

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

CASSANDRA SANTANTONIO DE LYRA

**Alteração na representação de subpopulações de neurônios
no epitélio olfatório de camundongos *Ric8b* cKO**

Versão da Tese Corrigida
São Paulo
Data do Depósito na SPG:
03/02/2022

CASSANDRA SANTANTONIO DE LYRA

**Alteração na representação de subpopulações de
neurônios no epitélio olfatório de camundongos *Ric8b*
cKO**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Orientadora: Profa. Dra. Bettina Malnic

São Paulo
2022

)nnnnnnnnnn
nnnnnnnnnnJ

nnnnnn
nnnnnnn2n
nnnnnnnnnn

nnnnnn-
n)nnfnfnH2qg&7

F88UΔ F± Δ,RkΔ≤Δ%~ ΔRÉΔ%<Δ%<°%μ°R~=
RRR0∞<= ΔR°R%ΔR_ =≥ =≤=%<ΔR~R=>°>∞ΔE≤R~=
%=> %μ°≤R%°R=≥μ<∞μ°R°∞/Δ<□μ°R~R"Δ->%~°%#°≤RÖμ"é"
"50R2RkΔ≤Δ%~ ΔRÉΔ%<Δ%<°%μ°R~R=RF±_Δ1R.RÉRÉΔ>∞°,
UMUU1
RRRQMbr≥1

Ó=≤=Rt~°>° Δ~°pR.R7%≤<μ<>°R~RH>□μ"ΔR~Δ
;%μS= ≤μ-Δ~R~R=RE°REΔ>∞°1RÁ=≥Δ_<Δ~=%<°R~=
wμ°>□μ"Δ1
RRR0_μ=%<Δ~°_KR6Δ∞%μ",Rw=<<μ%Δ

RRRQ1R0∞/Δ<°1RU1RÖ="=≥<° =≤1Rv1RJ=> %μ°≤1Rb1
Ö=≤μ ΔR1Rj1Rk°-≥° <Δ~=%<°RΔ∞μ~=%<Δ_1R71RÖ1R771
6Δ∞%μ",Rw=<<μ%Δ,R°_μ=%<Δ~°_1

Dedicado a meus queridos pais, Jorge e Cida, com muito amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, Jorge e Cida, que me apoiaram durante toda a vida e acreditaram em mim até nos momentos mais difíceis.

Agradeço à professora Bettina Malnic, uma orientadora excelente que me inspira profundamente e que me orientou de forma inteligente e humana, com a sensibilidade de perceber o que eu precisava a cada momento para evoluir no meu doutorado.

Agradeço aos colaboradores do laboratório que auxiliaram muito na realização desse trabalho. Agradeço à Pamela e à Professora Alicia Kowaltowski pelo auxílio nos experimentos de comportamento alimentar; ao Phelipe e ao Professor Thiago Moreira (que realizaram os experimentos de fisiologia respiratória) pelo auxílio na compreensão dos experimentos; ao Felipe, ao Rodrigo e ao Professor Pedro Galante (que realizaram a bioinformática desse trabalho) pela ajuda na compreensão da bioinformática.

Agradeço a todos os meus amigos e colegas, que me ajudaram de diversas formas a manter a sanidade e fazer um bom trabalho no doutorado. Agradeço em especial ao Cleiton, que me ensinou tanto e cuja amizade é tão valiosa; ao Victor e ao Luiz, amigos queridos que cuidaram das minhas obrigações de laboratório enquanto eu estive doente e ainda faziam o dia a dia do laboratório ficar divertido e interessante; à Thalita e à Bianca, cujas conversas me deram direção e calma nos momentos de crise, amigas muito especiais; à Érica, que sempre salva os alunos nos momentos de desespero e agracia o laboratório com sua simpatia e risada diariamente; à Rafaella pelo constante bom humor que torna tudo mais leve no trabalho; ao Thiago que me ajudou a superar dificuldades em experimentos mais complexos e realizou a *in situ* de *Trpc2*. Gratidão por tantos outros, que enriqueceram minha vida e meu trabalho, que nem caberia nesse espaço.

Agradeço aos meus queridos camundongos cujas vidas foram essenciais para o progresso da ciência, que seu valor seja sempre lembrado e que a ciência progrida sempre para o bem de todos os seres.

Agradeço à CAPES pelo fomento durante minha pesquisa, à FUSP pelo auxílio durante a pandemia de COVID-19 e à FAPESP pelo fomento ao laboratório da Profa. Dra. Bettina Malnic.

A todos os envolvidos nesse trabalho: meu eterno apreço.

EPÍGRAFE

“A ciência não tem como propósito nos curar dos mistérios da vida, mas sim constantemente reinventá-los.”

**Robert M. Sapolsky
(tradução da autora)**

RESUMO

Lyra, C.S.de **Alteração na representação de subpopulações de neurônios no epitélio olfatório de camundongos *Ric8b* cKO. 2022.** 112p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O objetivo desse trabalho foi identificar as consequências moleculares e funcionais da falta da proteína *Ric8b* no epitélio olfatório de camundongos. Para esse fim, comparamos o transcriptoma de epitélio olfatório de camundongos *knock-out* tecido específico para a proteína RIC8B (*Ric8b* cKO) com o dos seus irmãos tipo selvagem (WT). Identificamos muitos genes que apresentaram expressão reduzida no epitélio olfatório do camundongo *Ric8b* cKO, mas também vários genes que apresentaram a sua expressão aumentada. A maioria dos genes com expressão reduzida corresponde a genes normalmente expressos em neurônios olfatórios maduros, como por exemplo os genes de receptores olfatórios, o que é compatível com o fato já conhecido de que os camundongos *Ric8b* cKO apresentam um menor número desses neurônios. Inesperadamente, apesar de a maioria dos genes de receptores olfatórios ter a sua expressão diminuída no camundongo *Ric8b* cKO, observamos que um grupo destes genes de receptores teve a sua expressão aumentada. Os camundongos *Ric8b* cKO apresentaram também genes marcadores de outros tipos celulares que não neurônios canônicos com expressão aumentada no seu epitélio olfatório. Dentre eles, os mais significativamente alterados foram os genes marcadores de neurônios *Trpc2+* tipo B (que expressam a guanilato ciclase solúvel *Gucy1b2*). Sabe-se que este tipo de neurônio é responsável pela sensibilidade a diferentes gases, e concordantemente, observamos que os camundongos *Ric8b* cKO apresentaram um aumento da sensibilidade a gás carbônico. Como o olfato apresenta um papel importante na regulação de ingestão alimentar, analisamos como os camundongos *Ric8b* cKO se comportam frente a diferentes dietas. Interessantemente, observamos que esses animais não apresentam preferência por alimento rico em gorduras quando comparado aos seus irmãos tipo selvagem. Nossos resultados sugerem, portanto, que a ausência da proteína RIC8B resulta na alteração de representatividade de neurônios canônicos e não canônicos no epitélio olfatório de camundongos, o que por sua vez leva a alterações funcionais e comportamentais.

Palavras-chave: receptores olfatórios, neurônios olfatórios, subpopulações de neurônios, epitélio olfatório, sensibilidade a gases, comportamento alimentar, *Ric8b*.

