clara

distinção entre as marcações realizadas, o que não é usual através de hibridação *in situ* colorimétrica. Por conseguinte, passamos a utilizar marcadores fluorescentes, que permitem a distinção entre si devido a divergências nas propriedades de excitação/emissão de fótons (Ishii, Omura e Mombaerts, 2004).

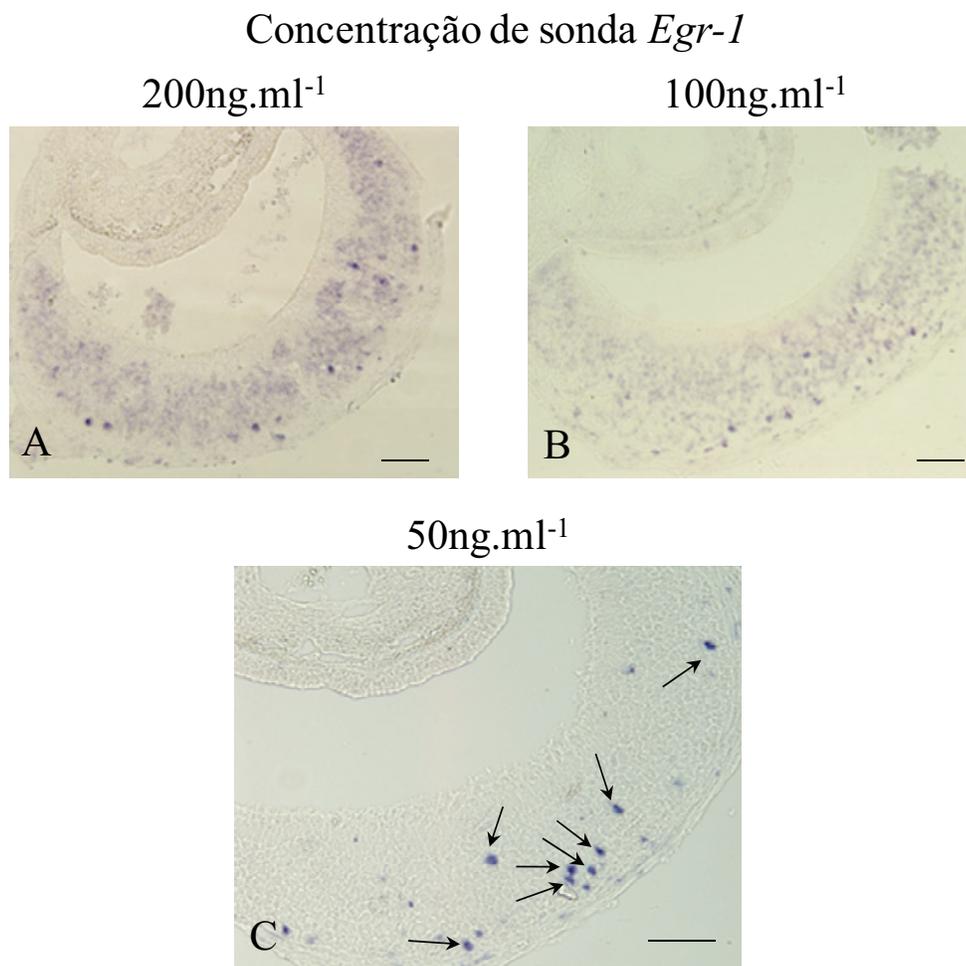


Figura 17 – Teste da concentração ideal de sonda *Egr-1*. Fotomicrografias de hibridação *in situ* colorimétrica de cortes do VNO de animais previamente expostos aos CFPs de gatos. A concentração de sonda utilizada em cada caso está indicada acima de cada figura. Notar a redução do background em concentrações menores da sonda. Setas: Marcação positiva para *Egr-1*. Barra: 100µm.

4.1.7. Ensaios de hibridação *in situ* fluorescente

O protocolo de hibridação *in situ* fluorescente mostrou-se ligeiramente diferente do protocolo de hibridação *in situ* colorimétrica, comportando-se diferentemente para a marcação do gene *Egr-1*, possivelmente devido a modificações na sensibilidade da marcação. Apesar da manutenção do background em níveis praticamente nulos, a marcação das células expressando *Egr-1* não se mostrou suficientemente nítida (Figura 18E e F). Para solucionar tal problema, o procedimento escolhido foi o de reduzir a temperatura de hibridação, uma vez que temperaturas mais baixas são menos estridentes, possibilitando que a sonda se associe mais facilmente com seu alvo, resultando em uma marcação mais nítida. Contudo, temperaturas de hibridação mais baixas causam aumento no nível de background (Figura 14), o que também prejudicaria a visualização das células expressando *Egr-1*. Portanto, a solução encontrada foi testar a combinação de uma temperatura de hibridação mais baixa (60°C, ao invés de 65°C), mantendo a temperatura de lavagem pós-hibridação a 65°C (Figura 18C e D), com o intuito de garantir a manutenção do background em níveis adequados (Figura 18).

O resultado obtido com a combinação de temperatura de hibridação reduzida e manutenção da temperatura de lavagem (Figura 18C e D) foi muito superior aos resultados obtidos quando as temperaturas de hibridação e lavagem eram fixas em 60°C (Figura 18A e B) ou 65°C (Figura 18E e F).

Estas alterações possibilitaram a definição de um protocolo adequado para a detecção da expressão de *Egr-1* através de hibridação *in situ* fluorescente em cortes do VNO.

Os próximos itens descreverão o desenho e o emprego de sondas capazes de identificar grupos específicos de neurônios do VNO. Estas sondas serão utilizadas em combinação com a marcação para *Egr-1* com o objetivo de se identificar os receptores dos feromônios de medo no VNO de camundongos (vide “Estratégia experimental”).

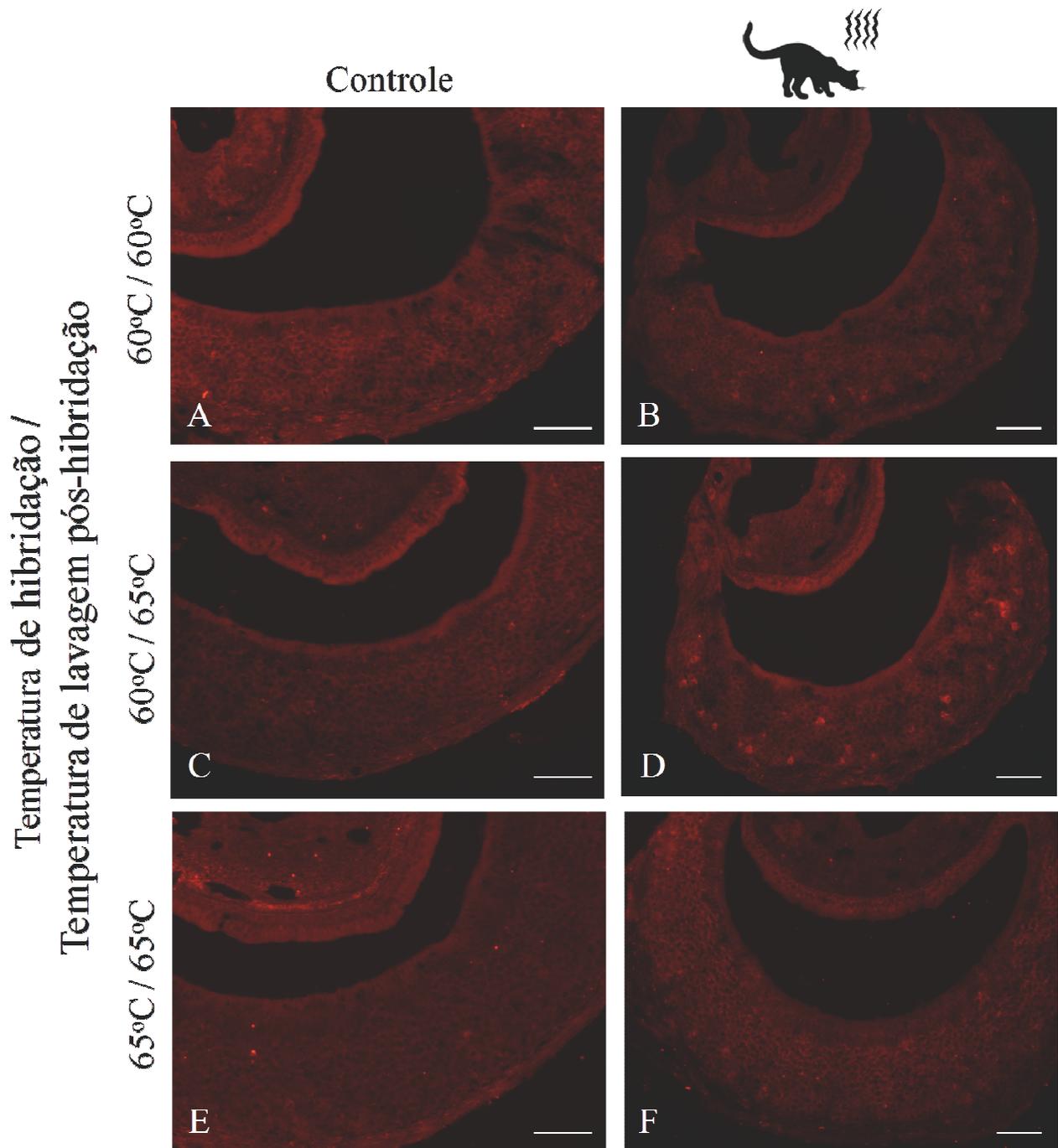


Figura 18 – Efeito da alteração das temperaturas de hibridação e lavagem sobre o sinal de *Egr-1* em hibridação *in situ* fluorescente do VNO. Resultado de hibridação *in situ* fluorescente de VNO de camundongos previamente expostos aos CFPs de gatos, ou à gaze limpa e estéril (controle). “E” e “F” representam a condição utilizada no protocolo de hibridação *in situ* colorimétrica. Barra:100µm.

4.2. Identificação das famílias dos receptores de caïromônios fobiogênicos de predadores - Desenho e emprego de sondas específicas para as famílias de receptores do VNO

A estratégia experimental (vide “Estratégia Experimental”) delineada para este projeto indica que, seguindo uma ordem lógica, primeiramente seria investigada a família de receptores do VNO (V1R ou V2R) a qual pertencem os receptores dos CFPs. Isso se tornou possível após o estabelecimento do protocolo de hibridação *in situ* fluorescente e da determinação da expressão de *Egr-1* como marcador indireto da atividade neuronal no VNO.

Como descrito na “Estratégia Experimental”, há duas zonas do VNO notadamente distintas, que expressam famílias diferentes de receptores GPCRs (Dulac e Axel 1995; Herrada e Dulac 1997; Matsunami e Buck 1997; Ryba e Tirindelli 1997). Além disso, estas zonas apresentam outras diferenças quanto à cascata de sinalização intracelular decorrente da ativação destes receptores, como por exemplo, as distintas subunidades alfa de proteína G (proteínas $G\alpha$) expressas em cada zona (Shinohara, Kato e Asano 1992; Halpern, Shapiro e Jlia 1995; Berghard e Buck 1996).

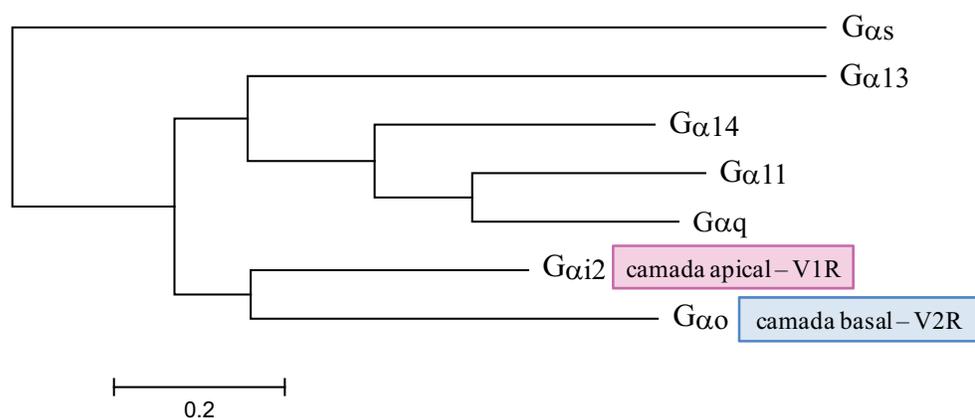


Figura 19 – Análise de máxima verossimilhança para os genes das subunidades alfa de proteína G expressos no VNO. A árvore foi construída a partir das sequências de mRNA dos genes em questão. As subunidades abundantemente expressas nas camadas apical e basal do VNO estão identificadas na figura por retângulos coloridos. Notar a grande distância filogenética entre as diferentes subunidades. Barra: Estimativa do número de substituições de nucleotídeos em cada posição da sequência.

Logo, a estratégia adotada foi utilizar a expressão das diferentes proteínas $G\alpha$ para distinguir as diferentes camadas do VNO. Para tanto, o desenho de sondas específicas para cada

uma destas subunidades era essencial. Para assegurar a especificidade das sondas geradas, descartando a possibilidade de hibridação cruzada com diferentes genes de proteínas $G\alpha$, primeiramente analisamos as sequências das proteínas $G\alpha$ expressas no VNO (Figura 19; Berghard e Buck, 1996).

Nossa análise demonstrou que há uma grande divergência entre as sequências de proteínas $G\alpha$ expressas no VNO. Com base neste resultado, oligonucleotídeos de DNA foram desenhados para a criação de sondas específicas para $G\alpha i2$ (camada apical; V1R) e $G\alpha o$ (camada basal; V2R). As sequências necessárias para a síntese *in vitro* das sondas requeridas foram amplificadas a partir de cDNA de VNO (Figura 20).

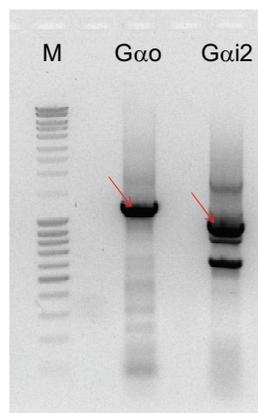


Figura 20 – Amplificação por RT-PCR visando à síntese de sondas específicas das subunidades alfa de proteína G, características de cada zona do VNO. Eletroforese em gel de agarose dos amplicons contendo os fragmentos que serviram de molde para a síntese *in vitro* da sondas das proteínas $G\alpha$. M: marcador molecular Mass Ruler (Fermentas).

As sondas de proteína $G\alpha$ produzidas foram empregadas em ensaios de hibridação *in situ* combinadas com sondas para *Egr-1* em cortes de VNO expostos a estímulos de gatos, ou à fração de alto peso molecular da urina de ratos, fração esta que apresenta como componente majoritário as MUPs, identificadas anteriormente como um estímulo puro capaz de induzir comportamento de medo em camundongos (Papes et al. 2010). Quanto a este último, o estímulo purificado foi preferido em detrimento do estímulo complexo (urina total de ratos), com o intuito final de identificarmos os receptores específicos das MUPs, uma vez que estas proteínas são suficientes para a indução do comportamento de medo. Inicialmente, testes foram realizados para

avaliar se os neurônios responsivos aos CFPs expressam receptores da família V1R, ou seja, fazem parte da zona apical do VNO, onde *Gai2* é expresso (Figura 21).

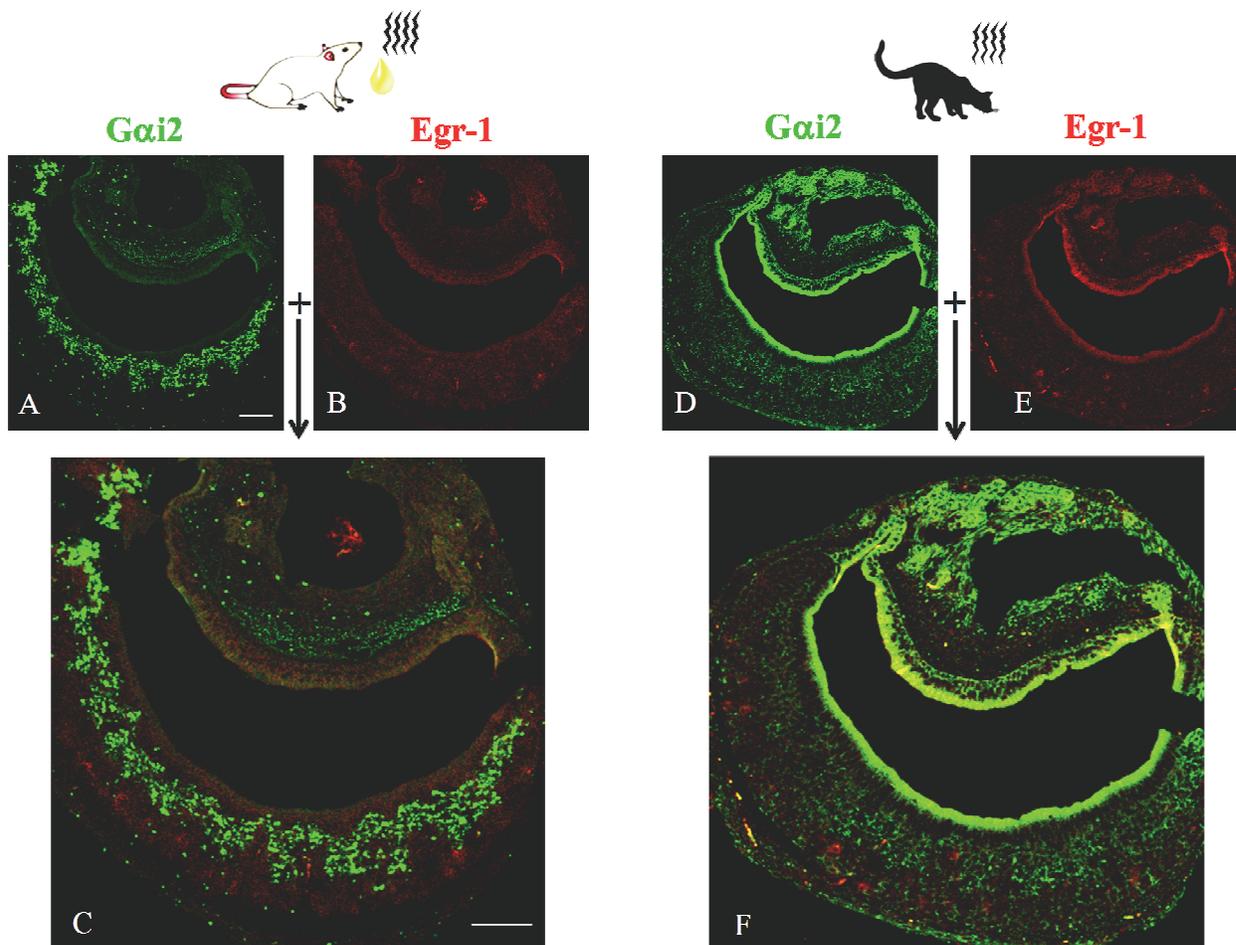


Figura 21 – Neurônios responsivos aos CFPs de gatos e ratos não expressam V1Rs. Hibridação *in situ* dupla, onde a marcação correspondente à sonda *Gai2* está denotada em verde; e em vermelho, a marcação correspondente à sonda *Egr-1*, indicativa de neurônios responsivos ao estímulo olfatório utilizado. Os painéis “A”, “B” e “C” representam cortes de VNO de animais expostos à fração de alto peso molecular da urina de ratos, enquanto “D”, “E” e “F”, representam cortes de VNO de animais expostos à pelagem e saliva de gatos (estímulo complexo). Em ambos os casos, nota-se que os neurônios expressando *Egr-1* não estão localizados na zona *Gai2* do epitélio do VNO. Barra: 100μm.

Os resultados obtidos são suficientes para indicar que os receptores dos CFPs não fazem parte da família V1R (Figura 21) e que, por exclusão, devem fazer parte da família V2R, restrita à região basal do epitélio do VNO. Este resultado é altamente relevante, pois seguindo a estratégia experimental proposta, cerca de metade do universo de 250 candidatos a receptores dos CFPs acabaram por serem excluídos, tanto para os estímulos de gatos quanto para ratos. O

resultado obtido para o estímulo de ratos corrobora o reportado recentemente por outro grupo (Isogai et al. 2011).

A confirmação dos resultados encontrados foi realizada através de experimento equivalente, utilizando o marcador $G\alpha o$, expresso na região basal do VNO, onde se encontram os neurônios $V2R^+$ (Figura 22). Apenas os resultados referentes a gatos estão apresentados, devido a problemas técnicos com o ensaio envolvendo os VNOs de animais expostos aos estímulos de ratos.

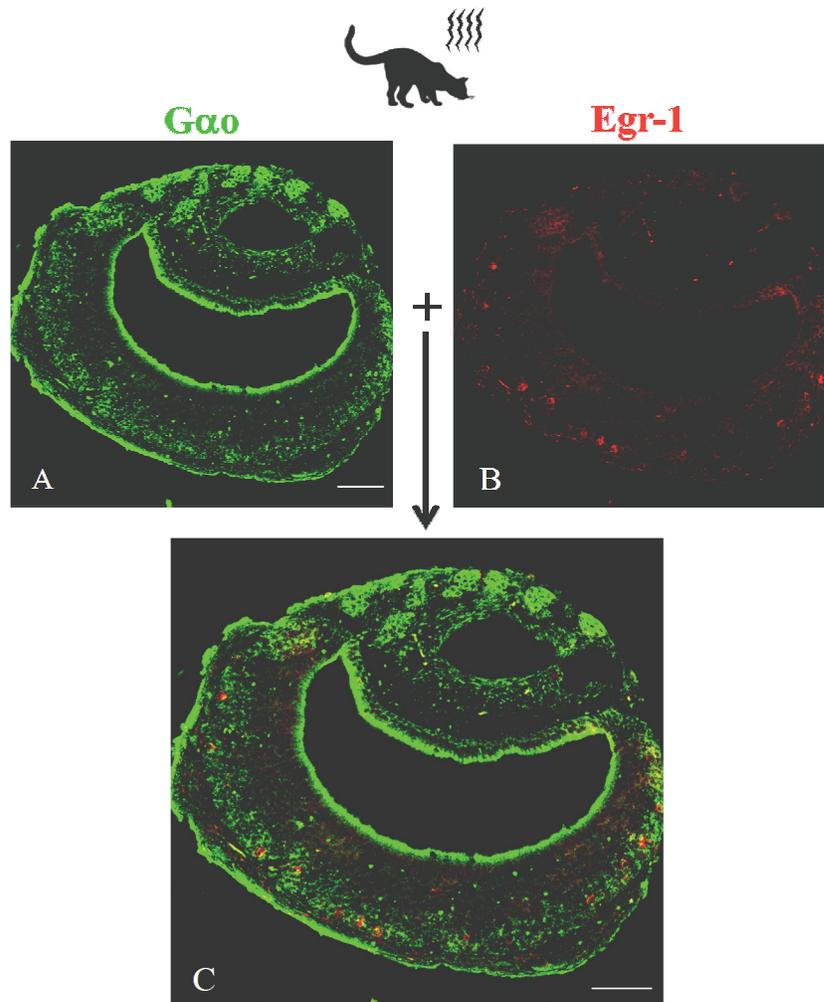


Figura 22 - Neurônios responsivos aos CFPs de gatos expressam $V2R$ s. Corte de VNO de animal exposto à pelagem e saliva de gatos (estímulo complexo) submetido à hibridação *in situ* dupla, onde em verde está denotada a marcação correspondente à sonda $G\alpha o$, e em vermelho, a marcação correspondente à sonda $Egr-1$, indicativa de neurônios responsivos ao estímulo olfatório utilizado. Notar que os neurônios $Egr-1$ positivos se encontram na zona que expressa $G\alpha o$. Barra: $100\mu m$.

A partir destes experimentos, foi possível definir que a família V2R é expressa nos neurônios responsivos aos CFPs no VNO. O próximo passo foi identificar as subfamílias dos receptores dos CFPs, como está descrito a seguir.

4.3. Desenho e validação das sondas clado-específicas para as subfamílias V2R

4.3.1. Desenho das sondas clado-específicas

A eliminação dos V1Rs e consequente confirmação dos V2Rs como a família de receptores expressos pelos neurônios responsivos aos CFPs foi um grande avanço para a identificação definitiva dos receptores específicos envolvidos neste processo sensorial. O próximo passo, seguindo a estratégia experimental hierárquica proposta, foi a identificação das subfamílias de receptores expressos pelos neurônios responsivos aos CFPs. Para tanto, sondas clado-específicas foram desenhadas, como descrito a seguir.

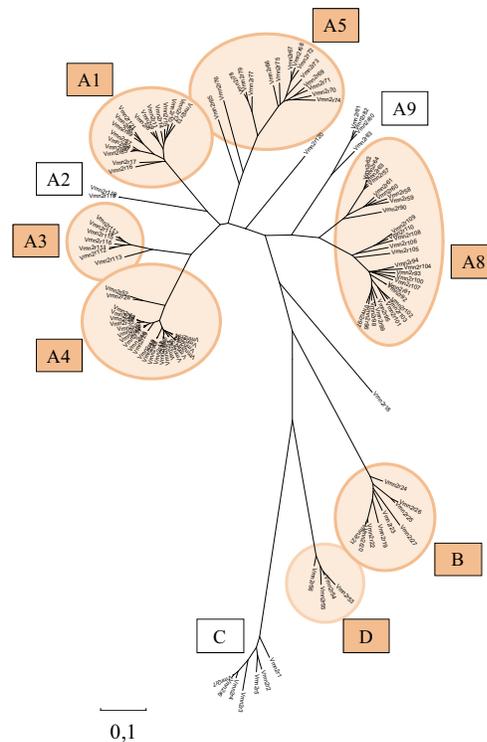


Figura 23 – Subfamílias escolhidas para o desenho de sondas clado-específicas. Árvore filogenética dos V2Rs, construída a partir das seqüências codificadoras dos receptores. Os círculos coloridos denotam as subfamílias selecionadas para o desenho das sondas clado-específicas. As demais foram excluídas por serem pouco representativas. Barra: Estimativa do número de substituições de nucleotídeos em cada posição da seqüência.

A estratégia experimental proposta prevê a análise de cada uma das subfamílias candidatas, para que sejam determinados de maneira apropriada os receptores responsivos aos CFPs. Entretanto, com a finalidade de otimizar o trabalho experimental, algumas subfamílias foram excluídas inicialmente do teste, como aquelas com baixo número de receptores (A2 e A9), além da subfamília C, que representa uma classe especial de receptores, co-expressos com os demais V2Rs (vide Introdução, Silvotti et al. 2007). As subfamílias restantes (marcadas com círculos coloridos na Figura 23) foram mantidas para o desenho das sondas clado-específicas.

Os principais desafios para o desenho de sondas clado-específicas foram: 1- as sondas para determinada subfamília deveriam ser capazes de identificar todos os mRNAs provenientes dos genes da subfamília em questão; 2 – as sondas não deveriam reconhecer nenhum outro gene de receptor das demais subfamílias.

Para solucionar o primeiro problema, o princípio estabelecido para o desenho de sondas clado-específicas foi o de considerar como válidos os fragmentos que compartilhassem no mínimo 75% de similaridade de sequência com todos os membros do clado em questão. Esta percentagem foi assumida como o mínimo necessário para a ocorrência de hibridação cruzada nos ensaios de hibridação *in situ*, baseando-se em resultados anteriores encontrados por outros grupos (Ishii, Omura e Mombaerts, 2004; Silvotti et al. 2007). Dessa forma, estaria assegurado que todos os receptores de uma dada subfamília teriam seus mRNAs reconhecidos pela sonda sintetizada a partir do fragmento escolhido.

O segundo desafio é particularmente notável neste caso por se tratar de uma grande família multigênica. A grande similaridade entre os genes de receptores reduz a probabilidade de que uma sonda desenhada sem os devidos cuidados seja específica para determinado grupo de receptores, não reconhecendo receptores de grupos externos. Para solucionar tal questão, foi feito um alinhamento utilizando-se o algoritmo ClustalW com as sequências codificadoras de todos os receptores, os quais, posteriormente, foram submetidos ao cálculo da distância ‘pairwise’ (p-distance: proporção de bases diferentes entre duas sequências).

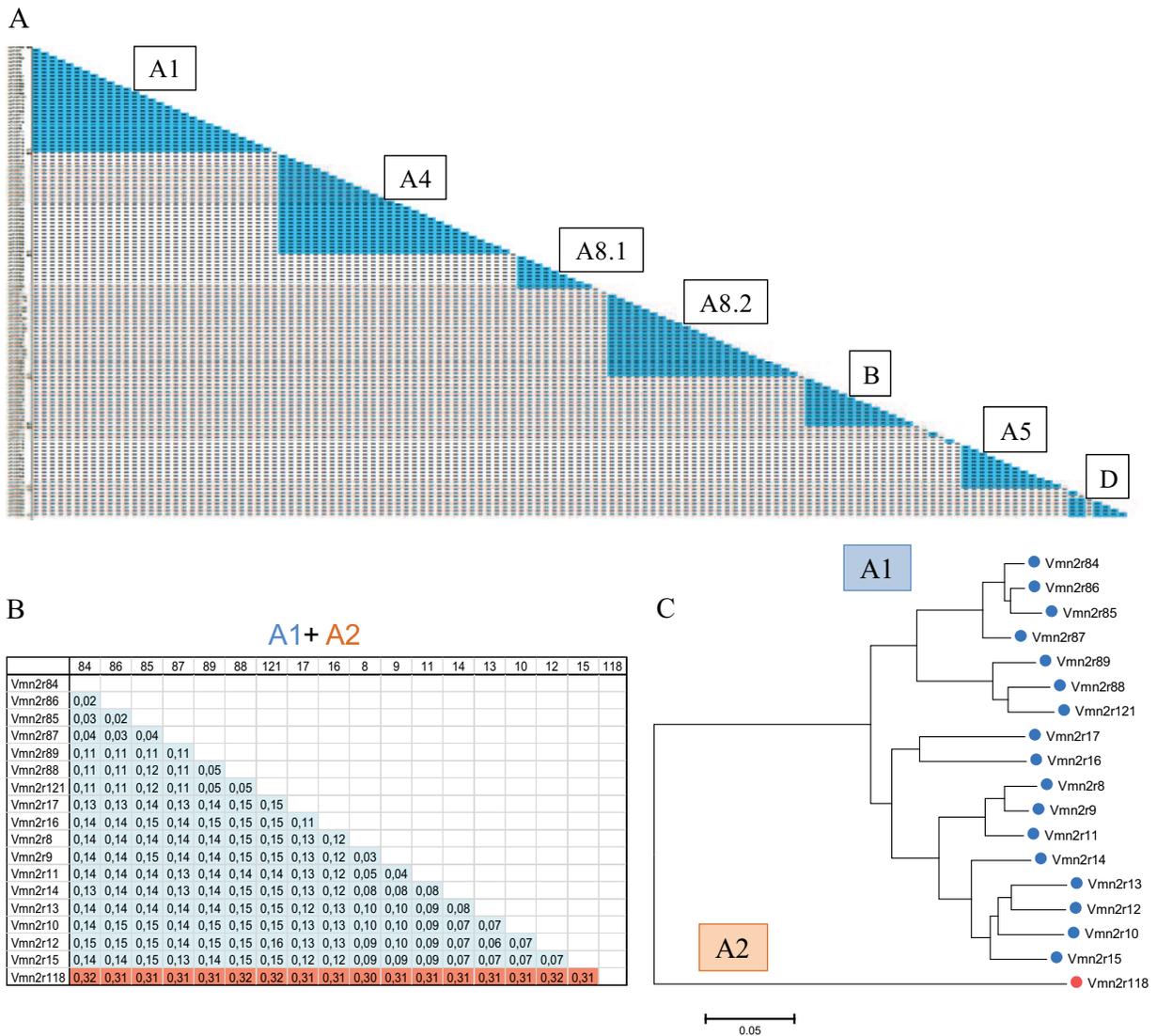


Figura 24 – Similaridade de seqüências intra-clado são maiores que 75%. A: Resultado da matriz de comparações pairwise entre os primeiros 1000bp da região codificadora de todos os receptores presentes nas subfamílias V2R selecionadas para o desenho de sondas. Em azul, estão destacados os valores de p-distance menores que 25% (similaridade de seqüência maior que 75%). Cada triângulo formado corresponde a uma subfamília V2R. B: Resultado da comparação pairwise (p-distance) para o clado A1, juntamente com um representante do grupo irmão (Vmn2r118 – clado A2), indicando que, dentro de uma mesma subfamília, a similaridade é substancialmente maior. Os números na tabela indicam a proporção de diferenças entre as seqüências de dois receptores. C: Árvore de genes construída a partir das seqüências codificadoras dos genes da tabela “B”.

Felizmente, o resultado obtido a partir da elaboração da matriz de pairwise encontrado foi que, no geral, os receptores de uma mesma subfamília apresentam mais de 75% de similaridade de seqüência entre si, e porcentagens menores que 70% de similaridade com

receptores de outras subfamílias (exceção feita para a grande subfamília A8). Ou seja, através de hibridação cruzada, a sonda desenhada para uma subfamília não reconheceria receptores membros das demais. Um exemplo deste resultado pode ser observado na Figura 24, onde estão demonstrados os resultados do cálculo de p-distance para os receptores do clado A1 e um receptor do grupo irmão, o clado A2. A similaridade de sequência entre os receptores de A1 é de, no mínimo, 85% (p-distance $\leq 0,15$), enquanto a similaridade com o receptor Vmn2r118 do clado A2 é, no máximo, de 70% (p-distance $\geq 0,30$).

O desenho das sondas foi realizado a partir dos resultados de 35 matrizes pairwise geradas a partir do alinhamento dos genes V2R (uma das matrizes geradas encontra-se representada na Figura 24A). Cada matriz representa o resultado da comparação pairwise de 1000bp dos genes V2R, tamanho definido arbitrariamente por aproximar-se do tamanho escolhido para o desenho de sondas para hibridação *in situ*. A diferença entre as 35 matrizes utilizadas consiste na região do gene de receptor selecionada para comparação: a primeira matriz contém a comparação pairwise para a região 0-1000, a segunda matriz, para a região 50-1050, e assim sucessivamente, variando-se 50bp de uma matriz para outra (Figura 25A). Deste modo, obteve-se um perfil de similaridade de sequência dos V2R.

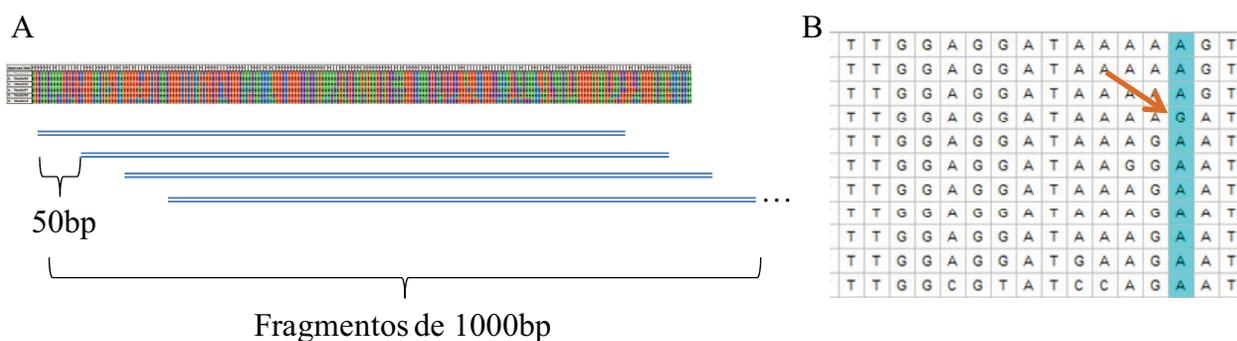


Figura 25 – Desenho de sondas clado-específicas. A: Esquema ilustrativo do alinhamento das sequências codificadoras dos genes V2Rs, e dos fragmentos utilizados para construir as matrizes pairwise, cada um com 1000bp de tamanho, diferindo 50bp um do outro em relação ao ponto de início. B: Exemplo de região escolhida para o desenho de primer específico, destacando o último nucleotídeo, específico em relação às sequências mais próximas (seta).

Os fragmentos selecionados para os desenhos das sondas para cada subfamília foram escolhidos com base nos resultados das matrizes correspondentes, de modo que o fragmento

apresentasse os menores valores de p-distance (dentre as 35 tabelas) entre os genes da subfamília em questão.

Uma vez escolhida a região para o desenho da sonda, o desafio seguinte foi o desenho de primers específicos para um dos membros da subfamília em questão. Para garantir a especificidade dos oligonucleotídeos, e, conseqüentemente, do fragmento amplificado, procurou-se garantir que, no mínimo, o último nucleotídeo do primer fosse específico do gene escolhido (Figura 25B). Com os primers específicos, foi possível a amplificação dos fragmentos selecionados, os quais foram confirmados por seqüenciamento, e posteriormente utilizados para a síntese *in vitro* das sondas clado-específicas.