ABSTRACT

Lyra, C.S.de **Altered representation of neuronal sub-populations in the olfactory epithelium of *Ric8b* conditional knock-out mice.** 2022. 112p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The objective of this work was to identify the molecular and functional consequences of the lack of the RIC8B protein in the main olfactory epithelium of mice. To this end, we compared the olfactory epithelium transcriptome of *Ric8b* tissue-specific knock-out mice (*Ric8b* cKO) with that of their wild-type littermates (WT). We identified many genes with differential expression, many of which were downregulated and also some which were upregulated in the olfactory epithelium of the *Ric8b* cKO mice. Most of the downregulated genes correspond to genes normally expressed in mature olfactory sensory neurons, such as olfactory receptor genes. This is compatible with the already known fact that the *Ric8b* cKO mice have less of this kind of neuron. Unexpectedly, even though most of the olfactory receptor genes were downregulated, we observed a subset of these genes that had their expression upregulated in the *Ric8b* cKO mice. The *Ric8b* cKO mice also showed upregulation for genes that are markers for cell types other than canonic neurons in their olfactory epithelium. Among these, the most significantly altered were the markers for neurons *Trpc2*⁺ type B (that express the soluble guanylate cyclase *Gucy1b2*). It is known that this kind of neuron is responsible for sensitivity to different gases. Accordingly, we observed that the *Ric8b* cKO mice presented a higher sensitivity to carbon dioxide. Since olfaction has an important role in food intake, we analyzed how the *Ric8b* cKO mice behaved with different diets. Interestingly, we observed that the *Ric8b* cKO mice lack preference for high fat diet when compared to their wild-type littermates. Our results indicate, therefore, that the lack of the RIC8B protein results in altered representativity of canonic and non-canonic neurons in the olfactory epithelium of mice, which then leads to altered function and behavior.

Keywords: olfactory receptors, olfactory neurons, neuronal subpopulations, olfactory epithelium, sensitivity to gases, feeding behavior, *Ric8b*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Anatomia macroscópica do sistema olfatório.....	12
1.2	Anatomia microscópica do sistema olfatório principal.....	14
1.3	Subpopulações de neurônios no epitélio olfatório principal.....	17
1.4	Transdução do sinal olfatório nos neurônios olfatórios canônicos.....	19
1.5	Fatores trocadores de nucleotídeos no sistema olfatório.....	22
1.6	Transdução do sinal nas subpopulações de neurônios olfatórios não canônicos.....	25
1.7	Funções das subpopulações de neurônios olfatórios não canônicos.....	26
1.8	Knockout condicional para <i>Ric8b</i> no epitélio olfatório.....	27
2	OBJETIVOS.....	30
2.1	Objetivo geral.....	30
2.2	Objetivos específicos.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	Camundongos transgênicos e genotipagem.....	31
3.2	Fracionamento de proteínas subcelulares a partir de tecido.....	39
3.4	Extração de RNA.....	42
3.5	Sequenciamento de transcriptoma e análise bioinformática.....	46
3.6	Hibridização in situ.....	47
3.7	Teste de comportamento alimentar.....	48
3.8	Teste de sensibilidade a gases.....	49
4	RESULTADOS.....	51
4.1	Localização subcelular da proteína RIC8B.....	51
4.2	Transcriptoma diferencial de animais RIC8B cKO.....	52
4.3	Experimentos funcionais.....	70
4.3.1	Comportamento alimentar.....	70
4.3.2	Sensibilidade a gases.....	72
5	DISCUSSÃO.....	76
5.1	Localização Subcelular da RIC8B.....	76
5.2	Genes diferencialmente expressos no <i>Ric8b</i> cKO.....	78
5.2.1	Genes OR diferencialmente expressos.....	78
5.2.2	Subpopulações de neurônios no MOE.....	84
5.3	Consequências comportamentais.....	86
5.3.1	Sensibilidade a CO ₂ e O ₂	86
5.3.2	Comportamento alimentar.....	93
6	CONCLUSÕES.....	95
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANATOMIA MACROSCÓPICA DO SISTEMA OLFATÓRIO

O sistema olfatório é responsável pela detecção e discriminação de odorantes presentes no ambiente (BUCK, 1996). Mamíferos são capazes de diferenciar entre milhares de odorantes, que podem estar ligados intimamente a memórias e emoções. Para a grande maioria dos animais, o olfato é o sentido principal, que está envolvido em comportamento alimentar, identificação de perigo e escolha de companheiros (AGMO; SNOEREN, 2017; GONZALEZ-TERRAZAS et al., 2016). A importância desse sistema sensorial é ilustrada pelo fato de que a família de genes que codificam receptores olfatórios (ORs, *odorant receptors*) é a maior família gênica encontrada até hoje (BUCK; AXEL, 1991; GODFREY et al., 2004; MALNIC; GODFREY; BUCK, 2004).

Apesar do sistema olfatório ser conhecido por reconhecer cheiros (odorantes) do ambiente, ele não se limita somente à identificação de odorantes, mas pode reconhecer também outros tipos de moléculas do meio ambiente. O sistema olfatório é composto por um conjunto de subsistemas que reconhecem estes diferentes tipos de moléculas (Figura 1):

- O sistema olfatório principal: composto pelo epitélio olfatório principal (MOE, *main olfactory epithelium*) e bulbo olfatório principal (MOB, *main olfactory bulb*).

- O sistema olfatório acessório: composto pelo órgão vomeronasal (VNO, *vomeronasal organ*) e pelo bulbo olfatório acessório (AOB, *accessory olfactory bulb*).
- O órgão septal de Masera (SO, *septal organ*), que envia projeções ao MOB.
- O gânglio de Grueneberg (GG, *Grueneberg ganglion*), que envia projeções ao MOB, numa região próxima do AOB.

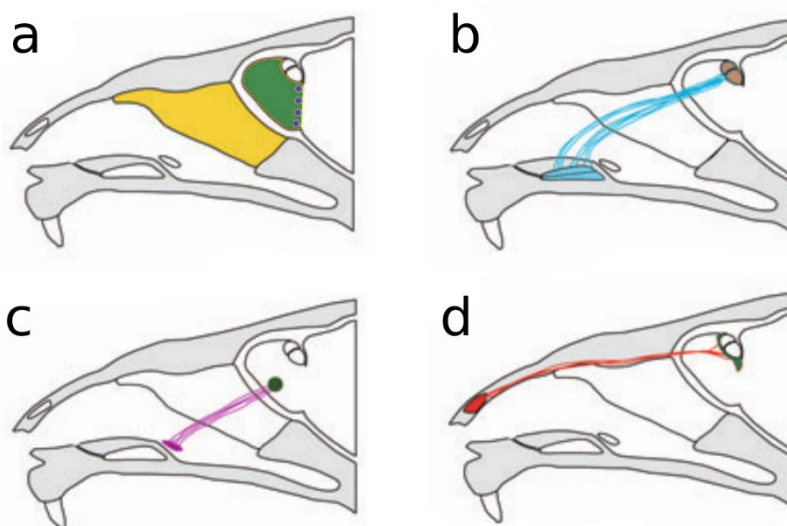


Figura 1. Subsistemas do sistema olfatório. a) Sistema olfatório principal com epitélio olfatório principal (MOE, amarelo), bulbo olfatório principal (OB, verde) e *necklace glomeruli* (azul). b) Sistema olfatório acessório com órgão vomeronasal (VNO, azul claro) e bulbo olfatório acessório (AOB, marrom). c) Órgão septal de Masera (SO, roxo), que envia projeções a uma região anteroventral do bulbo olfatório principal (verde). d) Gânglio de Grueneberg (GG, vermelho), que envia projeções a uma região postero-dorsal do bulbo olfatório principal (verde). (adaptada de MUNGER; LEINDERS-ZUFALL; ZUFALL, 2008).