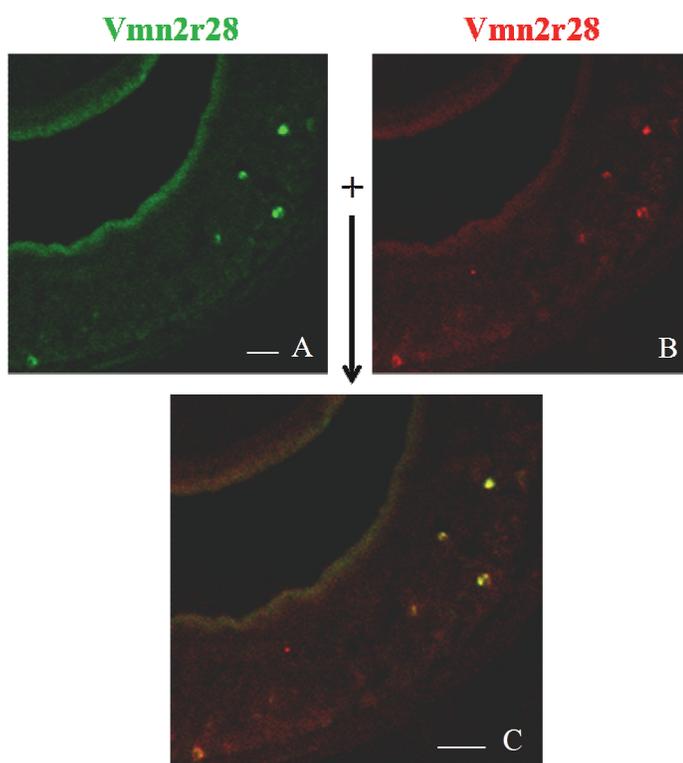


Figura 26 – Validação da equivalência das marcações utilizadas nos ensaios de hibridação *in situ* fluorescente. Resultado de hibridação *in situ* em corte de VNO, em que o mesmo fragmento (Vmn2r28) foi utilizado como molde para ambas as sondas utilizadas, Vmn2r28-DIG (vermelho) e Vmn2r28-FLU (verde). Barra: 100 μ m.

4.3.2. Validação das sondas clado-específicas

As sondas clado-específicas foram desenhadas com o objetivo de identificarem todos os membros de uma determinada subfamília V2R, considerando o mínimo de 75% de

similaridade entre as sequências, valor estabelecido arbitrariamente para assegurar a ocorrência de hibridação cruzada. Para validar tal pressuposto, as sondas foram testadas quanto à especificidade e porcentagem real de hibridação cruzada. Primeiramente, a mesma sonda foi submetida a ambas as marcações empregadas nos ensaios de hibridação *in situ* dupla, com o objetivo de confirmarmos que ambas as marcações realizadas apresentam poder de resolução equivalente (Figura 26). A observação de sobreposição total entre as marcações provenientes de sondas equivalentes, desenhadas a partir do gene *Vmn2r28* e marcadas com digoxigenina (DIG) ou fluoresceína (FLU), confirmou experimentalmente tal pressuposto.

Em seguida, foram escolhidas sondas que apresentassem um percentual de similaridade de sequência próximo ao valor pressuposto de 75% e que, portanto, possibilitassem a averiguação experimental desta suposição. Inicialmente, foram escolhidas as sondas baseadas nos receptores *Vmn2r28* e *Vmn2r41*, ambas do clado A4, e que compartilham 78% de similaridade (Figura 27A). Contrariando o esperado, não houve sobreposição entre as marcações (Figura 27B), o que é um forte indicador de que a porcentagem de similaridade de sequências necessária para a hibridação cruzada do ensaio de hibridação *in situ* em nossas condições é maior que 78%.

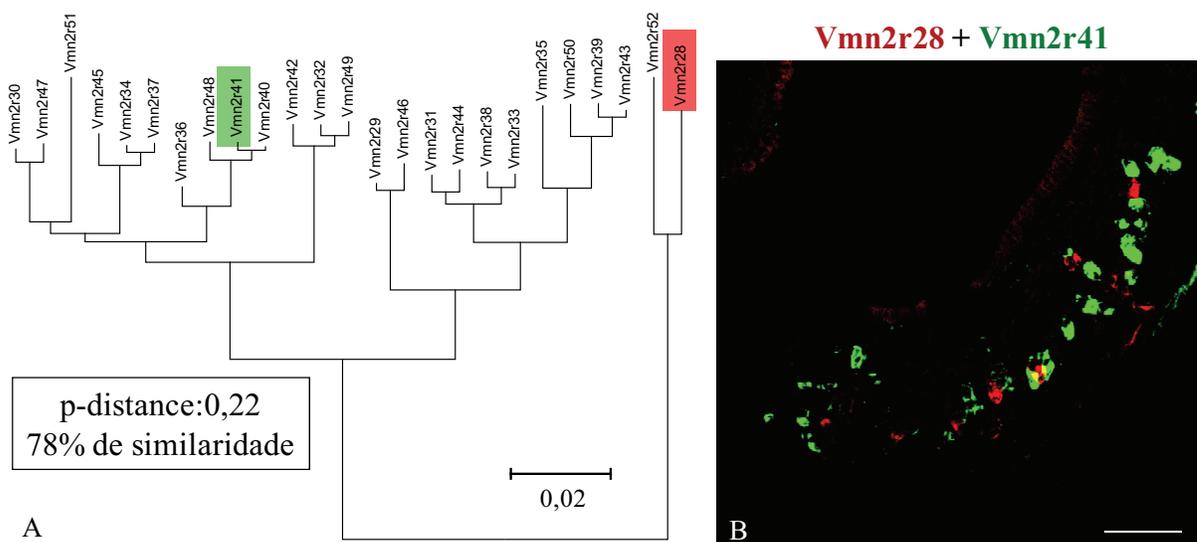


Figura 27 – Validação das sondas e teste da porcentagem de similaridade necessária para a ocorrência de hibridação cruzada. A: Árvore de genes da subfamília A4, onde estão destacados os genes de receptores utilizados como moldes para as sondas aplicadas em “B”. No quadro, estão indicados os valores de p-distance e porcentagem de similaridade existente entre as sondas em questão. B: Resultado de hibridação *in situ* em corte de VNO, em que foram utilizadas as sondas baseadas em *Vmn2r28* (DIG – vermelho) e *Vmn2r41* (FLU – verde), ambos do clado A4 dos V2R. Barra: 100µm.

O teste seguinte foi realizado com sondas que apresentavam similaridade de sequência maior do que 78%. Foi selecionado um par de sondas do clado A8 (Vmn2r58 e Vmn2r90, com 84% de similaridade entre si). Desta maneira, o esperado era que, devido à alta similaridade, neurônios marcados com uma das sondas também apresentariam marcação proveniente da outra sonda. Entretanto, a sobreposição esperada também não foi constatada (Figura 28), indicando que a porcentagem de similaridade necessária para a ocorrência de hibridação cruzada é muito maior do que o imaginado em um primeiro instante com base em informações da literatura (Ishii, Omura e Mombaerts, 2004; Silvotti *et al*, 2007).

Os testes realizados demonstraram que a porcentagem de hibridação cruzada do nosso ensaio experimental era superior ao pressuposto com base em dados da literatura. A partir deste resultado, foi possível interpretar com mais precisão os ensaios subsequentes onde as sondas clado-específicas foram utilizadas.

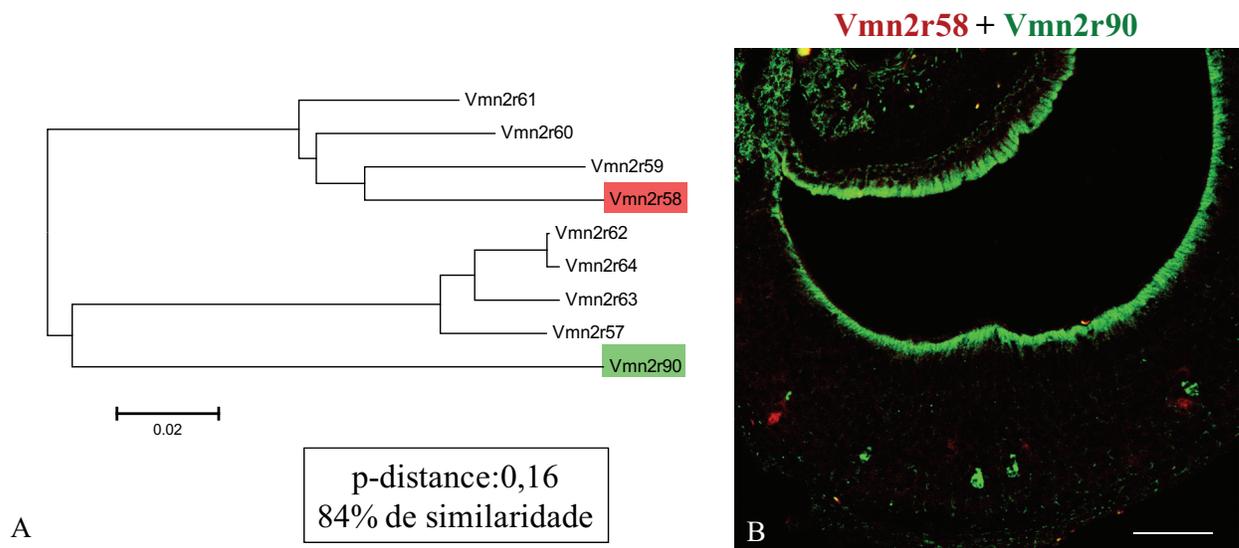


Figura 28 – Teste da porcentagem mínima de similaridade de sequência necessária para ocorrência de hibridação cruzada. A: Árvore filogenética de parte do clado A8, onde estão destacados os genes de receptores utilizados como moldes para as sondas aplicadas em “B”. No quadro, estão indicados os valores de p-distance e porcentagem de similaridade existentes entre as sondas em questão. B: Resultado de hibridação *in situ* em corte de VNO, em que foram utilizadas as sondas baseadas em Vmn2r58 (DIG – vermelho) e Vmn2r90 (FLU – verde), ambos do clado A8 dos V2R. Barra: 100µm.

4.4. Caracterização das subfamílias de receptores dos neurônios responsivos aos caïromônios fobiogênicos de predadores

Após a validação das sondas, o passo subsequente foi a utilização das mesmas para a caracterização dos neurônios responsivos aos CFPs. Nesta etapa, foram priorizados os clados contendo receptores relacionados à detecção de odores fobiogênicos de outros predadores mamíferos - como furão, lince e raposa - conforme descrito em trabalho recente (Isogai et al. 2011). Com base nesta seleção, os clados escolhidos foram justamente aqueles que apresentam maior número de receptores (Figura 29).

A caracterização dos neurônios responsivos aos CFPs foi conduzida com o estímulo de gatos, devido à maior facilidade de obtenção do estímulo (em relação à fração de alto peso molecular da urina de ratos), e também devido à maior relevância do resultado, uma vez que a caracterização do estímulo bruto provindo de ratos foi recentemente publicada (Isogai *et al*, 2011).

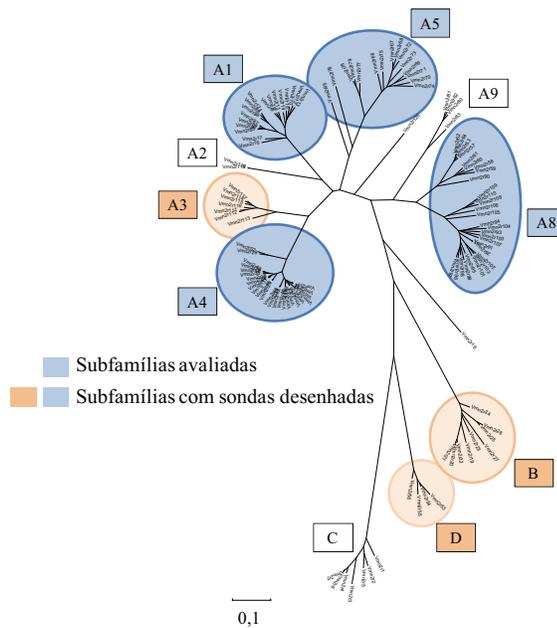


Figura 29 – Subfamílias prioritariamente selecionadas para a caracterização dos neurônios responsivos aos CFPs de gatos. Árvore de genes dos V2Rs, construída a partir das sequências codificadoras dos receptores. Os círculos coloridos denotam as subfamílias selecionadas para o desenho das sondas clado-específicas. Os círculos em azul evidenciam as subfamílias selecionadas para a caracterização dos neurônios responsivos aos CFPs de gatos. Barra: Estimativa do número de substituições de nucleotídeos em cada posição da sequência.

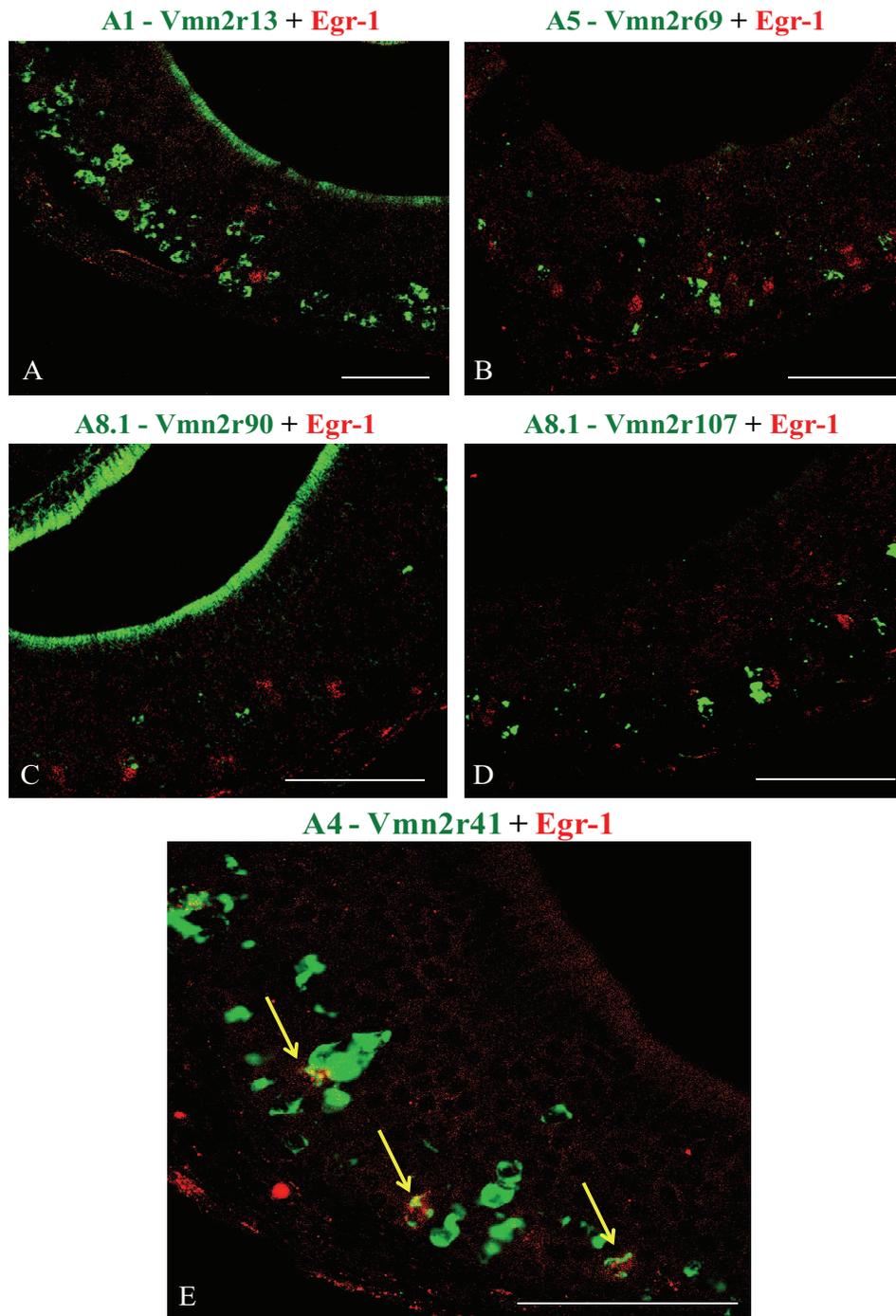


Figura 30 – Caracterização dos neurônios responsivos aos odores fobiogênicos de gatos quanto à subfamília de receptores expressos. Hibridação *in situ* dupla em cortes de VNO, onde se utilizou Egr-1 (vermelho) como marcador da ativação neuronal, e sondas para as subfamílias V2R (verde). A subfamília indicada em cada figura e o receptor que serviu como molde para a síntese da sonda estão devidamente indicados na legenda (verde). E: As setas em amarelo indicam a sobreposição entre as marcações. Barra: 100µm.

Ensaio experimentais foram conduzidos para cada uma das sondas clado-específicas selecionadas com a finalidade de caracterizar as subfamílias expressas pelos receptores responsivos aos CFPs de gatos (Figura 30). Os resultados obtidos para os clados A1, A5 e A8 foram negativos, não havendo colocação entre as marcações clado-específicas e a de *Egr-1* (Figura 30A-D). Este resultado indica que apenas algumas subfamílias devem estar envolvidas na detecção dos CFPs de gatos.

Em um dos casos analisados (Figura 30E), houve sobreposição entre os neurônios ativados pelos CFPs (*Egr-1* positivos) e a marcação para a subfamília A4 (sonda baseada no receptor Vmn2r41). Esta sobreposição indica que neurônios responsivos aos CFPs de gatos expressam um ou mais receptores desta subfamília.

A sobreposição obtida entre a marcação para *Egr-1* e o clado A4 foi quantificada (Figura 31), e a proporção de neurônios *Egr-1* positivos que expressam receptores do clado A4 encontrada foi de 75,7%. Este resultado indica que grande parte dos receptores envolvidos na detecção dos CFPs de gatos faz parte do clado A4. Além disso, como a proporção encontrada está distante de 100%, receptores de outros clados V2R devem também participar da detecção do estímulo fobiogênico de gatos.

A caracterização do clado A4 como majoritário na detecção de CFPs de gatos restringe grandemente o número de receptores candidatos inicial. O conjunto de receptores envolvidos na detecção de CFPs, dentro do universo de 300 receptores presentes no VNO, foi reduzido para apenas duas dezenas (Figura 32).