Todos esses subsistemas possuem neurônios na sua porção mais periférica (no MOE, VNO, SO ou GG) que expressam determinados tipos de receptores de membrana e enviam projeções ao MOB ou ao AOB. Os receptores de membrana são os elementos moleculares iniciais na identificação das moléculas vindas do meio ambiente. Cada tipo de receptor se

liga a determinados tipos de moléculas, dando a especificidade de cada neurônio no reconhecimento dessas moléculas do meio ambiente:

- Neurônios do MOE identificam principalmente odorantes voláteis.
- Neurônios do VNO identificam principalmente feromônios (proteínas e outros compostos químicos secretados por animais que geram comportamentos sexuais e sociais entre coespecíficos, DULAC, 2000; ZUFALL; KELLIHER; LEINDERS-ZUFALL, 2002).
- Neurônios do SO se assemelham ao sistema olfatório principal quanto à transdução de sinal, aos odorantes aos quais responde e a enviar projeções ao MOB (MA et al., 2003). Esses neurônios identificam alguns odorantes voláteis e moléculas em fluidos que entram pela boca e chegam ao SO pelo duto nasopalatino (WEILER et al. 2003).
- Neurônios do GG se assemelham aos neurônios do MOE do tipo GC-D+ (que veremos mais adiante) e identificam principalmente peptídeos natriuréticos e feromônios que são sinais de alarme em mamíferos (CHAO et al., 2015).

1.2 ANATOMIA MICROSCÓPICA DO SISTEMA OLFATÓRIO PRINCIPAL

As células primariamente responsáveis pela detecção de moléculas do meio ambiente são os neurônios sensoriais olfatórios (OSNs, *olfactory sensory neurons*) maduros. Estes neurônios apresentam vida curta (com alguns artigos citando uma média de 28 dias e casos mais raros de neurônios que vivem até um ano) e são encontrados no MOE (BUCK, 1996), que é um epitélio pseudo-

estratificado colunar encontrado no recesso posterior dorsal da cavidade nasal, próximo à placa cribiforme, como mostrado na Figura 2A (BUCK, 1996; MALNIC; & MERCADANTE, 2009). Existem alguns tipos principais de células no MOE (Figura 2B): OSNs maduros e imaturos, células basais horizontais (HBCs, *horizontal basal cells*), células basais globosas (GBCs, *global basal cells*), células de sustentação (*supporting cells*, SCs), células microvilosas (MVCs, *microvillous cells*) e neurônios não canônicos (FEINSTEIN et al., 2004; MUNGER; LEINDERS-ZUFALL; ZUFALL, 2008), além de células da glândula de Bowman, macrófagos e microglia.

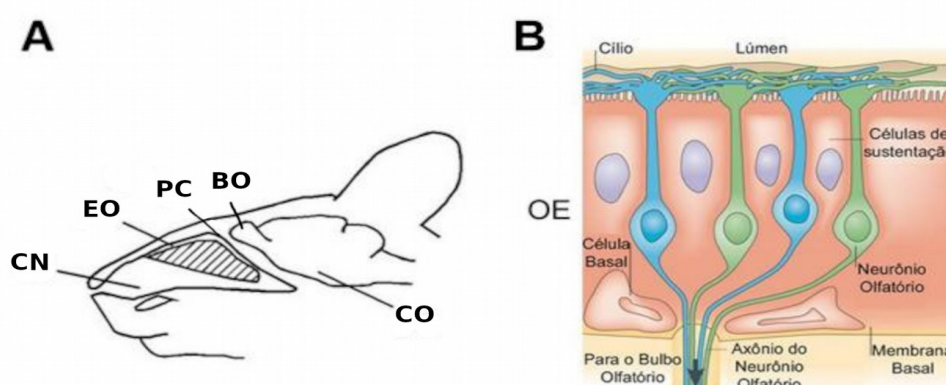


Figura 2. Anatomia do sistema olfatório principal. A) Esquema mostrando a organização anatômica do sistema olfatório principal em camundongos (CN: cavidade nasal; EO: epitélio olfatório; BO: bulbo olfatório; CO: córtex olfatório; PC: placa cribiforme). B) Representação esquemática do epitélio olfatório e as células que o compõe. (Adaptado de (Feinstein et al., 2004)).

Os OSNs são células nervosas bipolares: possuem um dendrito com a extremidade ciliada (cujos cílios se projetam para a luz da cavidade nasal e ficam imersos em muco e em contato com o ar que passa na cavidade nasal), e um axônio que atravessa a placa cribiforme e faz sinapses com neurônios do MOB (BUCK; AXEL, 1991; BUCK, 1996; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL,

2000). Os cílios dos OSNs oferecem uma ampla área para a detecção de moléculas e a ligação de uma molécula a um OR na superfície do cílio causa uma cascata de reações que culmina na despolarização do neurônio e no envio de um impulso nervoso ao MOB (BUCK, 1996; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000; PIFFERI; MENINI; KURAHASHI, 2009).

O MOB contém quatro tipos de neurônios: células mitrais, células granulares, células em tufo e células periglomerulares. Essas células são organizadas em camadas: glomérulos (região onde ocorre a sinapse entre os axônios dos OSNs e os axônios das células mitrais), camada plexiforme externa, camada de célula mitral e camada de célula granular (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000). Cada OSN projeta seu axônio exclusivamente a um único glomérulo (Figura 3), onde faz sinapses com interneurônios periglomerulares, neurônios mitrais ou neurônios em tufo. As células mitrais e em tufo projetam dendritos secundários que formam o trato olfatório lateral, realizando novas conexões sinápticas com outras regiões do sistema nervoso, em especial o córtex olfatório (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000).

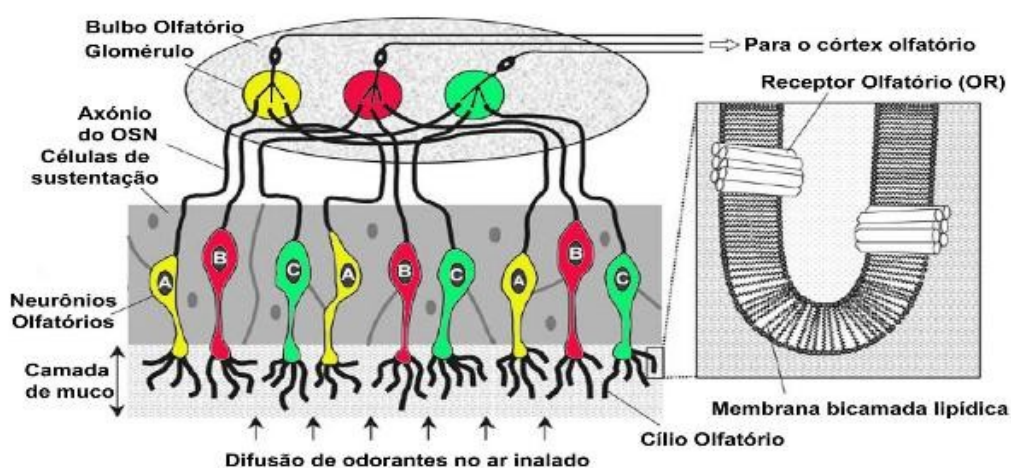


Figura 3. Organização do sistema olfatório. Odorantes chegam ao epitélio olfatório na cavidade nasal e difundem-se através da camada de muco e interagem com os ORs nos cílios dos OSNs. Três populações de OSNs (A, B, C) estão representados neste esquema, cada um expressando apenas um dos aproximadamente 1000 genes OR. Axônios de todos os OSNs que expressam o mesmo gene OR convergem para o mesmo glomérulo no MOB (ou para um de dois glomérulos em cada bulbo olfatório), onde fazem sinapse com os dendritos de neurônios que projetam seus axônios para o córtex olfatório. (Adaptado de (ZARZO, 2008)).

1.3 SUBPOPLAÇÕES DE NEURÔNIOS NO EPITÉLIO OLFATÓRIO PRINCIPAL

No epitélio olfatório principal, existem subpopulações de neurônios que expressam diferentes tipos de receptores (respondendo, portanto, a diferentes tipos de moléculas, incluindo odorantes, gases e peptídeos) e enviam projeções a diferentes regiões do MOB:

- OSNs canônicos: expressam ORs, que identificam odorantes voláteis, e projetam seus axônios a glomérulos no bulbo olfatório principal.
- Neurônios TAAR+: expressam os *trace amino-associated receptors*, que respondem a aminas voláteis, e enviam projeções axonais a glomérulos dorsais do bulbo olfatório principal (LIBERLES; BUCK, 2006; MUNGER; LEINDERS-ZUFALL; ZUFALL, 2008)).
- Neurônios GC-D+: expressam o receptor de membrana guanilato ciclase D (GC-D, *guanylate cyclase D*) e coexpressam diversos receptores de membrana da família Ms4a. Neurônios GC-D+ respondem a gás carbônico, sulfeto de carbono e peptídeos (uroguanilina, guanilina e outros peptídeos encontrados em urina) (ARAKAWA et al., 2013; COCKERHAM; MARGOLIS; MUNGER, 2009; HU et al., 2007; KENEMUTH et al., 2013; MUNGER et al., 2010; SUN et al., 2009) e os receptores Ms4a respondem a diversos odorantes (BEAR, 2017;

GREER et al., 2016). Esses neurônios enviam suas projeções axonais aos assim chamados *necklace glomeruli* (GREER et al., 2016).

- Neurônios TRPC+ (Munger et al., 2008), que tem os subtipos:
 - TRPC2: expressam *transient receptor potential channel* tipo C2. Esses neurônios são divididos em dois tipos (Omura & Mombaerts, 2014):
 - Tipo A: podem coexpressar ORs (como OLFR68 e OLFR69, OMURA; MOMBAERTS, 2014), não se sabe a quais ligantes respondem e ainda não é claro a quais regiões enviam suas projeções axonais.
 - Tipo B: coexpressam o receptor guanilato ciclase solúvel GUCY1B2, que responde a monóxido de carbono, monóxido de nitrogênio e baixas concentrações de oxigênio, e o canal ativado por nucleotídeos cíclicos CNGA2, que responde a H₂S (KOIKE et al., 2021). Esses neurônios enviam suas projeções axonais a aproximadamente três glomérulos na superfície póstero ventral do MOE, próximo aos *necklace glomeruli*. (BLEYMEHL et al., 2016; OMURA et al., 2016; OMURA; MOMBAERTS, 2014, 2015).
 - TRPC6: expressam *transient receptor potential channel* tipo C6, que responde a lial e odorantes voláteis, e inervam o bulbo olfatório principal (MUNGER; LEINDERS-ZUFALL; ZUFALL, 2008).
- Neurônios olfatórios V1R+: expressam os receptores vomeronasais do tipo 1, que respondem a feromônios no VNO (mas não se sabe se tem a mesma função no sistema olfatório principal), e não se sabe para onde

enviam suas projeções (MUNGER; LEINDERS-ZUFALL; ZUFALL, 2008).

- Neurônios olfatórios CD36+: expressam o receptor CD36 e podem coexpressar ORs, imagina-se que respondam a lipídios e não se sabe para onde enviam suas projeções (XAVIER et al., 2016).

1.4 TRANSDUÇÃO DO SINAL OLFATÓRIO NOS NEURÔNIOS OLFATÓRIOS CANÔNICOS

As subpopulações de neurônios do epitélio olfatório principal descritas acima utilizam diferentes componentes de transdução de sinal. A cascata de transdução de sinal dos neurônios canônicos é bem conhecida, mas as cascatas das outras subpopulações ainda não são bem descritas.

Os neurônios olfatórios canônicos contêm receptores especializados na detecção de odorantes específicos, os ORs. Cada receptor deve ser capaz de se ligar a mais de uma molécula odorante e cada odorante deve ser capaz de se ligar a diversos receptores (MALNIC et al., 1999). Cada cheiro é composto por uma determinada mistura de moléculas odorantes e cada mistura de moléculas odorantes ativa um determinado conjunto de ORs, dependendo, inclusive, da interação que ocorre entre os diversos odorantes e diferentes receptores (KURIAN et al., 2021; MALNIC et al., 1999). O conjunto de receptores ativado por uma mistura de odorantes pode ser menor que a soma dos receptores ativados pelos odorantes individualmente (pode ocorrer inibição de ligações receptor-odorante em misturas).

Os ORs pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G (*G protein-coupled receptors*, GPCRs) (BUCK; AXEL, 1991; BUCK, 1996). Esses receptores apresentam sete domínios transmembrana em alfa-hélice, um domínio amino-terminal extracelular curto e um domínio carboxi-terminal intracelular curto (BUCK; AXEL, 1991; BUCK, 1996; MALNIC; MERCADANTE, 2009). Diferenças na estrutura e na sequência desses receptores possivelmente contribuem para diferenças no reconhecimento de um ligante (HAUACHE, 2001). Apesar de apresentarem motivos semelhantes, os receptores variam enormemente quanto à sua sequência de aminoácidos, especialmente nos seus domínios transmembrana, que devem estar intimamente relacionados à sua capacidade de ligar a um grande número de odorantes (BUCK, 1996). Apesar da sua grande diversidade, os ORs podem ser divididos em dois grandes grupos (classe I, inicialmente detectados em peixes, que tendem a identificar odorantes hidrossolúveis NGAL et al., 1993, e classe II, que ocorrem apenas em animais terrestres e que tendem a identificar odorantes lipossolúveis, NIIMURA; MATSUI; TOUHARA, 2014) e subdivididos em subfamílias de acordo com a similaridade das estruturas primárias dos ORs (BUCK, 1996).

A proteína G dos neurônios olfatórios (GOLF, *olfactory G protein*) é heterotrimérica e formada por três polipeptídeos distintos: α , β e γ . A subunidade $G\alpha$ da GOLF é denominada de $G\alpha$ OLF, e é muito semelhante à $G\alpha$ S, que ativa a adenilil ciclase, e catalisa a formação de adenosina monofostato cíclico (AMPC) a partir de adenosina trifosfato (ATP).