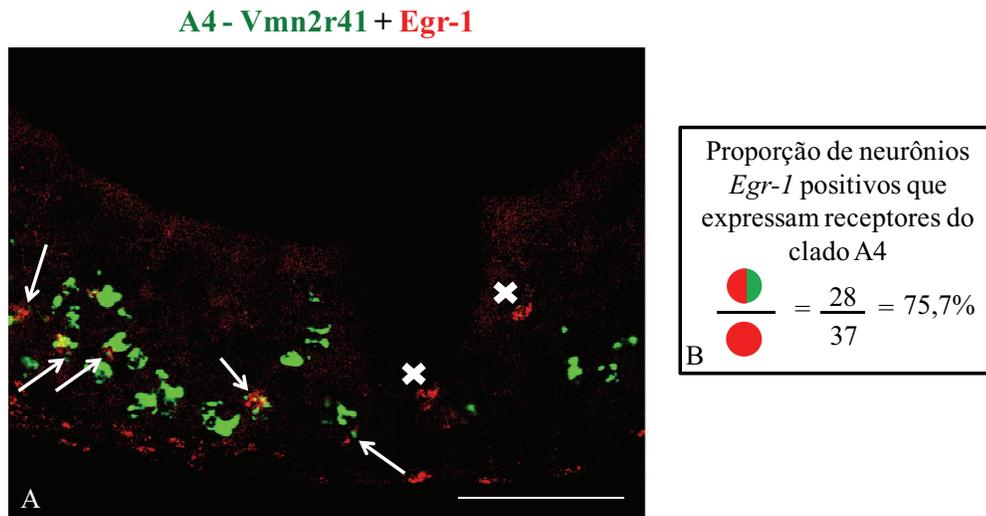


Figura 31 – Quantificação dos neurônios responsivos aos CFPs de gatos que expressam receptores do clado A4. A: Ilustração do resultado de hibridação *in situ* de cortes do VNO de animais previamente expostos a CFPs de gatos. Setas: neurônios marcados com ambas as sondas. “X”: Neurônios marcados apenas com a sonda *Egr-1* (vermelho). B: Resultado da quantificação de células *Egr-1* positivas obtido em cortes de VNO provenientes de 3 camundongos.

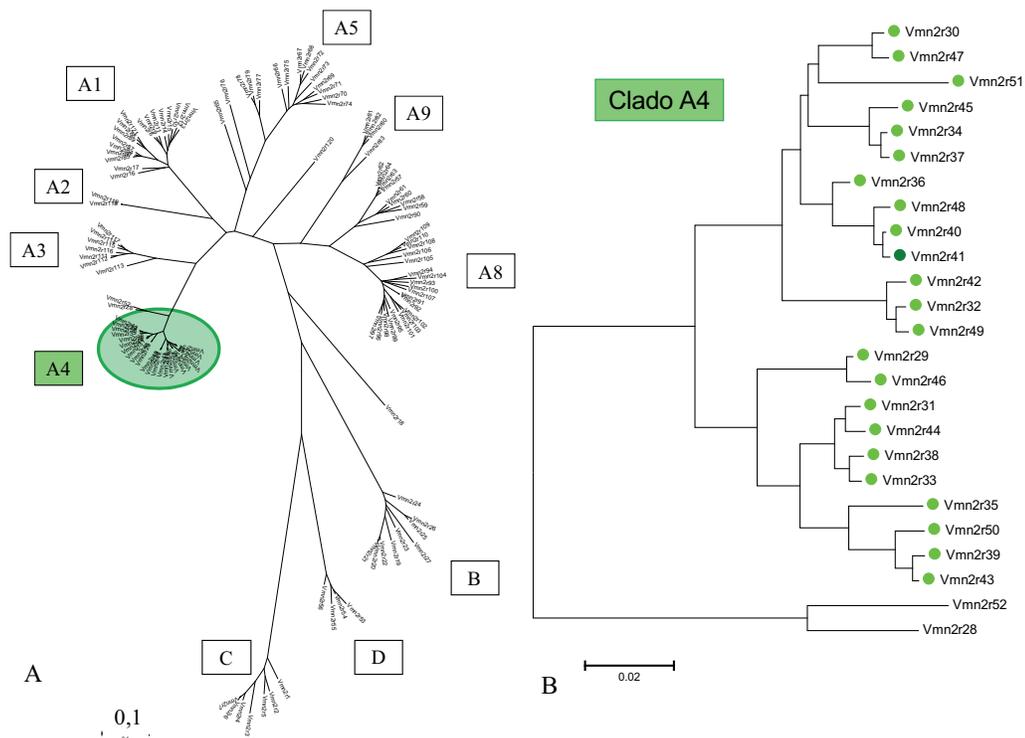


Figura 32 – Restrição do número de candidatos a receptores de CFPs de gatos. A: Árvore filogenética dos V2Rs, mostrando em destaque (círculo verde) o ramo do clado A4 onde se encontram os receptores expressos por grande parte dos neurônios responsivos aos CFPs de gatos. B: Detalhe do clado A4, onde se destaca o receptor Vmn2r41 (círculo verde-escuro), o qual serviu de molde para a sonda utilizada, e os receptores identificados por esta sonda através de hibridação cruzada (círculos verdes).

4.5. Experimentos futuros

Os experimentos realizados neste trabalho até o momento permitiram estabelecer um método robusto para a identificação de neurônios responsivos a determinado estímulo odorante no VNO. Além disso, foi feita a caracterização dos neurônios responsivos aos CFPs de gatos quanto à subfamília de receptores que expressam. Apesar dos avanços obtidos, futuros experimentos devem ser realizados para ampliar a caracterização dos neurônios responsivos aos CFPs de gatos, a exemplo de:

- Ensaio de hibridação *in situ* dupla com sondas específicas para outros clados, com o objetivo de identificar os receptores expressos pela fração de neurônios responsivos aos CFPs de gatos que não expressam receptores do clado A4 (Figura 31B).

- Desenho e emprego de sondas receptor-específicas, com o objetivo de possibilitar a caracterização detalhada dos receptores expressos pelos neurônios responsivos aos CFPs de gatos. Tais sondas permitiriam a distinção entre receptores extremamente semelhantes em termos de sequência da região codificadora, como os receptores do clado A4 representados na Figura 32B. O desenho de tais sondas será facilitado pela disponibilidade de acesso a sequências de RNA-seq do VNO, de onde estão sendo obtidos fragmentos de sequência das regiões 3'UTR dos genes V2R. Estas regiões, devido à maior variabilidade de sequência, auxiliarão no desenho de sondas com alto nível de especificidade.

Além de testes mais específicos com os CFPs de gatos, experimentos futuros também devem ser realizados para a caracterização dos neurônios responsivos à fração de alto peso molecular da urina de ratos, correspondente às MUPs (Papes et al, 2010). Tal caracterização será de grande relevância científica, pois o resultado obtido para o estímulo purificado poderá ser comparado com o já descrito para um estímulo odorífero brut o proveniente de ratos (Isogai *et al*, 2011). Dessa forma, seria possível determinar se há receptores essenciais para a deflagração do comportamento de medo em camundongos, os quais participariam da detecção das MUPs, e se receptores acessórios ativados por outros estímulos presentes no complexo odorante bruto estariam associados com a modulação da resposta comportamental.



Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1. Estabelecimento de um método robusto para identificação dos receptores olfatórios no VNO

Um dos avanços mais notáveis obtidos com este projeto foi o desenvolvimento de um método eficiente e reprodutível para a deorfanização de receptores do VNO, ou seja, a caracterização dos receptores quanto aos seus ligantes. Este método consiste em ensaios de hibridação *in situ* dupla, onde os neurônios responsivos a determinado estímulo são marcados por um Gene de Expressão Imediata – IEG -, que neste caso, trata-se do gene *Egr-1*. A outra marcação utilizada evidencia determinado grupo específico de receptores. Através da presença ou ausência de sobreposição entre ambas as marcações utilizadas, é feita a caracterização dos neurônios responsivos a determinado estímulo olfatório.

A deorfanização de receptores olfatórios constitui um dos grandes desafios da área atualmente (Touhara 2007). Até o momento, apenas um V2R foi deorfanizado completamente (Haga et al, 2007; Haga et al, 2010). Mesmo entre os demais GPCRs do sistema quimiossensorial, o número de receptores com ligantes conhecidos ainda é muito baixo (Mombaerts, 2004). Isso se deve à falta de um método adequado e robusto para a deorfanização de receptores, agora existente para o VNO devido a este trabalho. Comparativamente, os ORs e TRs ('Taste Receptors') identificados até o momento decorreram de ensaios de cálcio intracelular ou através de expressão heteróloga (Mombaerts 2004; Touhara 2007), métodos laboriosos e que não se mostraram aplicáveis para o sistema vomeronasal até o momento. Em contrapartida, o método desenvolvido neste trabalho tem-se mostrado eficiente e altamente reprodutível.

Os IEGs já haviam sido empregados em estudos anteriores do VNO (Halem et al, 1999; Halem et al, 2001; Papes et al, 2010) , inclusive na deorfanização de um V2R (Haga et al, 2007). Entretanto, em todos os casos descritos, a expressão de IEGs era detectada através de imunohistoquímica, dependendo, portanto da disponibilidade comercial de anticorpos de qualidade. Como foi descrito neste trabalho, a imunohistoquímica para os IEGs c-Fos e Egr-1 (vide Resultados) não se mostrou um método eficiente e de fácil aplicação para a detecção de neurônios ativados no VNO. Além disso, os métodos anteriores apresentavam nível de background elevado, o que reduz a confiabilidade dos resultados (Haga et al, 2007; Halem et al,

2001, Figura 33). Este alto nível de background pode estar relacionado com o fato de que os neurônios vomeronasais disparam potenciais de ação de forma espontânea, o que poderia ocasionar um alto nível de expressão basal dos IEGs (Arnson e Holy 2011).

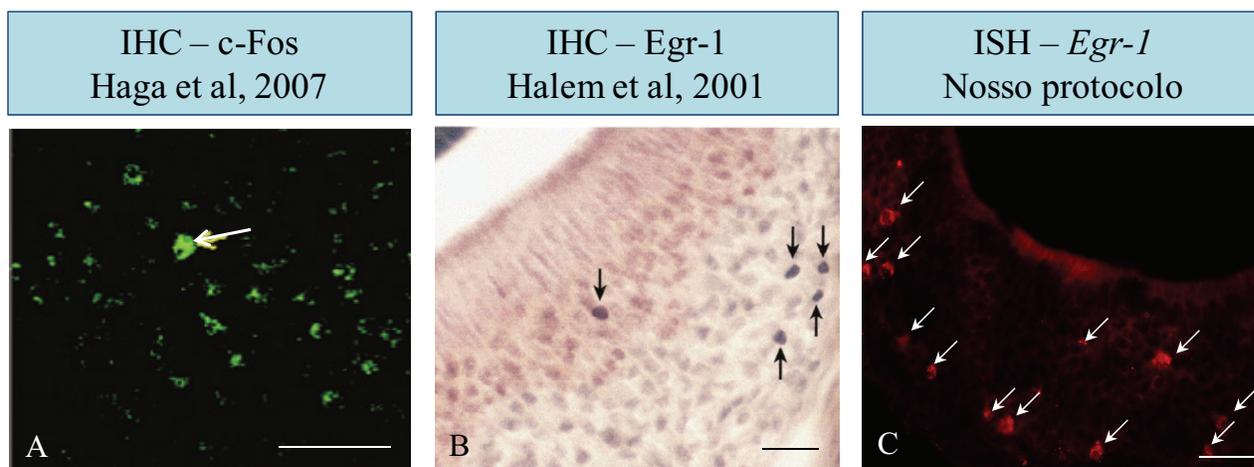


Figura 33 – Comparação dos resultados obtidos em ensaios de marcação indireta da ativação neuronal no VNO, através da expressão de IEGs. Cortes de VNO submetidos à imunohistoquímica (IHC – A e B) ou hibridação *in situ* (ISH – C), nos quais foram utilizados: anticorpo anti-c-Fos (A); anticorpo anti-Egr1 (B); sonda Egr-1 (C). As setas indicam as marcações consideradas positivas pelos respectivos autores das figuras. Observe o alto background existente nas figuras ‘A’ e ‘B’, e o avanço obtido em nosso protocolo (C). Barra:50µm.

A comparação dos resultados obtidos no ensaio de IEGs em VNOs neste trabalho com trabalhos anteriores (Figura 33) evidencia o grande avanço que foi obtido. Neste trabalho, desenvolvemos um protocolo baseado em hibridação *in situ* e, portanto, independente da disponibilidade comercial de anticorpos específicos, que impossibilitaram a reprodução dos protocolos definidos anteriormente. Além disso, o alto background comum aos experimentos envolvendo marcação para IEGs no VNO (Figura 33A e B) foi drasticamente reduzido em nosso protocolo (Figura 33C), contribuindo para um resultado muito mais nítido e robusto.

O protocolo desenvolvido neste trabalho também foi aplicado de maneira semelhante por outro grupo de pesquisa em trabalho recente (Isogai et al, 2011), demonstrando a reprodutibilidade da utilização de *Egr-1* como marcador da ativação neuronal no VNO.

O estabelecimento de um método robusto para a deorfanização de receptores do VNO apresenta aplicações relevantes para a pesquisa na área de olfação: o avanço no conhecimento

dos receptores do VNO e seus ligantes ajudará a elucidar a lógica de funcionamento deste órgão. Pode haver uma relação entre a evolução de cada clado e as funções desempenhadas por estes receptores, como sugerido neste trabalho para o clado A4 dos V2R. Alternativamente, grupos similares de receptores podem estar associados à detecção de classes de moléculas semelhantes, que não necessariamente apresentam funções correlatas. Tais hipóteses só poderão ser esclarecidas com o avanço no conhecimento da relação ligante-receptor neste órgão.

Outra importante implicação deste trabalho é a possibilidade de marcação das vias neurais iniciadas no VNO a partir de neurônios que expressam receptores específicos associados a determinado estímulo. No caso deste trabalho, estudos das vias neurais do medo induzido por estímulos quimiossensoriais tornam-se possíveis. Logo será possível traçar a relação entre determinado estímulo quimiossensorial e sua representação no sistema nervoso, a partir dos receptores que participam da sua detecção.

Identificar a relação entre receptores e ligantes no órgão vomeronasal é imprescindível para entender como este sistema está organizado molecularmente. Além disso, será possível investigar as interações bioquímicas entre receptor e ligante, de modo a tentar estabelecer quais feições moleculares são reconhecidas pelos receptores do sistema olfatório, se há sobreposição entre as feições reconhecidas por diferentes receptores, e como variações estruturais na molécula do ligante interferem no seu reconhecimento pelo receptor, gerando consequências na modulação da resposta comportamental decorrente da estimulação sensorial.

5.2. Caracterização de receptores responsivos aos Cairomônios Fobiogênicos de Predadores

Este trabalho almejava identificar os receptores dos CFPs, particularmente de gatos e ratos. Foi possível caracterizar a família de receptores envolvida na resposta a estes estímulos (V1R ou V2R) e, em ambos os casos, identificou-se que apenas a família V2R participa da detecção destes CFPs. Tal resultado sugere que a família V1R não participaria da detecção de estímulos provenientes de predadores mamíferos de camundongos. Contudo, a confrontação com dados da literatura (Isogai et al, 2011) mostra que, para algumas espécies (lince e furão), há também neurônios V1R responsivos. Entretanto, a complexidade do estímulo utilizada neste

artigo (contendo inclusive fezes) não permite correlacionar a atividade de V1Rs com a indução de resposta comportamental de medo em camundongos. A diferença nos estímulos utilizados pode levar a resultados distintos (Staples 2010). Por outro lado, os resultados obtidos em nosso trabalho, sobretudo em relação à fração de alto peso molecular da urina de ratos (estímulo purificado), permitem destacar o papel dos V2Rs (cujas vias neurais são segregadas em comparação aos V1Rs – Jia e Halpern, 1996) na indução do comportamento de medo e fuga em camundongos, demonstrando a não-essencialidade dos V1Rs, ao menos na resposta induzida por gatos e ratos.

Os estímulos utilizados neste trabalho são provenientes de gatos e ratos, organismos cujos odores e sua relação com o comportamento de medo em camundongos foram previamente estudados por nosso grupo (Papes et al, 2010). Neste estudo, foi determinado que um estímulo odorante puro, correspondente a uma proteína da superfamília das Major Urinary Proteins (MUPs), presente tanto em ratos quanto em gatos, é capaz de deflagrar a resposta de medo e fuga em camundongos. Em relação aos aspectos moleculares da detecção dos neurônios vomeronasais, os dados obtidos neste trabalho corroboram outros dados publicados anteriormente, onde os neurônios V2R (camada basal do VNO) mostram-se associados à detecção de compostos protéicos não-voláteis, como as MUPs de camundongos (Chamero et al, 2007), peptídeos do tipo MHC (Leinders-Zufall et al, 2004), além de pequenos peptídeos como os ‘Exocrine Gland-Secreting Peptides’ (Kimoto et al, 2005; Haga et al, 2010), enquanto que compostos menores como 2-heptanona (Boschat et al. 2002), isobutilamina (Del Punta et al. 2002b), e esteróides sulfatados (Isogai et al. 2011) são detectados pelos neurônios apicais do VNO (V1R). Portanto, há diversas evidências, incluindo as deste trabalho, que sugerem que as diferentes famílias de receptores do VNO estão associadas com a detecção de distintas classes de moléculas. Tal diferença deve estar associada com estruturas moleculares características apresentadas pelas distintas classes de receptores destas famílias. Por exemplo, a detecção de proteínas pelos V2R pode estar associada à grande porção extracelular apresentada pelos receptores desta família (Figura 34), e ausentes em outras famílias de receptores, como ORs e V1Rs. A região extracelular concentra as diferenças de aminoácidos entre os receptores da família V2R, sugerindo que esta região mais variável esteja relacionada com o reconhecimento de estímulos olfativos específicos (Figura 34, Yang et al. 2005). No caso do comportamento de medo a odores

de predadores, uma vez que o estímulo olfativo já é conhecido (MUPs), a determinação precisa dos receptores envolvidos no processo de detecção permitirá a elaboração de modelos computacionais simulando a interação entre ligante-receptor. Desta forma, este trabalho permite a elaboração de estudos capazes de esclarecer detalhadamente como os compostos químicos são detectados pelo sistema olfativo, questão que representa um dos mistérios fundamentais da área de olfação atualmente.