Existem diversas subunidades possíveis de β e γ em uma proteína G (MILLIGAN; KOSTENIS, 2006). Na GOLF, acredita-se que são a $G\beta 1$ e a $G\gamma 13$ que fazem parte do complexo heterotrimérico (KERR et al., 2008; LI et al., 2013).

Os ORs e a proteína GOLF são os elementos centrais da transdução do sinal em OSNs canônicos. A cascata de transdução de sinal desses neurônios se inicia com a ligação de um odorante a um OR. Os odorantes são moléculas voláteis, no geral bastante pequenas (com menos de 400 Da), em sua grande maioria lipofílicas e com estruturas químicas bastante variadas (com tamanho, formato, grupos funcionais e cargas variadas) (MALNIC; MERCADANTE, 2009). Quando essas moléculas entram na cavidade nasal, ficam presas no muco do MOE e, ao atravessarem o muco, são detectadas pelos ORs encontrados nos cílios dos dendritos dos OSNs canônicos, sendo que cada OR é expresso numa certa área dentre cinco do MOE, áreas essas que são chamadas de zonas e numeradas de 1 a 5 (RESSLER; SULLIVAN; BUCK, 1993; SEGURA et al., 2021; VASSAR; NGAI; AXEL, 1993). O muco oferece um meio com as características necessárias para permitir a despolarização do neurônio, características como certo ambiente iônico (SMITH; BHATNAGAR, 2019). Dentro desse ambiente otimizado, os odorantes ativam os ORs, gerando um impulso nervoso através do OSN. Esse impulso chega ao MOB, que encaminha o sinal a outras regiões do cérebro, resultando na percepção consciente do odorante, no desencadeamento de memórias e em respostas comportamentais e emocionais (MALNIC; MERCADANTE, 2009).

Apesar de haver uma grande diversidade de odorantes e receptores olfatórios, a transdução do sinal olfatório ocorre por uma via comum. Ela se inicia com a ligação entre o odorante e o seu OR específico. O OR age como um fator trocador de guanina (GEF, *guanine nucleotide exchange factor*). O GEF catalisa a saída do GDP da proteína G abrindo espaço para a ligação ao GTP, configurando o estado ativo dessa proteína. Com isso, a subunidade α se dissocia do dímero $\beta\gamma$, iniciando a cascata de sinalização intracelular.

Uma vez ligado ao odorante, o OR interage com a GOLF. A subunidade α dessa proteína ($G\alpha$ OLF) se acopla a GTP e, uma vez acoplada a GTP, estimula a adenilil ciclase tipo III (ACIII, *adenylyl cyclase 3*). A ACIII, por sua vez, transforma ATP em AMPc. O aumento de AMPc no citoplasma celular faz com que o AMPc se ligue ao domínio citoplasmático de canais catiônicos regulados por nucleotídeos cíclicos (CNGc, *cyclic nucleotide-gated channels*) (BUCK; AXEL, 1991). Esses canais se abrem, permitindo um influxo de íons Na^+ e Ca^{+2} e um efluxo de íons Cl^- e K^+ pela membrana (ANTUNES; SIMOES DE SOUZA, 2016). Isso gera uma mudança no potencial da membrana do cílio, o que desencadeia o potencial de ação (BUCK; AXEL, 1991; BUCK, 1996; KANDEL, 2000). Todas essas moléculas são essenciais ao funcionamento do sistema e fazem parte da estrutura molecular básica para detecção de todos os odorantes. Isso é confirmado pelo fato de que camundongos *knock-out* para $G\alpha$ OLF, ACIII ou CNGc são anósmicos, ou seja, incapazes de detectar odorantes (BELLUSCIO et al., 1998; BRUNET; GOLD; NGAI, 1997; WONG et al., 2000).

1.5 FATORES TROCADORES DE NUCLEOTÍDEOS NO SISTEMA OLFATÓRIO

Um ponto importante para a regulação da sinalização via proteína G é a conversão de $G\alpha$ -GDP (estado inativo) a $G\alpha$ -GTP (estado ativo). Essa conversão pode ser regulada negativamente por proteínas ativadoras de GTPase (GAPs, *GTPase activating proteins*) ou positivamente por fatores trocadores de nucleotídeos de guanina (GEFs, *guanine nucleotide exchange factors*). GEFs catalisam a dissociação de GDP da proteína G através da modificação do sítio de ligação com GDP de tal forma que essa afinidade é diminuída e, assim, o GDP é liberado e posteriormente substituído por GTP. Em geral, a afinidade da proteína G para GTP e GDP é semelhante, e o GEF não favorece a religação do GDP ou GTP. Assim, a troca de GDP por GTP ocorre devido à concentração aproximadamente 10 vezes maior do GTP celular em comparação com a concentração de GDP (BOS; REHMANN; WITTINGHOFER, 2007).

A regulação da atividade de proteínas GEFs ocorre de maneira altamente complexa. Esta regulação pode envolver a translocação da proteína GEF para o compartimento específico onde sua proteína G alvo está localizada, a liberação de seu sítio de interação com a proteína G ou a indução de alterações alostéricas no seu sítio catalítico (BOS; REHMANN; WITTINGHOFER, 2007).

Para encontrar possíveis reguladores da sinalização olfatória, nosso laboratório realizou um ensaio de duplo-híbrido usando $G\alpha$ olf como isca para

varrer uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório e identificou, pela primeira vez, a interação de G α olf com a proteína RIC8B (VON DANNECKER, 2005).

A proteína de resistência aos inibidores de colinesterase (RIC8, *resistance to inhibitors of cholinesterase 8*) (GABAY et al., 2011) é altamente conservada em vertebrados e está associada à atividade de proteínas G em neurônios (MILLER et al., 2000). As proteínas homólogas de mamíferos RIC8 (chamadas RIC8A e RIC8B) interagem com G α O e G α S, respectivamente (KLATTENHOFF et al., 2003; TALL; GILMAN, 2005; TALL; KRUMINS; GILMAN, 2003). A *Ric8B* apresenta duas isoformas conhecidas no epitélio olfatório: *Ric8b full-length* (*Ric8bFL*) e *Ric8b Δ 9* (isoforma que não contém o exon nove e cujas funções ainda são desconhecidas) (VON DANNECKER, 2005).

Através de hibridização *in situ*, a expressão de RIC8B foi detectada apenas em OSNs maduros do epitélio olfatório e em algumas regiões do cérebro (estriado, *nucleus accumbens*, tubérculo olfatório), mostrando uma colocalização bastante específica com G α olf (VON DANNECKER, 2005). De maneira condizente, a coexpressão de *Ric8b* potencializa a produção de cAMP via G α OLF em células HEK293T (VON DANNECKER, 2005) e promove a expressão funcional de ORs em sistema heterólogo (VON DANNECKER; MERCADANTE; MALNIC, 2006), sugerindo que esta proteína atua como uma GEF de G α OLF para amplificar a sinalização olfatória (Figura 4).