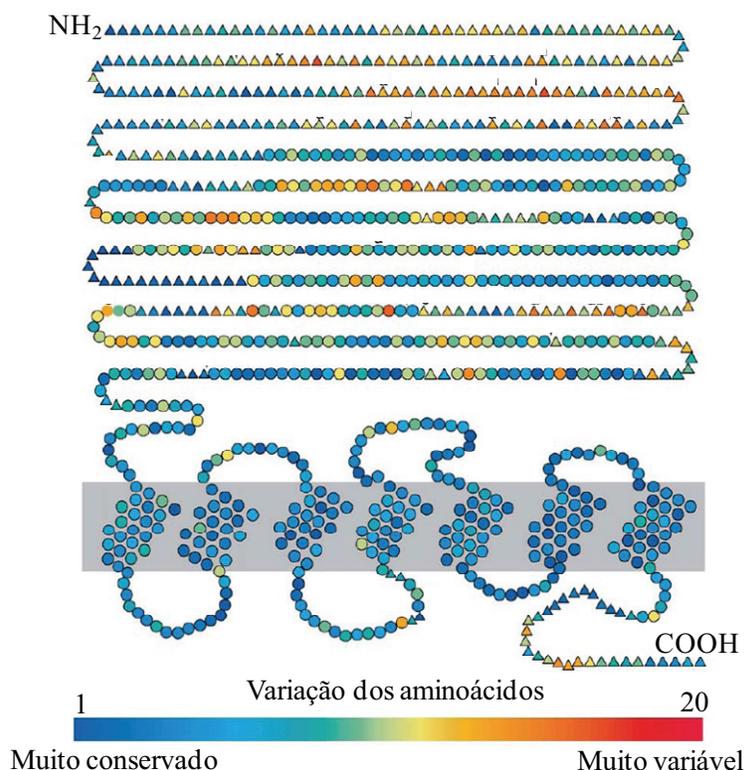


Figura 34– A região extracelular dos V2Rs concentra as variações na sequência de aminoácidos. Esquema ilustrado de um V2R onde está destacado através do gradiente de coloração o nível de variação de aminoácidos encontrado em cada posição através da comparação da sequência proteica de todos os V2Rs de camundongos. Os círculos indicam ausência de “gaps” para a dada posição no alinhamento, enquanto que triângulos indicam presença de “gap”. Note que a região extracelular concentra a divergência de aminoácidos entre os V2Rs, o que sugere que esta região variável corresponde à região responsável pela detecção dos diferentes estímulos olfativos. Esquema modificado a partir de Yang et al. 2005.

É importante destacar que os neurônios V2R, diferentemente de outros neurônios olfatórios, expressam combinatoriamente e de maneira não-randômica dois genes V2R: um gene de receptor das subfamílias A, B, ou D, e um gene de receptor da subfamília C (Silvotti et al, 2007), além da expressão de genes do tipo MHC de classe I não-clássicos na metade mais basal da camada de neurônios V2R (Ishii e Mombaerts, 2008). Neste trabalho, os receptores avaliados pertencem ao grupo das subfamílias A, B e D dos V2R, o qual é consensualmente considerado como o grupo envolvido diretamente na detecção de odores. Estudos futuros poderão avaliar a associação de algumas das outras classes de moléculas expressas pelos neurônios V2R com a detecção de CFPs.

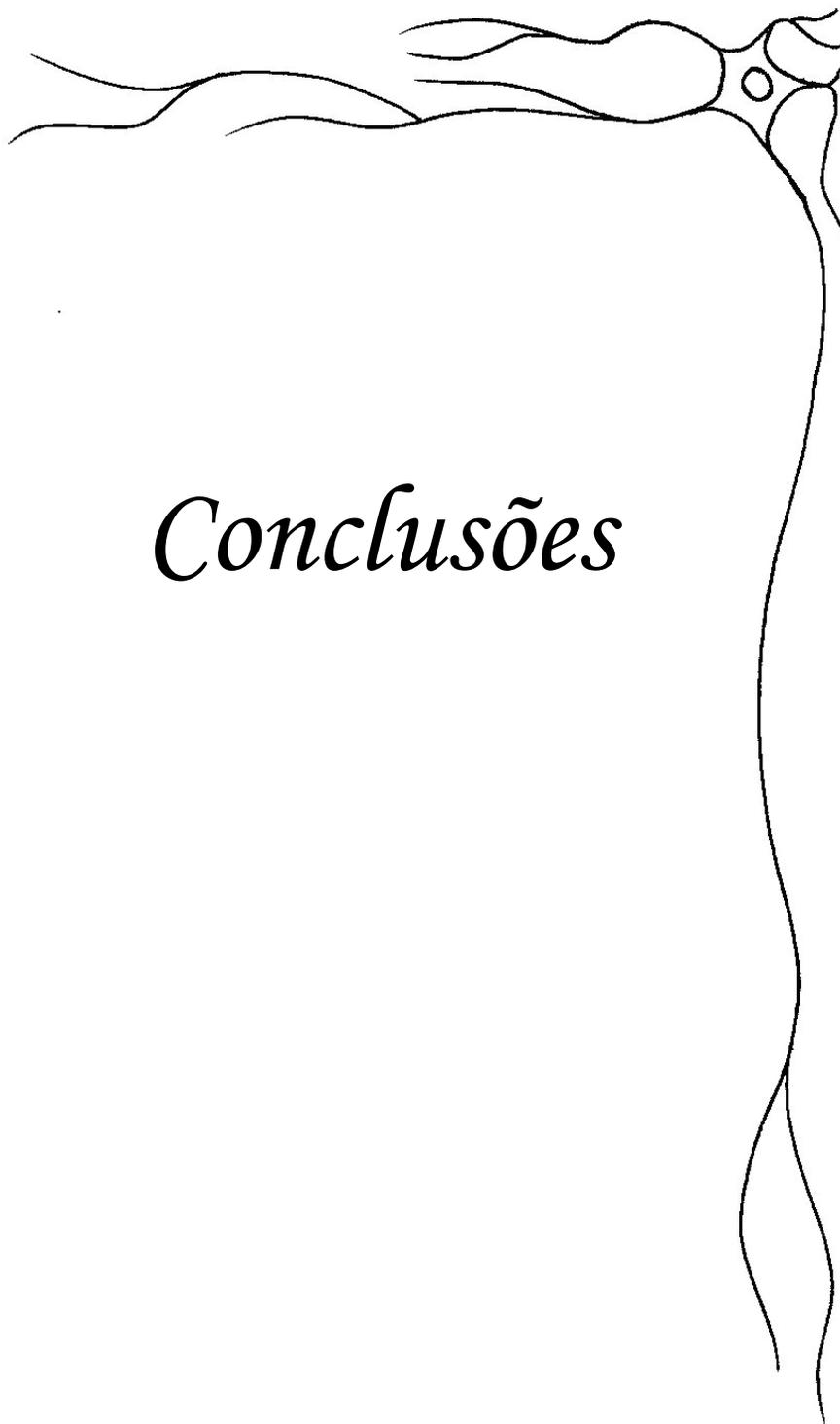
Os receptores do clado A4 de V2Rs foram caracterizados neste trabalho como a classe majoritária de receptores envolvida na detecção dos CFPs de gatos (Figura 31 e 32). Em trabalho anterior ,(Isogai et al, 2011) a caracterização de diversos estímulos detectados pelo VNO mostrou que os CFPs de todos os predadores mamíferos analisados (furão, lince, rato e raposa) ativam receptores do clado A4. Além disso, demonstrou-se também que tal subfamília de receptores (clado A4, exceto receptores Vmn2r28 e Vmn2r52, que configuram um subclado à parte dos demais) não está associada com a detecção de CFPs de não-mamíferos (cobras, corujas), nem com a detecção de odores provenientes de mamíferos não-predadores ou odores conoespecíficos. Este fato é curioso uma vez que já foi demonstrado que a proteína que provoca comportamentos agressivos entre machos de camundongos é da mesma família das proteínas de predadores (gatos e ratos), que causam comportamento de medo (Chamero et al. 2007; Papes et al. 2010). Os dados obtidos sugerem que, apesar da semelhança entre os estímulos, a proteína proveniente de machos de camundongos é detectada por outra subfamília de receptores. Todos estes dados juntos indicam que os receptores do clado A4 são especializados na detecção de estímulos químicos provenientes de predadores mamíferos, sendo esta a primeira evidência conhecida de relação entre função e evolução de determinado clado de receptores V2R.

A correlação entre um determinado grupo de receptores – clado A4 - extremamente semelhantes entre si ($\geq 85\%$ de similaridade de sequência de aa; dados não mostrados) e a detecção de odores de diferentes espécies de predadores, sugere que as moléculas liberadas por estes predadores sejam também semelhantes, ou até mesmo iguais. Tal pressuposto indicaria que

a evolução dos receptores do clado A4 poderia estar relacionada com a co-evolução entre predador-presa em camundongos.

A deorfanação dos receptores vomeronasais responsivos aos CFPs constituiu o principal objetivo deste trabalho. Fomos capazes de caracterizar os receptores responsivos aos CFPs de gatos com relação à família e subfamília a qual pertencem. Em breve, pretendemos identificar precisamente os receptores envolvidos na detecção de CFPs, através da utilização de sondas específicas baseadas na região 3'UTR dos V2Rs (vide seção 4.5. - Experimentos Futuros). A identificação dos receptores específicos envolvidos na deflagração do comportamento de medo permitirá o estudo das vias neurais iniciadas pelos diferentes receptores envolvidos (através de marcação específica das sinapses iniciadas pelos neurônios que os expressam), e, dessa maneira, auxiliará na elucidação do enigma de como determinados odores acarretam na indução de uma resposta comportamental complexa. Além disso, tal estudo contribuirá para o entendimento de como se dá o processamento do estímulo olfatório no sistema nervoso central.

Este trabalho, portanto, lança bases que permitirão o início de novas pesquisas com potencial para elucidar a questão de como o cérebro codifica e interpreta o mundo químico externo.



Conclusões

6. CONCLUSÕES

- A hibridação *in situ* do gene *Egr-1* foi estabelecida como um método eficiente e altamente reprodutível para a identificação da ativação neuronal no VNO.

- Neste trabalho, foi desenvolvido um método eficiente e robusto para a identificação de receptores vomeronasais para ligantes conhecidos, o que permitirá um grande avanço na compreensão de como o Sistema Vomeronasal está organizado.

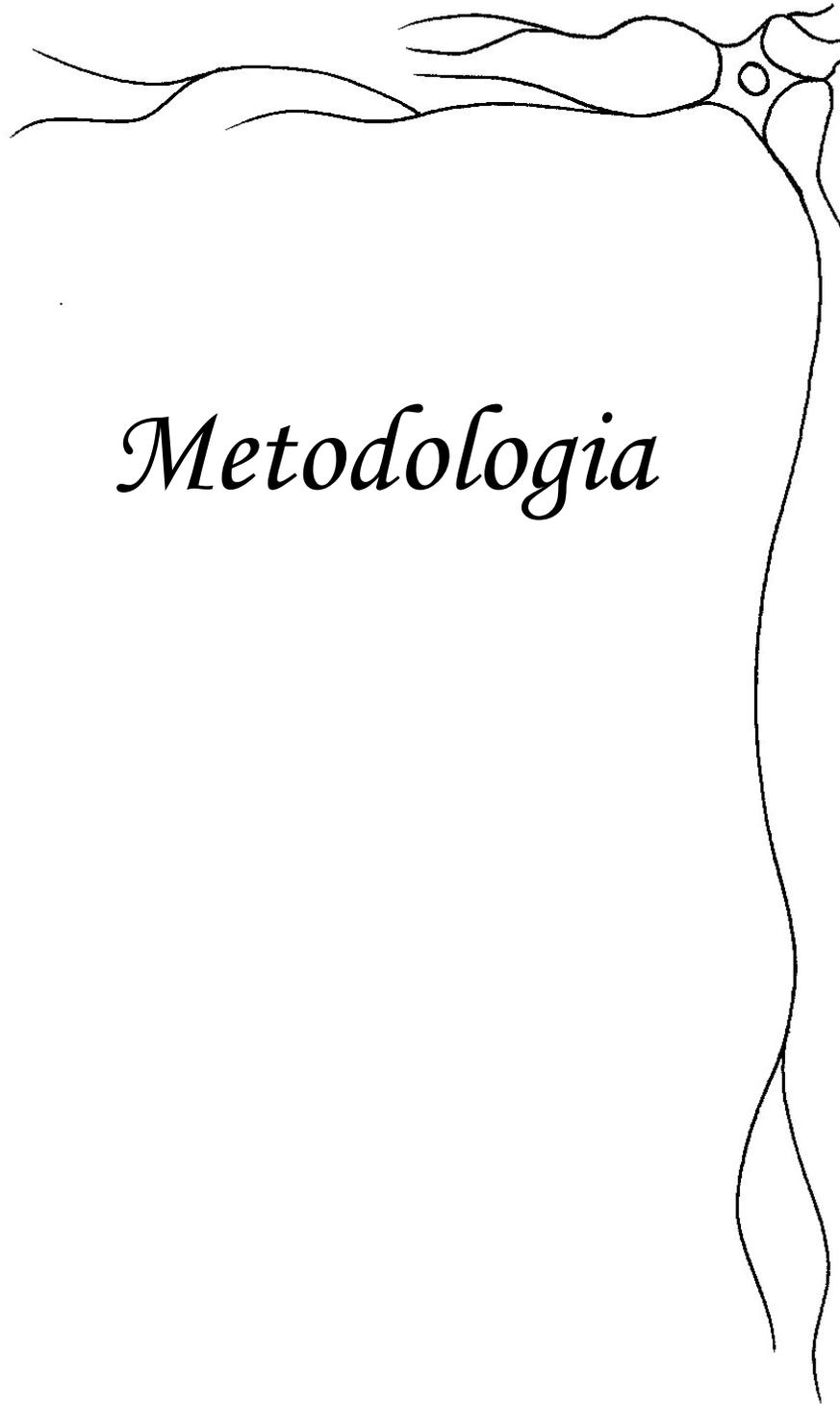
- A participação da família V1R na detecção dos CFPs de gatos e ratos foi descartada.

- A família de receptores que detecta os odores fobiogênicos de gatos e ratos foi caracterizada como a família V2R de receptores do VNO, corroborando dados da literatura que apontam que tais receptores estão envolvidos na detecção de compostos proteicos, não-voláteis.

- Foi identificado que as subfamílias A1, A5 e A8 de receptores V2R não estão envolvidas com a detecção de CFPs de gatos.

- A subfamília A4 de receptores V2R foi identificada como a subfamília majoritariamente relacionada com a detecção de odores fobiogênicos de gatos, o que, combinado com dados da literatura, sugere uma especialidade funcional para este clado. A evolução deste subgrupo de receptores deve estar relacionada à co-evolução predador-presa em camundongos, uma vez que os receptores deste clado participam da detecção de compostos provenientes de predadores mamíferos.

- Em resumo, este trabalho lançou bases para a compreensão do funcionamento e organização do Sistema Vomeronasal. Seus resultados auxiliarão também a elucidar como odores específicos são capazes de induzir comportamentos complexos em camundongos.



Metodologia

7. METODOLOGIA

7.1. Exposição dos animais aos estímulos fobiogênicos e retirada do VNO

Os ensaios de exposição aos estímulos foram conduzidos como descrito a seguir, salvo variações específicas de cada ensaio realizado. Estes ensaios foram baseados em paradigma estabelecido por Papes et al. 2010. Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BI6J de oito a doze semanas de idade.

Os estímulos fobiogênicos utilizados foram provenientes de gatos ou ratos. O estímulo de gatos foi obtido através da fricção de uma gaze estéril (10x10cm) contra a pelagem dos animais. O estímulo de ratos corresponde a uma fração da urina de ratos Sprague Dawley machos, obtida através de coletas ao longo de 5 dias. Esta fração foi obtida através de centrifugação com filtro Amicon Ultra (Cutoff 3kDa), sendo posteriormente lavada por 4 vezes, para eliminação de resíduos. A fração retida na coluna corresponde à fração utilizada no ensaio de exposição (Fração de alto peso molecular – Papes et al. 2010).

O ensaio de exposição foi conduzido em gaiola comum. O estímulo foi introduzido em uma das extremidades da gaiola e, a partir de sua introdução, 45 minutos foram contados até o sacrifício do animal, de modo a permitir a expressão dos IEGs decorrentes da estimulação olfatória. Após o sacrifício dos animais, o VNO foi imediatamente coletado e transferido para solução fixadora (4%PFA em PBS1x), onde foi mantido a 4°C. Após uma noite nesta solução, o VNO foi transferido para solução 10% sacarose em PBS1x por 2 horas a 4°C, seguido de 30% sacarose em PBS1x por 2 horas a 4°C. Transcorridas estas incubações, o VNO foi dissecado dos ossos e cartilagens adjacentes e embebido em meio próprio para criotomia.

7.2. Síntese de ribossondas de RNA para a hibridação *in situ*

Oligonucleotídeos de DNA foram planejados para amplificar um fragmento de ~750-1000bp dos mRNAs-alvo. Tais fragmentos foram amplificados por RT-PCR a partir de RNA total de cérebro de camundongos, no caso de IEGs, ou de VNO, no caso de OMP, *Gαo*, *Gαi2* e *V2Rs* (Sambrook e Russel, 2001). Para *Egr-1*, três sondas de ~900bp foram desenhadas de forma não sobreposta, a fim de cobrir uma parte maior do mRNA alvo. Os fragmentos amplificados foram clonados em plasmídeo pGEM-T Easy (Promega), sequenciados, e

posteriormente digeridos com enzimas de restrição apropriadas para linearizá-los. O DNA linear foi utilizado como molde para transcrição *in vitro* da sonda de RNA, utilizando RNA polimerases T7 ou SP6 e nucleotídeos NTPs marcados com digoxigenina ou fluoresceína, utilizando protocolo do fabricante (Roche).

7.3. Hibridação *in situ*

O protocolo de hibridação *in situ* foi baseado no protocolo desenvolvido por Ishii et al. 2004, com importantes modificações aqui descritas. Os passos iniciais, referentes aos procedimentos de pré-hibridação e incubação com a sonda, são comuns aos ensaios colorimétricos e fluorescentes. Estes passos foram conduzidos sempre com o uso de luvas, em ambiente livre de RNAses, com materiais devidamente tratados (4h a 200°C, para os materiais de vidro; 15min em 3% H₂O₂ diluído em H₂O milli-Q para os demais materiais; 1ml/L de DEPC e incubação a 37°C por 12 horas, seguido de autoclavagem por 15min, para as soluções). A seguinte sequência de passos experimentais foi realizada:

1. As lâminas foram secadas com o auxílio de um secador de cabelos, primeiramente com um jato de ar quente por poucos segundos e depois com o jato de ar frio, até secar completamente.
2. O material foi fixado em solução 1x PBS-DEPC contendo 4% formaldeído (preparado fresco a partir de paraformaldeído) a temperatura ambiente por 20min (quantidade suficiente para cobrir o material).
3. Foram realizadas duas lavagens em 1x PBS-DEPC a temperatura ambiente por 5min (200ml/lavagem de até 15 lâminas).
4. Em seguida, o material foi submetido à etapa de permeabilização do tecido, através de incubação em 0,2M HCl diluído em H₂O-DEPC a temperatura ambiente por 10min. (quantidade suficiente para cobrir o material).
5. Foram realizadas duas lavagens em 1x PBS-DEPC a temperatura ambiente por 5min (200ml/lavagem de até 15 lâminas).
6. O material foi submetido à etapa de acetilação: as lâminas foram transferidas para suporte contendo 250ml de Trietanolamina-HCl 0,1M pH 8,0, onde foram incubadas por 1min. Transcorrido este tempo, foi adicionado 625µl de Anidrido Acético diretamente à solução, sob

- agitação leve e constante. Em seguida, mais 300µl foram adicionados gota a gota, diretamente sobre as lâminas imersas em tampão. O material foi incubado por 10min a temperatura ambiente.
7. Foram realizadas duas lavagens em 1x PBS-DEPC a temperatura ambiente por 5min (200ml/lavagem de até 15 lâminas).
 8. A solução de hibridação, contendo 50% de formamida; 10mM Tris-Cl pH 8,0; 200ug/ml tRNA de levedura; 10% dextran-sulfato; 1x Denhardt's solution; 600mM NaCl; 0,25%SDS; 1mM EDTA foi preparada previamente, no mesmo dia de sua utilização. Alíquotas de 200µl/lâmina desta solução foram acondicionadas em tubos eppendorf de 1,5ml e incubadas a 85°C por 10min.
 9. A sonda foi adicionada aos tubos com solução de hibridação, onde foi denaturada a 85°C por 3min. Foram utilizados 150ng.ml⁻¹ de cada sonda de *Egr-1* e 1000 ng.ml⁻¹ para as demais sondas, salvo variações indicadas em cada experimento.
 10. Em seguida, a solução de hibridação contendo as sondas foi aplicada sobre as lâminas, as quais foram posteriormente cobertas por lamínula de vidro. O material foi incubado por 16h a 65°C (hibridação *in situ* colorimétrica) ou 60°C (hibridação *in situ* fluorescente) em câmara úmida contendo solução de 5xSSC.
 11. Transcorridas as 16 horas, a lamínula foi deslocada do material em solução 5xSSC, a 65°C
 12. Imediatamente, as lâminas foram transferidas para soluções com concentrações decrescentes de SSC (2x; 0,2x; 0,1x) aquecidas a 65°C, e incubadas por 20min em cada solução.
 13. Em seguida, as lâminas foram lavadas em solução contendo 1xPBS e Tween-20 0,1% a temperatura ambiente por 10min.