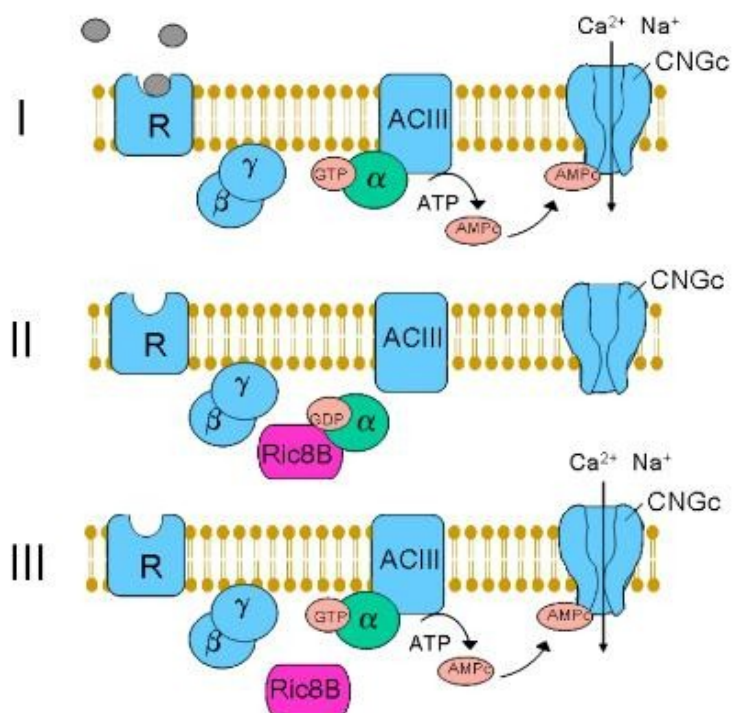


Figura 4. Mecanismo hipotético de ação da proteína RIC8B na via de transdução de sinal de odorantes. (I) Após a ativação do receptor olfatório (OR) por um odorante, a subunidade α da proteína GOLF é ativada (GTP ligada) e ativa por sua vez a adenilil ciclase III (ACIII) que produz cAMP. O cAMP ativa o canal dependente de nucleotídeos cíclicos (CNGc) o que resulta na entrada de sódio e cálcio. (II e III) A subunidade α hidrolisa o GTP, torna-se inativa (GDP ligada) e deveria voltar a se associar com as subunidades $\beta\gamma$ formando a proteína G heterotrimérica inativa, mas, ao invés disto, *Ric8b* interage com a subunidade α que se encontra na forma monomérica e age como uma GEF estimulando a troca de GDP por GTP. A subunidade α volta a ser ativa e inicia mais um ciclo de ativação da ACIII.

Apesar dos dados obtidos até então a respeito de RIC8B indicarem que esta proteína participa da via de transdução de sinais de odorantes possivelmente como uma GEF, ainda não foi observada esta função *in vivo*. Adicionalmente, GEFs para proteínas G heterotriméricas ainda são pouco compreendidas e pouco caracterizadas em geral. A compreensão do papel desempenhado por RIC8B no olfato contribuirá para o conhecimento dos mecanismos de ação deste tipo de GEF.

Também foi observado que a proteína RIC8B promove a expressão funcional de ORs em sistema heterólogo (VON DANNECKER; MERCADANTE; MALNIC, 2006). É possível que essa capacidade se deva ao seu papel de GEF e chaperona sobre a $G\alpha_{olf}$ (GABAY et al., 2011; MACHADO et al., 2017).

1.6 TRANSDUÇÃO DO SINAL NAS SUBPOPULAÇÕES DE NEURÔNIOS OLFATÓRIOS NÃO CANÔNICOS

Como explicado acima, a cascata de transdução de sinal dos neurônios olfatórios canônicos é bem conhecida. No entanto, as cascatas de transdução de sinal das outras subpopulações de neurônios (TAAR+, GC-D+, TRPC+, V1R+ e CD36+) não são bem descritas (MUNGER; LEINDERS-ZUFALL; ZUFALL, 2008; SARAIVA et al., 2015). Sabe-se que os neurônios TAAR+ são dependentes da proteína GOLF, mas não são conhecidos outros elementos da cascata de transdução de sinal desses neurônios. Neurônios GC-D+ tem uma cascata que independe da proteína GOLF e inclui PDE2, CNGA3, CAII e canais de cloro, além de ter os correceptores MS4A (BEAR, 2017; KENEMUTH et al., 2013a). Essa subpopulação de neurônios utiliza cGMP como segundo mensageiro, em vez de cAMP, que é o utilizado pelas outras populações. A cascata dos neurônios TRPC6+ inclui os elementos IP3R3 e PLC β 2. Os neurônios TRPC2+ tipo A usam uma cascata de sinalização que inclui AC3, CNGA2 e $G\alpha_{OLF}$, e podem coexpressar ORs como o OLFR68 e o OLFR69. Já os neurônios Trpc2+ tipo B tem Gucy1b2 e CNGA2 e não dependem de $G\alpha_{OLF}$. A cascata dos neurônios V1R+ não é conhecida e sabe-se que a cascata dos neurônios CD36+ inclui ORs e $G\alpha_{OLF}$.

1.7 FUNÇÕES DAS SUBPOPULAÇÕES DE NEURÔNIOS OLFATÓRIOS NÃO CANÔNICOS

É importante notar que as funções da maioria dos neurônios olfatórios não canônicos ainda não são plenamente compreendidas. Os neurônios TAAR+ parecem estar envolvidos na identificação de odorantes aversivos de predadores (TAAR4), odorantes atrativos do camundongo macho (TAAR5) e evocação de comportamentos relacionados a esses cheiros (KIDA et al., 2018). Os neurônios V1R+ e CD36+ não tem função conhecida no sistema olfatório principal.

Os neurônios GC-D+ expressam a guanilato ciclase de membrana GC-D, que responde a certos “peptídeos sociais” (peptídeos encontrados na urina de coespecíficos que tem importância em comportamentos sociais) e gases. Esses neurônios estão envolvidos no processo de aquisição de preferências alimentares socialmente aprendidas (COCKERHAM et al., 2010; KELLIHER; MUNGER, 2015)). Como respondem a diferentes tipos de moléculas (peptídeos e gases, podem ser um ponto de convergência entre sistemas de sinalização aparentemente diferentes, ZUFALL, 2009). Além disso, esses neurônios enviam projeções aos *necklace glomeruli*, que recebem inervações de outros tipos de neurônios, devendo integrar esses diferentes sinais sensoriais. O fato de neurônios GC-D+ responderem a gás carbônico indica uma possível função do sistema olfatório de identificação da qualidade do ar inalado (HU et al., 2007; SCOTT, 2011). Ao mesmo tempo, sabe-se que a população de neurônios GC-D+ não é a única a responder a gás carbônico,

porque animais *knockout* para GC-D foram capazes de responder a concentrações altas de gás carbônico, o que foi medido por eletro-olfatograma (EOG, *electro-olfactogram*) (KENEMUTH et al., 2013).

Neurônios TRPC2+ tipo B também expressam guanilato ciclase, mas uma forma da proteína solúvel. Esses neurônios identificam CO, NO, H₂S e baixas concentrações de O₂ (KOIKE et al. 2021; OMURA; MOMBAERTS, 2014), mas não se sabe ainda se eles respondam também a CO₂. Os neurônios TRPC2+ influenciam comportamentos de esquiva a ambientes específicos, stress e *self-grooming* (KOIKE et al., 2021; OMURA; MOMBAERTS, 2014). Já os neurônios TRPC6+ não tem função conhecida no sistema olfatório principal.