7.3.1 Hibridação *in situ* colorimétrica

Os próximos passos são específicos para a hibridação *in situ* colorimétrica:

14. As lâminas foram pré-incubadas em solução PBT (PBS 1x; 0,1% Triton X-100; 0,2% BSA; 20% soro ovino estéril) por 3h a temperatura ambiente (500µl/lâmina).
15. Logo após, as lâminas foram incubadas em solução equivalente contendo 1:2000 do anticorpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatase alcalina (Roche), onde foram mantidas por 20h a 4°C (200µl/lâmina). As lâminas foram cobertas com parafilm para evitar a secagem da solução.

16. Transcorrido este tempo, o material foi lavado em PBT a temperatura ambiente por 30 minutos (600µl/lâmina).
- 17- O material foi lavado em solução 1x PBS e 0,1% Triton X-100 duas vezes por 10min cada (200ml/lavagem).
18. Incubou-se o material em tampão da enzima Fosfatase Alcalina (100mM Tris pH 9.5; 50mM MgCl₂; 100mM NaCl; 0.1% TWEEN 20) duas vezes por 5min cada (200ml/incubação).
19. Em seguida, no escuro, o material foi incubado com solução de detecção BCIP/NBT (Sigma) acrescida de 0,1% Tween-20 e filtrada em filtro 0,22µm imediatamente antes do uso. A incubação foi realizada até a obtenção de uma coloração adequada (ao redor de 16h; ~500µl/lâmina).
20. Quando as lâminas atingiram a coloração necessária, a reação foi parada com solução fixadora (0.1M TRIS pH 7.5; 2mM EDTA; 1mM MgCl₂; 3.7% Formaldeído).
21. As lâminas foram lavadas 3 vezes em 1xPBS por 5min cada (200ml/lavagem).
22. Realizou-se a contra-coloração com corante nuclear Hoechst 33258 0,5µg/ml em 1xPBS por 15min a temperatura ambiente (2000µl/lâmina).
23. As lâminas foram lavadas 3 vezes em 1xPBS por 5min cada (200ml/lavagem).
24. As lâminas foram montadas em meio de montagem ProLong Gold (Invitrogen) e os cortes foram analisados em microscópio Leica DM950.

7.3.2 Hibridação *in situ* fluorescente

Os próximos passos são específicos para a hibridação *in situ* fluorescente:

14. As lâminas foram pré-incubadas em solução de bloqueio TNB (100mM Tris-Cl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.5% NEN Blocking reagent – Perkin Elmer) por 1h a temperatura ambiente (500µl/lâmina).
15. Logo após, as lâminas foram incubadas em solução equivalente contendo anti-digoxigenina conjugado a fosfatase alcalina (1:500 - Roche) e anti-fluoresceína conjugado a peroxidase (1:200 – Roche) e mantidas por 20h a 4°C (200µl/lâmina). As lâminas foram cobertas com parafilm para evitar a secagem da solução.
16. Transcorrido este tempo, as lâminas foram lavadas 6 vezes em buffer TNT (100mM Tris-Cl pH 7.5, 150mM NaCl, Tween-20 0,1%) por 5min cada a temperatura ambiente (200ml/lavagem).

A marcação para a sonda de fluoresceína foi realizada conforme recomendações do fabricante (Perkin Elmer):

17. As lâminas foram incubadas com 100µl de tiramida-biotina (1/50) diluída em 1x amplification diluent (kit Perkin Elmer) e incubadas por 10min a temperatura ambiente. Utilizou-se parafilm para cobrir.

18. As lâminas foram lavadas 6 vezes em buffer TNT a temperatura ambiente por 5min cada, com agitação suave (200ml/lavagem).

19. O material foi incubado com streptavidina conjugada ao fluoróforo Alexa 488 (1/300) diluído em tampão TNB por 60min no escuro (200µl/lâmina). Utilizou-se parafilm para cobrir.

20. As lâminas foram lavadas 6 vezes em buffer TNT a temperatura ambiente por 5min cada, com agitação suave (200ml/lavagem).

A marcação para a sonda de digoxigenina foi realizada através da utilização dos reagentes Fast Red/HNPP (Roche):

21. As lâminas foram incubadas em tampão de detecção (100mM Tris-Cl pH 8.0; 100mM NaCl; 10mM MgCl₂) no escuro por 10min;

22. Em seguida, as lâminas foram incubadas com 90µl de solução HNPP/Fast Red (tampão de detecção acrescido de HNPP e Fast Red, segundo recomendações do fabricante) no escuro a RT por 30min. Utilizou-se parafilm para cobrir;

23. As lâminas foram lavadas 1 vez em TNT buffer por 5min cada, com agitação suave;

24. Os passos 22 e 23 foram repetidos três vezes, totalizando 120min na solução HNPP/Fast Red.

25. As lâminas foram lavadas 6 vezes em buffer TNT a temperatura ambiente por 5min cada, com agitação suave (200ml/lavagem).

26. Por fim, realizou-se a contra-coloração com corante nuclear Hoechst 33258 0,5µg/ml em 1xPBS por 15min a temperatura ambiente (2000µl/lâmina).

27. As lâminas foram lavadas 3 vezes em 1xPBS por 5min cada (200ml/lavagem).

28. As lâminas foram montadas em meio de montagem ProLong Gold (Invitrogen) e os cortes foram analisados em microscópio confocal Zeiss LSM510.

7.4. Imunohistoquímica

Os ensaios de imunohistoquímica foram realizados em cortes utilizando kit de amplificação de sinal por tiramida (Invitrogen): Primeiramente, os cortes foram submetidos a algum dos métodos utilizados para recuperação de antígenos (0,1% Triton X-100, acetona, 1% SDS, ou incubação a 80°C em tampão citrato 10mM). Em seguida, as lâminas foram transferidas para solução de bloqueio (1% BSA) por 1h, seguido de incubação com o anticorpo primário em solução equivalente. As seguintes versões foram utilizadas como anticorpo primário: duas versões policlonais para c-Fos, 1:200 (Calbiochem - Ab-5; Novus – NB110-75039); anti-c-Fos monoclonal, 1:200 (Abcam - ab99517); anti-Egr-1 monoclonal, 1:50 (Santa Cruz Biotechnology – S-25). Após lavagens em PBS 1x, procedeu-se à incubação em anticorpo secundário em solução de bloqueio por 2h. Como anticorpo secundário, utilizou-se anticorpo anti-rabbit conjugado à enzima peroxidase, 1:100, (T-20922; Invitrogen) para os anticorpos policlonais, enquanto que, para os anticorpos monoclonais, foi utilizado o anticorpo anti-mouse conjugado à enzima peroxidase, 1:400, (ab6789 – Abcam). Transcorrido este tempo, o material foi transferido para solução reveladora, contendo tiramida conjugada com o fluoróforo Alexa-488. Ao final, o material foi contracorado com 0,5ug/ml Hoechst 33258 (Sigma) em PBS 1x, por 15min. A visualização do resultado final foi feita em microscópio de fluorescência Leica DM950.



Referências

8. REFERÊNCIAS

- Araneda R.C; Kini A.D; Firestein S. The molecular receptive range of an odorant receptor. **Nature Neuroscience**, v.3, 1248–1255, 2000
- Barnea, G., O'Donnell, S., Mancina, F., *et al.*, (2004). Odorant receptors on axon termini in the brain. **Science**, 304: 1468
- Bellringer, J.F. et al. Involvement of the vomeronasal organ and prolactin in pheromonal induction of delayed implantation in mice. **Journal of Reproduction & Fertility**, v.59, 223–228, 1980
- Belluscio L. et al. A map of pheromone receptor activation in the mammalian brain. **Cell**, v.97, 209–220, 1999
- Berghard A; Buck L. B. Sensory transduction in vomeronasal neurons: evidence for $G_{\alpha o}$, $G_{\alpha i2}$ and adenylyl cyclase II as major components of a pheromone signaling cascade. **The Journal of Neuroscience**, v.16, 909-918, 1996
- Blanchard D.C; Griebel G; Blanchard R.J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.25, 205–218, 2001
- Borowsky B. et al. Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. **PNAS**, v.98, 8966–8971, 2001
- Boschat C. et al. Pheromone detection mediated by a V1r vomeronasal receptor. **Nature Neuroscience**, v.5, 1261-1262, 2002
- Brady G; Barbara M; Iscove N.N. Representative *in vitro* cDNA amplification from individual hemopoietic cells and colonies. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v.2, 17-25, 1990
- Brechbuhl J. et al. Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice. **Science** v.321, 1092–1095, 2008
- Brennan P.A; Schellinck H.M; Keverne E.B. Patterns of expression of the Immediate-Early Gene *Egr-1* in the Accessory Olfactory Bulb of female mice exposed to pheromonal constituents of male urine. **Neuroscience**, v.90, n.4, 1463-1470,1999
- Brennan P.A; Zufall F. Pheromonal communication in vertebrates. **Nature**, v.444, 308–15, 2006
- Bruce H.M. An Exteroceptive Block to Pregnancy in the Mouse. **Nature**, v.184, 105, 1959
- Buck L; Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. **Cell**, v.65, 175–187, 1991
- Buiakova O.I. et al. Olfactory marker protein (OMP) gene deletion causes altered physiological activity of olfactory sensory neurons. **PNAS**, v.93, 9858–9863, 1996
- Cappello P. et al. Proliferation and apoptosis in the mouse vomeronasal organ during ontogeny. **Neuroscience Letters**, v.266, 37–40, 1999

- Chamero *et al.* Identification of protein pheromones that promote aggressive behavior. **Nature**, v.450, 899-902, 2007
- Chess *et al.* Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. **Cell**, v.78:823-834, 1994
- Choi G.B. *et al.* 2011. Driving Opposing Behaviors with Ensembles of Piriform Neurons. **Cell**, v.146, n.6, 1004-1015, 2011
- Clayton D.F. The Genomic Action Potential. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.74, 185-216, 2000
- Del Punta K *et al.* Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. **Nature**, v.419, 70–74, 2002a
- Del Punta K *et al.* A divergent pattern of sensory axonal projections is rendered convergent by second-order neurons in the accessory olfactory bulb. **Neuron**, v.35, 1057–1066, 2002b
- Dielenberg R.A.; McGregor I.S. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.25, 597–609, 2001
- Doving K.B; Trotier D. Structure and Function of the Vomeronasal Organ. **The Journal of Experimental Biology**, v.201, 2913-2925, 1998
- Dulac C; Axel R. A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. **Cell**, v.83, 195-206, 1995
- Dulac C; Torello A.T. Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. **Nature Reviews Neuroscience**, v.4, 551-562, 2003
- Dulac C; Wagner S. Genetic Analysis of Brain Circuits Underlying Pheromone Signaling. **Annual Review of Genetics**, v.40, 449-467, 2006
- Eggan K. *et al.* Mice cloned from olfactory sensory neurons. **Nature**, v.428, 44–49, 2004
- Farbman, A.I. **Cell Biology of Olfaction**. Cambridge University Press, New York, 1992
- Feldmesser, E. *et al.* Widespread ectopic expression of olfactory receptor genes. **BMC Genomics**, v.7, 121, 2006
- Finlayson J.S. *et al.* Major urinary protein complex of normal mice: origin. **Science**, v.149, 981–982, 1965
- Firestein S; Darrow B; Shepherd G. M. Activation of the sensory current in salamander olfactory receptor neurons depends on a G protein-mediated cAMP second messenger system. **Neuron**, v.6, 825–835, 1991
- Firestein S. How the olfactory system makes sense of scents. **Nature**, v.413, 211–218, 2001
- Fleischer J. *et al.* Olfactory receptors and signaling elements in the Grueneberg ganglion. **Journal of Neurochemistry**, v.98, 543–54, 2006
- Fuss S. H; Omura M; Mombaerts P. The Grueneberg ganglion of the mouse projects axons to glomeruli in the olfactory bulb. **European Journal of Neuroscience**, v.22, 2649–2654, 2005

- Ghosh S. et al. Sensory maps in the olfactory cortex defined by long-range viral tracing of single neurons. **Nature**, v.472, 217-220, 2011
- Giacobini P et al. Proliferation and migration of receptor neurons in the vomeronasal organ of the adult mouse. **Developmental Brain Research**, v.123, 33–40, 2000
- Graziadei P. P. C; Monti Graziadei G. A. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. **Journal of Neurocytology**, v.8, 1-18, 1979
- Grosmaître X et al. Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. **Nature Neuroscience**, v.10, 348–354, 2007
- Grueneberg H. A ganglion probably belonging to the N. terminalis system in the nasal mucosa of the mouse. **Z Anat. Entwickl**, v.140, 39–52, 1973
- Haga S; Kimoto H; Touhara K. Molecular characterization of vomeronasal sensory neurons responding to a male-specific peptide in tear fluid: Sexual communication in mice. **Pure and Applied Chemistry**, v.79, n.4, 775-783, 2007
- Haga et al. The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behaviour through a specific vomeronasal receptor. **Nature**, v.466, 118-123, 2010
- Halem H. A; Cherry J. A; Baum M. J. Vomeronasal Neuroepithelium and Forebrain Fos Responses to Male Pheromones in Male and Female Mice. **Journal of Neurobiology**, v.39, n.2, 249-263, 1999
- Halem H. A; Cherry J. A; Baum M. J. Central forebrain Fos responses to familiar male odours are attenuated in recently mated female mice. **European Journal of Neuroscience**, v.13, 389-399, 2001
- Halpern M. The organization and function of the vomeronasal system. **Annual Review of Neuroscience**, v.10, 325–362, 1987
- Halpern M; Martínez-Marcos A. Structure and function of the vomeronasal system: an update. **Progress in Neurobiology**, v.70, 245-318, 2003
- Halpern M; Shapiro L.S; Jlia C. Differential localization of G proteins in the opossum vomeronasal system. **Brain Research**, v.677, 157-161, 1995
- Hannah A.A; Holy T.E. Chemosensory burst coding by mouse vomeronasal sensory neurons. **Journal of Neurophysiology**, v.106, 409-420, 2011
- Herrada G, Dulac C. A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. **Cell**, v.90, 763–773, 1997
- Ishii T; Hirota J; Mombaerts P. Combinatorial coexpression of neural and immune multigene families in mouse vomeronasal sensory neurons. **Current Biology**, v.13, 394–400, 2003
- Ishii T; Mombaerts P. Expression of nonclassical class I major histocompatibility genes defines a tripartite organization of the mouse vomeronasal system. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, 2332-2341, 2008

- Ishii T; Mombaerts P. Coordinated coexpression of two vomeronasal receptor V2R genes per neuron in the mouse. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v.46, 397–408, 2011
- 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, 657-669, 2004
- Isogai Y *et al.* Molecular organization of vomeronasal chemoreception. **Nature**, v. 478, 241-5, 2011
- Jia C, Halpern M. Subclasses of vomeronasal receptor neurons: differential expression of Gproteins (*Gia2* and *Goα*) and segregated projections to the accessory olfactory bulb. **Brain Research**, v.719, 117–28, 1996
- Jia C; Goldman G; Halpern M. Development of vomeronasal receptor neuron subclasses and establishment of topographic projections to the accessory olfactory bulb. **Developmental Brain Research**, v.102, 209–216, 1997
- Johnson E.W; Eller P.M; Jafek B.W. An immuno-electron microscopic comparison of olfactory marker protein localization in the supranuclear regions of the rat olfactory epithelium and vomeronasal organ neuroepithelium. **Acta Oto-Laryngologica**, v.113, 766–771, 1993.
- Kaluza et al.Olfactory receptors in the mouse septal organ. **Journal of Neuroscience Research**, v.76, 442–52, 2004
- Kandel E.R; Schwartz J.H; Jessell T.M **Principles of neural science**. 4^a edição. Mac-Graw Hill, cap. 32, 2000
- Kaupp U. B. Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. **Nature Reviews Neuroscience**, v.11, 188-200, 2010
- Keller A; Margolis F.L. Isolation and characterization of rat olfactory marker protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v.251, 6232-6237, 1976.
- Kim D.G. et al. Construction of a bifunctional mRNA in the mouse by using the internal ribosomal entry site of the encephalomyocarditis virus. **Molecular and Cellular Biology**, v.12, 3636-3643, 1992
- Kimoto H et al. Sex peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. **Nature**, v.437, 898-901, 2005
- Kovács K.J. Measurement of Immediate-Early Gene Activation- c-fos and Beyond. **Journal of Neuroendocrinology**, v.20, 665–672, 2008
- Lancet D. Vertebrate Olfactory Reception. **Annual Review of Neuroscience**, v.9, 329-355, 1986
- Leinders-Zufall T. et al.Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. **Nature**, v.405, 792-796, 2000
- Leinders-Zufall et al. MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. **Science**, v.306,1033–37, 2004
- Lent R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. 1^a Edição, Atheneu, São Paulo, 2005

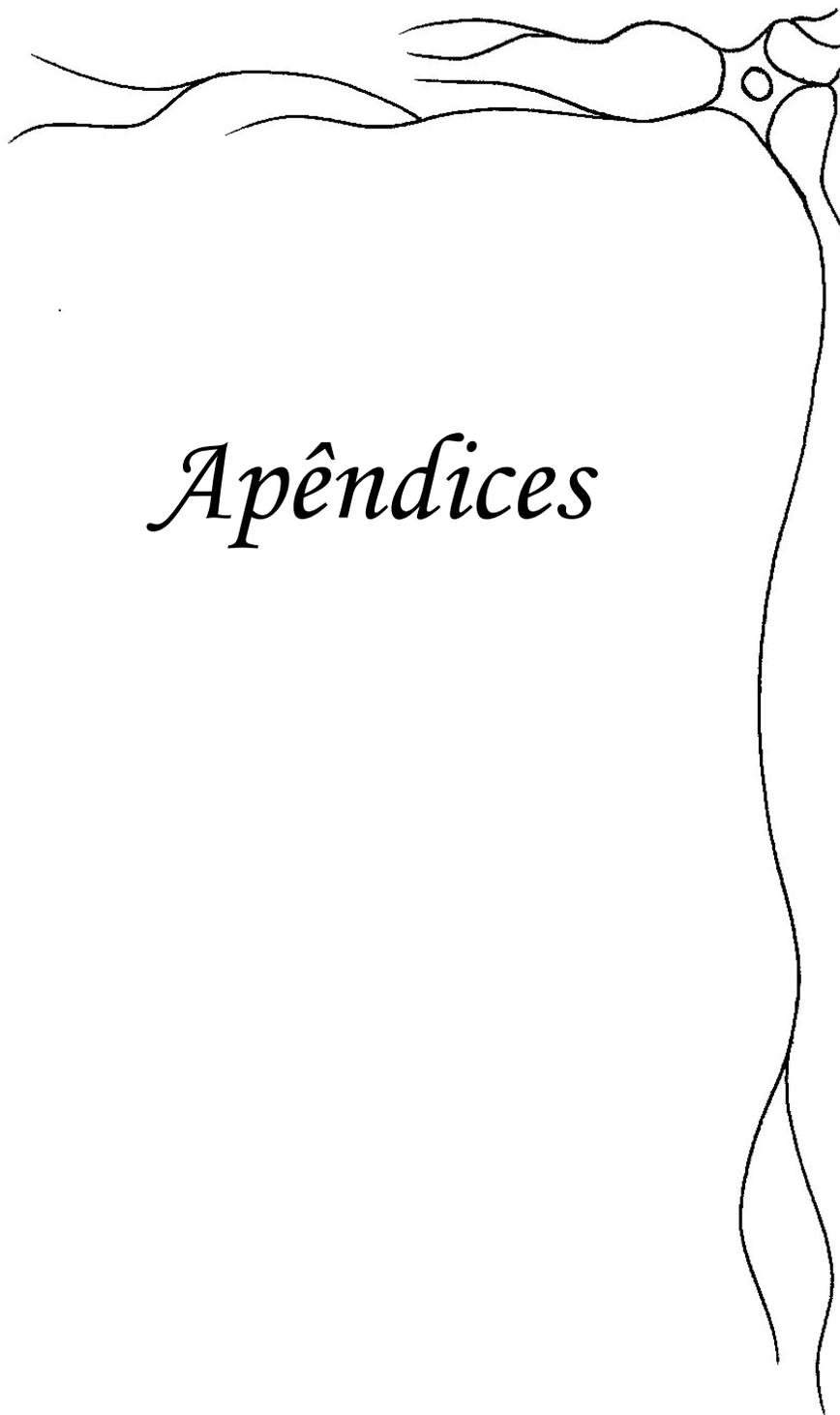
- Levai O, Strotmann J. Projection pattern of nerve fibers from the septal organ: DiI-tracing studies with transgenic OMP mice. **Histochemistry and Cell Biology**, v.120, 483–492, 2003
- Liberles S.D; Buck L.B. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. **Nature**, v.442, 645–650, 2006
- Li J. et al. Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons. **Nature**, v. 428, 393–399, 2004
- Lin D *et al.* Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. **Nature**, v.470, 221-226, 2010
- Loconto J. 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, 607–618, 2003.
- Ma M. et al. Olfactory signal transduction in the mouse septal organ. **The Journal of Neuroscience**, v.23, 317–324, 2003
- Magklara A. et al. An Epigenetic Signature for Monoallelic Olfactory Receptor Expression. **Cell**, v.145, n.4, 555-570, 2011
- Malnic B. et al. Combinatorial receptor codes for odors. **Cell**, v.96,713-723, 1999
- Martini S. et al. Co-expression of putative pheromone receptors in the sensory neurons of the vomeronasal organ. **The Journal of Neuroscience**, v.21, 843–48, 2001
- Matsunami H; Buck L.B. A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. **Cell**, v.90, 775– 784, 1997
- Matsuoka, M. et al. Synaptic plasticity in olfactory memory formation in female mice. **NeuroReport**, v.8, 2501–2504, 1997
- Matsushita F; Miyawaki A; Mikoshiba, K. Vomero-glandin/CRP Ductin is strongly expressed in the glands associated with the mouse vomeronasal organ: identification and characterization of mouse vomero-glandin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.268, 275–281, 2000
- McClintock T.S. Achieving Singularity in Mammalian Odorant Receptor Gene Choice. **Chemical Senses**, v.35, 447-457, 2010
- Meister M; Bonhoeffer T. Tuning and topography in an odor map on the rat olfactory bulb. **The Journal of Neuroscience**, v.21, 1351–1360, 2001
- Meredith M. Chronic recording of vomeronasal pump activation in awake behaving hamsters. **Physiology & Behavior**, v.56, 345–354, 1994
- Miyamichi K. Cortical representations of olfactory input by trans-synaptic tracing. **Nature**, v.472, 191-196, 2011
- Mombaerts P. et al. Visualizing an olfactory sensory map. **Cell**, v.87, 675–86, 1996
- Mombaerts P. Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor–one neuron hypothesis revisited. **Current Opinion in Neurobiology**, v.14, 31–36, 2004a

- Mombaerts P. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. **Nature Reviews Neuroscience**, v.5, 263-278, 2004b
- Mori K; Yoshihara Y. Molecular Recognition and Olfactory Processing in the Mammalian Olfactory System. **Progress in Neurobiology**, v.45, 585-619, 1995
- Mori K. et al. Maps of odorant molecular features in the mammalian olfactory bulb. **Physiological Reviews**, v.86, 409–33, 2006
- Munger S.D; Leinders-Zufall T; Zufall, F. Subsystem organization of the mammalian sense of smell. **Annual Review of Physiology**, v.71, 115-140, 2009
- Ngai J. *et al.* Coding of olfactory information: topography of odorant receptor expression in the catfish olfactory epithelium. **Cell**, v.72, 667–680, 1993
- Nei M; Nimura Y; Nozawa M. The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. **Nature Reviews Genetics**, v.9, 951-963, 2008
- Oka Y. et al. Odorant receptor map in the mouse olfactory bulb: in vivo sensitivity and specificity of receptor-defined glomeruli. **Neuron**, v.52, 857–869, 2006
- 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, 692-703, 2010
- Prêmio Nobel 2012. Disponível em: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2004/press.html
- Raisman G. An experimental study of the projection of the amygdala to the accessory olfactory bulb and its relationship to the concept of a dual olfactory system. **Experimental Brain Research**, v.14, 395-408, 1972
- Ressler K.J; Sullivan S.L; Buck L.B. A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. **Cell**, v.73, 597–609, 1993
- Ressler K.J; Sullivan S.L; Buck L.B. Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. **Cell**, v.79, 1245–55, 1994
- Rodolfo-Masera T. Su l'esistenza di un particolare organo olfattivo nel setto nasale della cavia e di altri roditori. **Archivio Italiano di Anatomia e di Embriologia**, v.48, 157–212, 1943
- Rodriguez I; Feinstein P; Mombaerts P. Variable patterns of axonal projections of sensory neurons in the mouse vomeronasal system. **Cell**, v.97, 199–208, 1999
- Rodriguez et al. A putative pheromone receptor gene expressed in human olfactory mucosa. **Nature Genetics**, v.26, 18–19, 2000
- Rodriguez I; Mombaerts P. Novel human vomeronasal receptor-like genes reveal species-specific families. **Current Biology**, v.12, 409–411, 2002
- Rubin B.D; Katz L.C. Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. **Neuron**, v.23, 499–511, 1999

- Rubin B.D; Katz L.C. Spatial coding of enantiomers in the rat olfactory bulb. **Nature Neuroscience** v.4, 355–356, 2001
- Ryba N.J, Tirindelli R. A new multigene family of putative pheromone receptors. **Neuron**, v.19, 371–379, 1997
- Sagar S.M; Sharp F.R; Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. **Science**, v.240, 1328-1331, 1988
- Saito H. et al. RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. **Cell**, v.119, 679–691, 2004
- Sakano H. Neural map formation in the mouse olfactory system. **Neuron**, v.6, n.4, 530-542, 2010
- Sambrook J; Russell D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3a edição CSHL Press, Cold Spring Harbor, 2001
- Scalia F; Winans S. S. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. **Journal of Comparative Neurology**, v.161, 31-56, 1975
- Serizawa S. et al. Mutually exclusive expression of odorant receptor transgenes. **Nature Neuroscience**, v.3, 687-693, 2000
- Shaul Y.B. et al. In vivo vomeronasal stimulation reveals sensory encoding of conspecific and allospecific cues by the mouse accessory olfactory bulb. **PNAS**, v.107, 5172-5177, 2010
- Shi P, Bielawski JP, Yang H, Zhang YP. Adaptive diversification of vomeronasal receptor 1 genes in rodents. **Journal of Molecular Evolution**, v.60, 566–576, 2005
- Shi P; Zhang J. Comparative genomic analysis identifies an evolutionary shift of vomeronasal receptor gene repertoires in the vertebrate transition from water to land. **Genome Research**, v.17, 166–174, 2007
- Shinohara H; Kato K; Asano T. Differential localization of G proteins, Gi and Go, in the olfactory epithelium and the main olfactory bulb of rat. **Acta Anatomica**, v.144, 167-171, 1992
- Silvotti L. et al. Combinatorial co-expression of pheromone receptors, V2Rs. **Journal of Neurochemistry**, v.103, 1753-1763, 2007
- Simmons P. A; Getchell T. V. Neurogenesis in olfactory epithelium : Loss and recovery of transepithelial voltage transients following olfactory nerve section. **Journal of Neurophysiology**, v.45, 516-528, 1981
- Sosulski D.L. Distinct representations of olfactory information in different cortical centres. **Nature**, v.472, 213-216, 2011
- Spehr M. et al. Essential role of the main olfactory system in social recognition of major histocompatibility complex peptide ligands. **The Journal of Neuroscience**, v.26, 1961–1970, 2006
- Staples L.G. Predator odor avoidance as a rodent model of anxiety: Learning-mediated consequences beyond the initial exposure. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.94 435–445, 2010

- Stettler D.D; Axel R. Representations of odor in the piriform cortex. **Neuron** v.63, 854–864, 2009
- Stowers L. et al. Loss of Sex Discrimination and Male-Male Aggression in Mice Deficient for TRP2. *Science*, v.295, 1493-1500, 2002
- Strotmann J. et al. Olfactory receptor proteins in axonal processes of chemosensory neurons. **The Journal of Neuroscience**, v.24, 7754-7761, 2004
- Su C; Menuz K; Carlson J. R. Olfactory Perception: Receptors, Cells, and Circuits. **Cell**, v.139, n.1, 45-59, 2009
- Szoka P.R; Paigen K. Regulation of mouse major urinary protein production by the Mup-A gene. **Genetics**, v.90, 597–612, 1978
- Takahashi L.K. et al. The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.29, 1157–1167, 2005
- Takami S; Graziadei P.C. Morphological complexity of the glomerulus in the rat accessory olfactory bulb—a Golgi study. **Brain Research**, v.510, 339-342, 1990
- Takami S; Graziadei P.P.C. Light microscopic Golgi study of mitral/tufted cells in the accessory olfactory bulb of the adult rat. **Journal of Computational Neurology**, v.311, 65–83, 1991
- Tian H; Ma M. Molecular organization of the olfactory septal organ. **The Journal of Neuroscience**, v.24, 8383–8390, 2004
- Tirindelli R. et al. From Pheromones to Behavior. **Physiological Reviews**, v.89, 921-956, 2009
- Touhara K. Deorphanizing vertebrate olfactory receptors: Recent advances in odorant-response assays. **Neurochemistry International**, v.51, 132–139, 2007
- Touhara K; Vosshall L.B. Sensing Odorants and Pheromones with Chemosensory Receptors. **Annual Review of Physiology**, v.71, 307-332, 2009
- Trotier D. Vomeronasal organ and human pheromones. **European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck diseases**, v.128, 184—190, 2011
- Trotier D; Doving K. B. 'Anatomical Description of a New Organ in the Nose of Domesticated Animals' by Ludvig Jacobson (1813). **Chemical Senses**, v.23, 743-754, 1998
- Uchida N. et al. Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. **Nature Neuroscience**, v.3, 1035–1043, 2000
- Vassar R; Ngai J; Axel R. Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. **Cell**, v.74, 309–318, 1993
- Vassar R. et al. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. **Cell**, v.79, 981–91, 1994
- Wagner S. A Multireceptor Genetic Approach Uncovers an Ordered Integration of VNO Sensory Inputs in the Accessory Olfactory Bulb. **Neuron**, v.50, 697-709, 2006

- Wes P. D. et al. TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. **PNAS**, v.92, 9652-9656, 1995
- Wyatt T.D. **Pheromones and animal behaviour: Communication by smell and taste**. 1^a edição. Oxford: Cambridge University Press, cps 9 e 11, 2003
- Xu F. et al. Simultaneous activation of the mouse main and accessory olfactory bulbs by odors or pheromones. **Journal of Comparative Neurology**, v.489, 491-500, 2005
- Yang H. et al. Composition and evolution of the V2r vomeronasal receptor gene repertoire in mice and rats. . **Genomics**, v.86, 306 – 315, 2005
- Young J.M; Trask B.J. V2R gene families degenerated in primates, dog and cow, but expanded in Opossum. **Trends in Genetics**, v.23, 212–215, 2007
- Zhang X. Odorant and vomeronasal receptor genes in two mouse genome assemblies. **Genomics**, v.83, 802–811, 2004
- Zhang X; Zhang X; Firestein S. Comparative genomics of odorant and pheromone receptor genes in rodents. **Genomics**, v.89, 441-450, 2007
- Zufall F; Leinders-Zufall T. Mammalian pheromone sensing. **Current Opinion in Neurobiology**, v.17, 483–89, 2007



Apêndices

9. APÊNDICES - Estratégias alternativas para a identificação de receptores dos odores fobiogênicos de predadores

Os apêndices descreverão outras estratégias empregadas para a deorfânização dos receptores dos CFPs. Nestas estratégias, foi utilizado o estímulo purificado dos CFPs, correspondente às MUPs recombinantes (rMUPs) de gatos e ratos (vide Metodologia dos Apêndices - Papes et al. 2010). O estímulo purificado foi preferido em relação ao estímulo complexo por permitir uma gama maior de abordagens experimentais: a versão recombinante das MUPs de gatos e ratos é conjugada a um ‘tag’ de ‘Maltose Binding Protein’ (MBP), o qual permite a identificação da rMUP através de anticorpo específico (anti-MBP). Além disso, este tag possui afinidade por uma resina de amilose, que permite a purificação da rMUP a partir de um extrato proteico. Tais ferramentas foram utilizadas nas estratégias descritas a seguir.

9.1. Imunohistoquímica anti-MUP em células sensoriais dissociadas

Uma de nossas estratégias alternativas envolveu a utilização de anticorpos anti-MUP e anti-MBP para detectar células responsivas aos estímulos fobiogênicos em células dissociadas do VNO. Nesta abordagem, células dissociadas foram incubadas com as rMUPs *in vitro*. A suposição era de que haveria manutenção das moléculas de rMUP associadas aos seus respectivos receptores de membrana nos neurônios dissociados. Tais células responsivas às MUPs poderiam então ser evidenciadas por imunohistoquímica, isoladas e submetidas a RT-PCR para determinação do receptor olfatório por elas expresso.

Conduzimos ensaios com células do VNO dissociadas e posteriormente incubadas com a proteína recombinante de gatos. Em experimentos utilizando o anticorpo anti-MBP (Figura 35), observamos a presença de marcação em algumas células dissociadas após exposição a estes estímulos, mas não ao estímulo controle (‘tag’ de MBP). Os ensaios com o anticorpo anti-MUP não geraram resultados positivos (dados não mostrados).

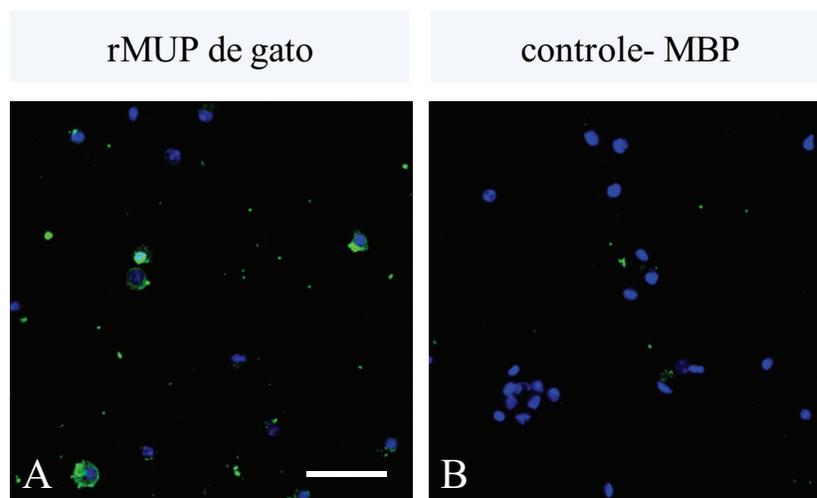


Figura 35 - **Imunohistoquímica anti-rMBP em células dissociadas do VNO.** Imagens de microscopia confocal de imunohistoquímica anti-MBP realizada em células do VNO dissociadas e submetidas à exposição às rMUPs *in vitro*. Em verde, marcação correspondente ao anti-MBP. Em azul, corante nuclear DAPI. A: Material exposto às rMUPs de gato; B: Material exposto ao ‘tag’ de MBP. Barra: 100 μ m.

Apesar do resultado positivo, os ensaios envolvendo esta estratégia foram suspensos, uma vez que seu resultado é menos robusto do que o obtido para o IEG *Egr-1* nos ensaios de hibridação *in situ* descritos anteriormente. É possível que a afinidade associativa entre as rMUPs e os neurônios dissociados ocorra de maneira inespecífica, não relacionada com a detecção dos estímulos fobiogênicos, o que prejudicaria os futuros experimentos para identificação do receptor sensível às rMUPs. Esta possibilidade é reforçada pelo grande número de células marcadas pelo anticorpo anti-MBP nos ensaios realizados (Figura 35), um número muito superior ao esperado.