1.8 KNOCKOUT CONDICIONAL PARA RIC8B NO EPITÉLIO OLFATÓRIO

Em trabalhos anteriores nós geramos camundongos para se fazer o *knockout* de *Ric8b* apenas no epitélio olfatório (MACHADO et al., 2017). Esses animais serão chamados de *Ric8b* cKO (*conditional knockout*) nesse trabalho. Os camundongos apresentam, no alelo condicional, o exon 4 do gene *Ric8b* flanqueado por sítios floxP reconhecidos pela recombinase CRE. Quando cruzados com outra linhagem que apresenta o transgene *Omp*-CRE, (onde *Omp* é o promotor do gene *Omp*, ou *olfactory marker protein*, que é expresso especificamente em neurônios olfatórios maduros), o gene *Ric8b* sofre *knockout* somente no epitélio olfatório.

Os resultados de trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (MACHADO et al., 2017) mostram que os animais *Ric8b* cKO não apresentam expressão de *Ric8b* no MOE e apresentam maior morte de neurônios olfatórios maduros quando comparado com os seus irmãos tipo selvagem (WT, *wild-type*). Também foi observado que não há expressão da proteína G α OLF no MOE destes animais, apesar de o RNAm correspondente estar normalmente presente. É importante notar que o knock-out de *Ric8b* ocorre em todas as células OMP+ do organismo, mas o efeito dessa perda é sentido somente no epitélio olfatório.

Estes resultados indicaram a possibilidade de que os neurônios maduros nesses camundongos morressem em um tempo mais curto devido ao fato de não possuírem G α OLF e, portanto, não serem estimulados por odorantes (WATT et al., 2004). Ensaio de morte celular mostraram que há um maior número de células no processo de morte celular em MOE de animais *Ric8b* cKO.

Como os neurônios olfatórios são as primeiras células envolvidas na olfação, com os resultados citados acima ficou claro que os animais *Ric8b* cKO deveriam ser anósmicos, ou seja, incapazes de sentir cheiros. Diversos ensaios comportamentais foram realizados a fim de confirmar a anosmia desses animais. Esses ensaios mostraram que os animais *Ric8b* cKO demoram mais para encontrar um *pellet* de comida devido a deficiências olfatórias e não devido a características comportamentais ou a deficiência motora. Os camundongos *Ric8b* cKO também não demonstraram sentir

aversão a um odorante (ácido butírico) que normalmente é evitado por camundongos que apresentam o olfato intacto.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o impacto da deleção do gene para *Ric8b* na expressão gênica, estrutura e função do epitélio olfatório.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir o objetivo geral, utilizamos camundongos *Ric8b* cKO e seus irmãos WT, nos seguintes passos:

- Determinar os transcriptomas de MOE de camundongos ~P60 *Ric8b* cKO e WT, de ambos os sexos;
- Determinar os transcritos que estão diferencialmente expressos nestes casos e dividir os transcritos diferencialmente expressos em transcritos aumentados e transcritos diminuídos no MOE de *Ric8b* cKO, em comparação ao WT;
- Analisar a expressão de genes ORs e marcadores dos diversos tipos celulares presentes no MOE a fim de verificar se existem subpopulações de células que estão aumentadas ou diminuídas no *Ric8b* cKO em comparação com o WT;
- Analisar como as alterações observadas no epitélio olfatório principal afetam o comportamento alimentar e a fisiologia respiratória relacionada à identificação da qualidade do ar inalado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS E GENOTIPAGEM

A linhagem de camundongos *knockout* tecido específico para *Ric8b* foi criada pelo Consórcio Internacional de Camundongos *knockout* (<http://www.knockoutmouse.org/> e <https://www.mousephenotype.org/about-imp/about-ikmc/eucomm/>) (Figura 5). Estes camundongos foram primeiramente cruzados com camundongos que expressam a FLP recombinase para a remoção do vetor gene trap localizado entre os sítios para recombinação da FLP recombinase (FRTs). Em seguida, os camundongos foram cruzados com camundongos *Omp-CRE*, o que resultou na deleção do éxon 4 do gene *Ric8b* (com mudança de fase de leitura do RNAm e produção de *Ric8b* truncada e não funcional) só no epitélio olfatório.

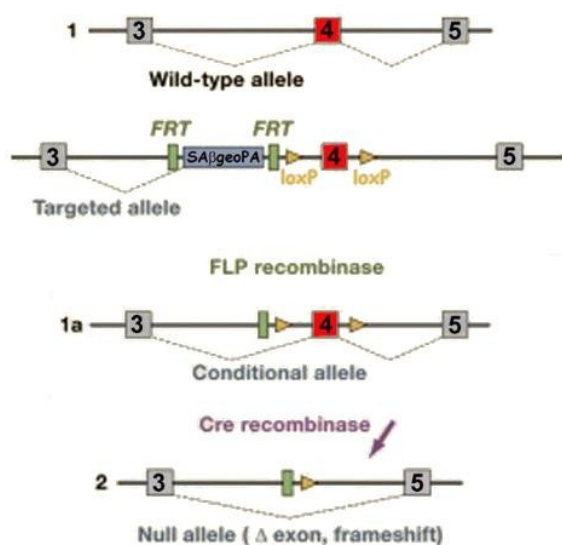


Figura 5. Método EUCOMM, utilizado pelo *International Mouse Phenotyping Consortium* (IMPC) para fazer o *knockout* condicional. O esquema geral mostra um gene antes (*wild type gene*) e após (*targeted allele*) a recombinação homóloga. SA = *Splice acceptor site*; βgeo = gene

repórter β -galactosidase fundida a gene de resistência a neomicina; PA = sinal de poliadenilação. FRT = sítios reconhecidos pela FLP recombinase; floxP = sítios reconhecidos pela CRE recombinase. A Jackson Services realizou o passo 1a (cruzou os camundongos da EUCOMM que apresentam o gene trap no gene *Ric8b* com um camundongo transgênico que expressa a FLP recombinase sob o controle de um promotor constitutivo, promotor de actina humano) e produziu desta maneira camundongos que tem o alelo condicional.

O cruzamento entre os camundongos homozigotos para o alelo condicional *Ric8b* (*Ric8b* floxP/*Ric8b* floxP) e os camundongos transgênicos *Omp*-CRE (The Jackson Laboratory, #006668) foi realizado no biotério do Conjunto das Químicas na USP, para obter o camundongo *knockout* tecido específico (Figura 6).