9.2. Co-imunoprecipitação de proteínas de membrana do VNO e rMUP

Esta estratégia consistiu na utilização das rMUPs como iscas para a obtenção das proteínas de membrana do VNO com afinidade pelas rMUPs, através de experimentos de “pulldown”. Nestes ensaios, amostras de membrana de VNO (extrato), dissociadas dos demais componentes celulares através de lise e ultracentrifugação, foram incubadas com as rMUPs (‘bait’) no intuito de promover a interação entre rMUP e seu(s) receptor(es) específico(s). Em seguida, a resina de amilose foi utilizada para purificar as rMUPs, juntamente com as proteínas

que estivessem associadas à mesma. Um tag de Maltose Binding Protein (MBP) associado à rMUP foi utilizado para esta etapa de recuperação das proteínas de interesse, através da afinidade existente entre o MBP e resinas de amilose. A suposição era de que, entre as proteínas associadas às rMUPs, encontraríamos o receptor do VNO para os CFPs de gatos ou ratos.

As proteínas isoladas através desta técnica foram separadas por SDS-PAGE e as imagens digitalizadas foram analisadas em busca de bandas de tamanho correspondente aos receptores. Estas bandas seriam isoladas e submetidas a sequenciamento de aminoácidos (com o auxílio do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, SP). Adotamos esta estratégia alternativa pois esta dispensaria a necessidade de experimentos subsequentes para a identificação do receptor, como no caso da estratégia descrita para os IEGs.

Nesta estratégia, a obtenção da rMUP purificada foi realizada previamente, em preparação para o ensaio de ‘pulldown’ (vide seção 9.4). Bactérias foram induzidas a expressarem a rMUP através da adição de IPTG. Logo após a indução, as bactérias foram lisadas e o material obtido foi submetido a purificação utilizando resina de amilose, para a qual o tag de MBP presente na rMUP possui afinidade. A purificação através da interação entre o “tag” de MBP presente na rMUP e a resina de amilose resultou na purificação de uma banda única de tamanho esperado para a fusão MBP-MUP, visualizada em gel SDS-PAGE (Figura 36). Este procedimento foi adotado para a MUP de gatos e ratos, além da MUP8 de camundongos (Logan et al. 2008), que foi utilizada como controle negativo.

A diferenciação entre os receptores específicos dos CFPs e outras proteínas que poderiam associar-se à rMUP ou ao ‘tag’ de MBP era crucial para a interpretação do resultado dos ensaios de ‘pulldown’. Como controles do experimento, utilizamos extratos de proteínas do MOE incubado com o ‘tag MBP ou com as rMUPs . Não se esperava que receptores específicos para as MUPs seriam recuperados por ‘pulldown’ a partir do MOE, uma vez que foi demonstrado que o MOE não apresenta resposta sensorial às rMUPs (Papes et al. 2010). Além do MOE, foi utilizado como controle negativo um extrato de proteínas do VNO incubado somente com o “tag” rMBP.

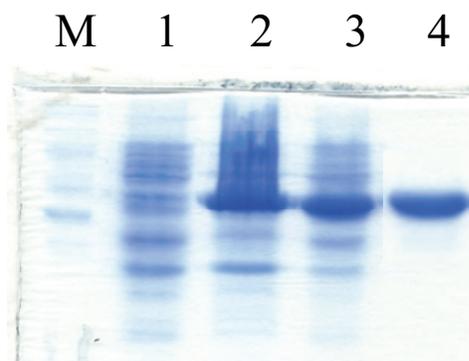


Figura 36 – Purificação de rMUP. SDS-PAGE de amostras correspondentes a etapas de purificação da MUP recombinante de gatos. M: marcador de peso molecular; 1: suspensão bacteriana antes de indução com IPTG; 2: suspensão bacteriana pós-indução com IPTG; 3: lisado bacteriano pós-expressão; 4: proteína purificada por resina de amilose. Coloração por Coomassie Blue.

O resultado esperado no SDS-PAGE do ‘pulldown’ seria uma banda diferencial, ao redor de 100KDa, equivalente ao tamanho médio de um receptor vomeronasal. Tal banda deveria estar presente apenas na amostra correspondente ao extrato de proteínas do VNO incubado com as rMUPs (Figura 37). Entretanto, tal banda diferencial não foi obtida em nenhum dos ensaios realizados. Embora esta estratégia seja em princípio muito vantajosa, uma vez que resulta diretamente na determinação bioquímica dos receptores das rMUPs, não obtivemos sucesso nos experimentos realizados, provavelmente devido ao alto ‘background’ existente, dificultando a visualização de receptores específicos. Ao longo dos ensaios, foram testadas diferentes proporções da isca (rMUP) e do extrato de proteínas do VNO, na tentativa de minimizar o aparecimento de proteínas indesejáveis após o ‘pulldown’, e maximizar o rendimento das proteínas de interesse purificadas. Além disso, um ‘pre-cleaning’ com rMUPs de camundongos foi realizado com o extrato de proteínas do VNO, na tentativa de reduzir o nível de associações inespecíficas com a rMUP de predadores. Os sucessivos insucessos nos levaram a preterir esta estratégia em relação aos IEGs.

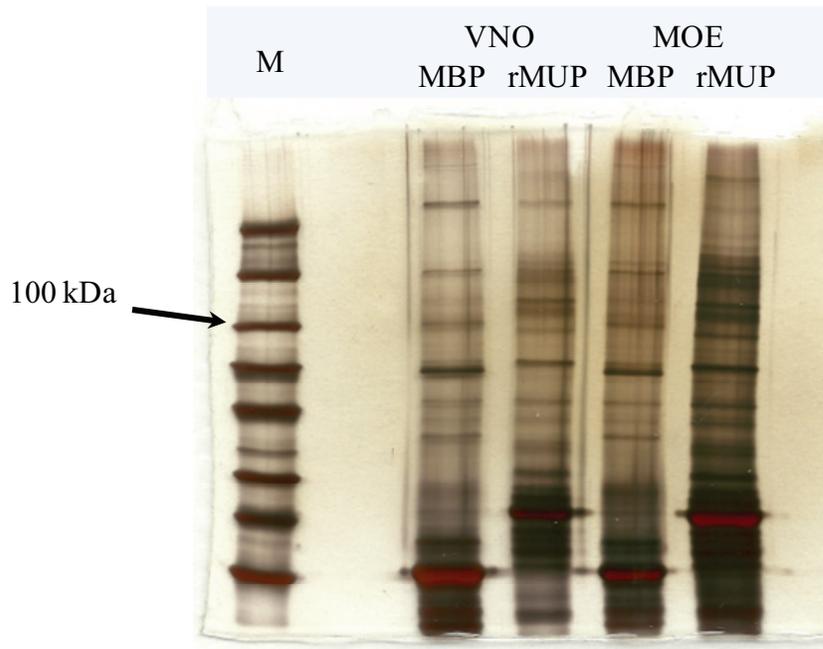


Figura 37 - SDS-PAGE do ‘pull-down’ de proteínas de membrana do MOE e do VNO, utilizando como “isca” a proteína recombinante rMUP. O resultado do SDS-PAGE demonstra o extrato protéico resultante do ‘pull-down’ de extrato do VNO ou do MOE com MBP ou rMUP. Bandas diferenciais ao redor de 100KDa correspondentes aos receptores vomeronasais específicos para a rMUP eram esperados na combinação desta com o extrato de VNO. Os demais pull-down são controles, e indicam bandas correspondentes a proteínas não específicas para as rMUPs. Coloração por prata.

9.3. Pseudotipagem viral

Nesta estratégia, foram produzidos lentivírus pseudotipados expressando rMUP em seu envelope viral, de modo que este fosse especificamente virulento para as células que expressam receptores para as MUPs (de modo análogo a Anliker et al. 2010). Desta forma, neurônios do VNO transduzidos com estes vírus poderiam ser evidenciados através da expressão de *eGFP* (Figura 38). Os neurônios GFP-positivos teriam seus receptores identificados por RT-PCR. Este experimento foi conduzido em colaboração com o idealizador da técnica de pseudotipagem viral, Prof. Dr. Christian Buchholz, do Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Alemanha.

Os vetores lentivirais foram construídos e utilizados em ensaios *in vivo* e *in vitro* para infecção do VNO. Apesar da engenhosidade da técnica, não obtivemos resultados positivos,

especialmente devido a dificuldades na implementação de uma estratégia eficiente para a transfecção de neurônios vomeronasais. Provavelmente, seriam necessários testes com vírus com maior poder de infecção do que os lentivírus.

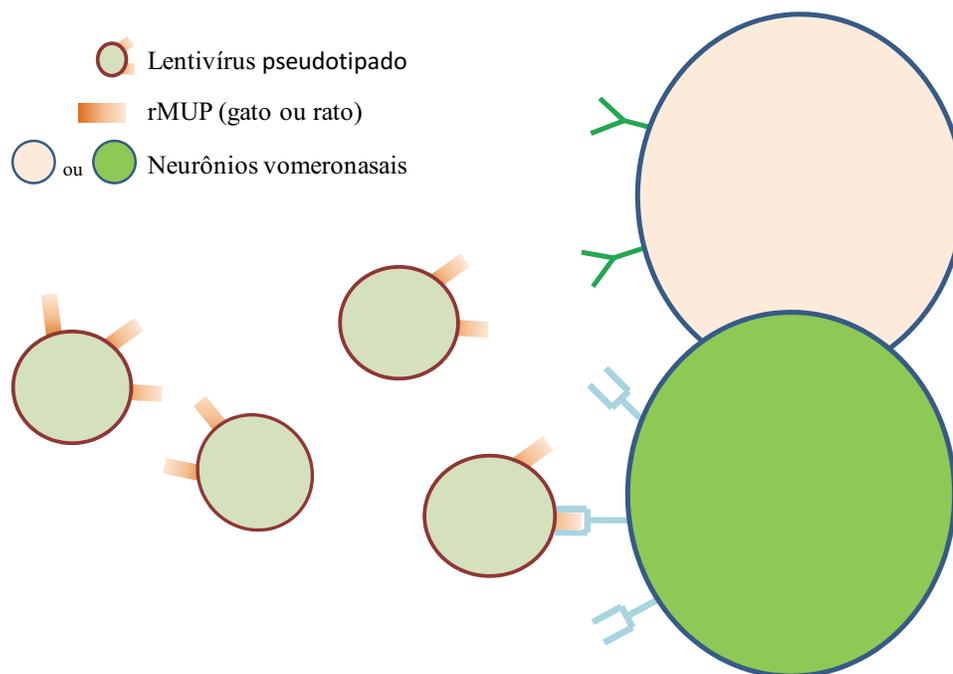


Figura 38 – Esquema explicativo da estratégia de pseudotipagem viral. Lentivírus pseudotipados para expressarem rMUPs em seus envelopes virais seriam virulentos apenas para neurônios vomeronasais que expressam receptores específicos para rMUPs. Deste modo, os neurônios infectados poderiam ser evidenciados através da expressão de eGFP, induzida pela infecção viral.

9.4. Metodologia dos apêndices

9.4.1. Obtenção da proteína (MUP) recombinante

Conforme protocolo desenvolvido anteriormente em nosso laboratório (Papes et al. 2010), versões recombinantes das MUPs de gatos foram obtidas pela expressão destas proteínas em bactérias. As rMUPs foram utilizadas em experimentos de pull-down e para exposição de células do VNO dissociadas antes de ensaio de imunohistoquímica anti-MBP ou anti-MUP. Brevemente, os genes das MUPs de gatos foram amplificados por PCR a partir de DNA da saliva de gatos, e posteriormente clonados em vetor de expressão bacteriana pMAL-c2x (New England Biolabs). A proteína recombinante foi expressa a partir deste vetor como uma fusão entre MUP e ‘Maltose

Binding Protein' (MBP), sendo este último o 'tag' utilizado para posterior purificação por cromatografia de afinidade em coluna de amilose. Para a expressão, uma cultura bacteriana de $OD_{600}=0,5$ mantida em meio LB foi induzida à produção de proteína recombinante através da introdução de 0,3mM de IPTG à suspensão. Após 2 horas, a suspensão bacteriana foi submetida à centrifugação, e o pellet obtido foi ressuscitado em Column buffer (20mMTris-Cl/ 1mM EDTA/ 200mM NaCl) e submetido à digestão com lisozimas. O lisado resultante foi incubado com resina de amilose em Column buffer por 12h a 4°C, com agitação. Transcorrido este tempo, a resina foi lavada sucessivas vezes em Column buffer e submetida à eluição em solução 25mM de D(+)Maltose. Antes da utilização, o eluato foi submetido à diálise em membrana 'snakeskin' (ThermoScientific) de 10kDa de cutoff em PBS 1x.

9.4.2. Preparação de membranas do VNO e pulldown utilizando rMUPs

Os experimentos de pulldown realizados até o momento utilizaram porções de membrana do VNO (e de MOE, como controle), as quais eram previamente isoladas dos demais componentes celulares seguindo protocolo baseado em Ortmann et al. 1997. Logo após a dissecação, os VNOs foram incubados em tampão de lise (10mM Tris-CL pH 7,5; 150mM NaCl; 1% NP-40) contendo diversos inibidores de proteases para evitar a degradação dos receptores de membrana do VNO (5mM iodoacetamida; 1mM "phenylmethylsulfonylfluoride"; 1mM ditiotretitol; 1:200 Protease Inhibitor Cocktail, set III – Calbiochem). Os VNOs foram macerados em pisitlo e cadinho e, logo após, incubados em tampão de lise por 1h a 4°C. Transcorrido este tempo, o lisado obtido foi submetido a uma centrifugação inicial, a 2000g por 10min a 4°C, para separação do material insolúvel dos demais componentes solúveis, dentre os quais constava as porções de membrana. O sobrenadante desta centrifugação inicial foi, então, submetido à ultracentrifugação a 100.000g por 1h a 4°C. O precipitado obtido, contendo as porções de membrana do VNO, foi ressuscitado em tampão de lise contendo 2% NP-40. O experimento de pulldown foi realizado segundo orientações de Coligan et al. 2011. O isolado de membranas do VNO foi incubado com resina de amilose associada a rMUP de gato (ou rMBP, como controle) em tampão de lise por 14h, em agitação moderada. Utilizamos de 10 a 1000 vezes mais proteínas de membrana do VNO do que rMUP neste mix. Após a incubação, efetuamos sucessivas lavagens da resina em tampão de lise, para remoção das proteínas não-associadas. Após as

lavagens, as proteínas associadas à resina foram eluídas através de incubação em tampão contendo 0,7% SDS, a 95°C e submetidas à separação através de SDS-PAGE. O resultado foi visualizado através de coloração por prata, seguindo protocolo padrão Coligan et al. 2011.

9.4.3. Dissociação das células do VNO e exposição às rMUPs

Células dissociadas do VNO foram utilizadas em experimentos de imunohistoquímica com anticorpos anti-MUP e anti-MBP. Para a dissociação, VNOs dissecados foram levemente triturados em tampão de dissociação (1x PBS/ 1,1mM EDTA/ 5,5mM cisteína-HCl/ 2,2u/ml papaína), onde foram incubados por 30min a 37°C e 250RPM. Após a dissociação, foram adicionados 10 volumes de meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina e streptamicina, promovendo a inativação da papaína. O material não-dissociado foi separado através de centrifugação a 200g por 5min. O sobrenadante contendo as células dissociadas foi transferido para LABTEK (8 wells – Nunc) e mantido por 1h a 37 °C para permitir a adesão das células na superfície da lâmina. Logo após, o material foi incubado em solução 1x PBS contendo rMUP (ou MBP, como controle) por 30min, fixado em 4%PFA por 10min e submetido a ensaio de imunohistoquímica, como descrito anteriormente (seção 7.4.).

9.5. Referências específicas dos apêndices

- Anliker, B. Specific gene transfer to neurons, endothelial cells and hematopoietic progenitors with lentiviral vectors. **Nature Methods**, v.7, 929-935, 2010
- Coligan C. et al. **Current Protocols in Protein Science**. John Wiley & Sons, New York, 2011
- Logan D.W; Marton T.F; Stowers L. Species specificity in major urinary proteins by parallel evolution. **PLoS One**, v.3, e328, 2008
- Ortmann, B. et al. A Critical Role for Tapasin in the Assembly and Function of Multimeric MHC Class I–TAP Complexes. **Science**, v.277, 1306-1309, 1997

DECLARAÇÃO

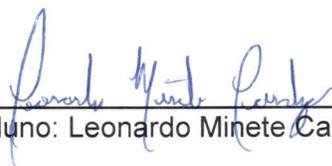
Campinas, 23 de janeiro de 2012

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "Identificação de receptores moleculares para ligantes detectados pelo órgão vomeronasal":

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

- CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. 2008/04 - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo.

- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 1883-1, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo.



Aluno: Leonardo Minete Cardozo

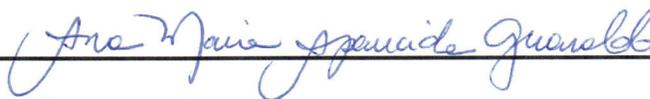


Orientador: Fabio Papes

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



Prof. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



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

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

CERTIFICADO

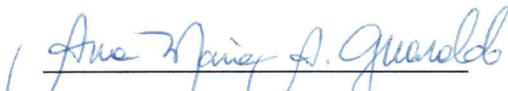
Certificamos que o Protocolo nº 1883-1, sobre "Estudo molecular do sistema olfativo em mamífero", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Fábio Papes / Leonardo Minete Cardozo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA),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

CERTIFICATE

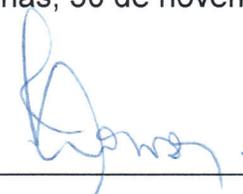
We certify that the protocol nº 1883-1, entitled "Molecular studies of the olfactory system in mammals", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for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

Campinas, 30 de novembro de 2011.

2ª. VIA



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia



DECLARAÇÃO

Campinas, 20 de janeiro de 2012

Declaro, para os devidos fins, que o aluno Leonardo Minete Cardozo, RG 1548770, CPF 058622267-70, desenvolveu seu projeto de dissertação de Mestrado, intitulado "**Identificação de receptores moleculares para ligantes detectados pelo órgão vomeronasal**", de maneira vinculada ao projeto de pesquisa "Estudo Molecular dos Sistemas Olfativos em Mamíferos", registrado na Comissão Interna de Biossegurança do Instituto de Biologia, UNICAMP, sob o número de processo 2009/II-03.

Fabio Papes

Professor Doutor
Departamento de Genética e Evolução
Instituto de Biologia
UNICAMP
papesf@unicamp.br
3521-6223

Fabio Papes
Prof. Doutor - Depto. de Genética
Instituto de Biologia - UNICAMP