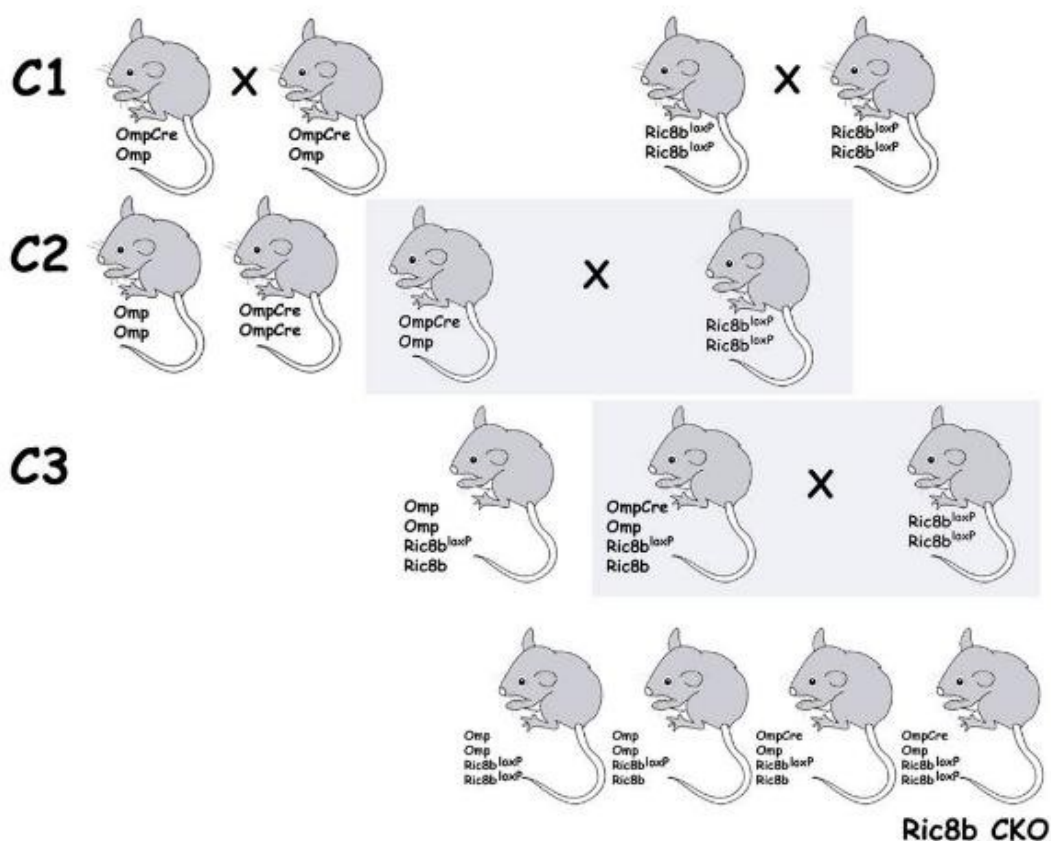


Figura 6. Obtenção de camundongos *knockout* tecido específico para *Ric8b*. Nos alelos condicionais, o exon 4 do gene *Ric8b* está flanqueado por sítios floxP. Cruzamos camundongos transgênicos *Omp*-CRE com os camundongos homozigotos *Ric8b* condicional para obter camundongos que apresentam a deleção de *Ric8b* apenas nos neurônios olfatórios maduros (cKO).

Casais do “tipo C1” (Figura 6) foram mantidos para a produção das linhagens *Omp*-CRE e *Ric8b*-floxF. Animais heterozigotos para *OMP*-CRE foram acasalados com animais homozigotos para *Ric8b*-floxF (acasalamento “tipo C2”). É necessário o uso sempre de animais heterozigotos para *Omp*-CRE devido ao fato do homozigoto ser subfétil. Acasalamento do tipo C2 deu origem a animais que são mutantes heterozigotos nos dois genes. Esses animais foram, então, acasalados com camundongos homozigotos para *Ric8b*-floxF (acasalamento “tipo C3”), que pode dar origem ao animal deletado para *Ric8b* apenas no epitélio olfatório.

A genotipagem foi realizada após cruzamento dos animais das linhagens *Omp*^{CRE} e *Ric8b*^{flox}. Cruzamentos e manipulações foram realizados com o auxílio do Biotério do Conjunto das Químicas. Os procedimentos adotados estão de acordo com as regras básicas de manuseio de animais sob o protocolo 50/2017 e #191/2021, registrado na Comissão de Ética e Cuidados em Uso Animal do IQUSP. Para a genotipagem dos animais transgênicos, um pequeno pedaço de orelha (~2 mm²) de cada camundongo foi coletado em um tubo Eppendorf. Os furos nas orelhas servem como identificação e os animais receberam um código que foi anotado na pasta de controle da linhagem. As amostras foram fervidas a 95°C em 200 µL de 50 mM NaOH por 12 min sob agitação. Ao final, as amostras tiveram seu pH neutralizado adicionando-se 16,5µL de 1M Tris pH8.0 e agitando-se a amostra com auxílio de um vórtex. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20817xg por 5 minutos. Então foi preparada uma mistura para a reação de PCR com: 2µL 10x PCR buffer, 0,8µL 50mM MgCl₂, 0,5µL 10mM dNTP, 0,2µL Taq polimerase 5U/µL, 0,2µL

(*Omp*) ou 0,5 μ L (*Ric8b*) de cada primer (a partir da concentração 10 μ M), 1 μ L DMSO, 12,7 μ L (*Omp*) ou 11,5 (*Ric8b*) H₂O e 3 μ L do DNA da amostra. A reação de PCR foi efetuada na termocicladora MultiGene OptiMax (LabNet) com ciclagem 3' 94°C, 30" 94°C, 1' 61°C, 1' 72°C (repete 40 ciclos), 2' 72°C e ∞ 10°C.

A sequência dos primers utilizados para a genotipagem do alelo *Omp* associado à Cre recombinase estão disponíveis no site do Jackson Laboratories (<http://jaxmice.jax.org/strain/006668>) e amplificam duas bandas. A banda mais alta, de 542bp, corresponde ao alelo tipo selvagem, já a banda mais baixa, de 450bp, corresponde ao alelo mutado (*Omp* associado à Cre recombinase). Quando o camundongo apresenta a amplificação dessas duas bandas, ele é um animal heterozigoto.

A sequência dos primers para a genotipagem do gene *Ric8b* associado à sequência floxP foram sintetizados com base na sequência de *Ric8b* murino depositada no GenBank (Gene ID: 237422). Suas sequências são: *Ric8b* mut R 5'– GAG CCA CAC TCC TCA ACT CTA TCT -3'; e *Ric8b* cKoF 5' – TGA AAT GGT AGG CAT CCA TGG TG -3'. Estes primers flanqueiam as sequências de floxP que estão antes e depois do éxon 4 apresentando a amplificação de uma banda de 1400pb, quando a sequência floxP está presente, ou a amplificação de uma banda de por volta de 1200pb, quando a sequência floxP está ausente (Figura 7).

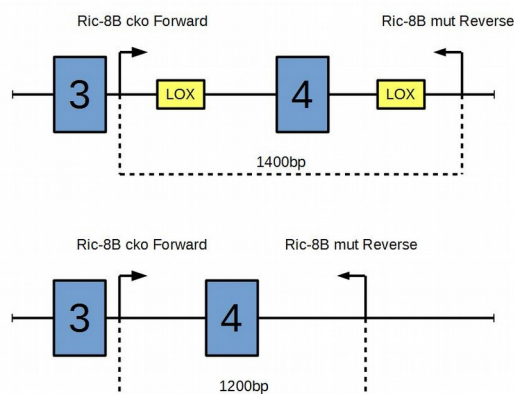


Figura 7. Genotipagem do camundongo *Ric8b* floxP. Os primers flanqueiam as sequências de floxP que estão antes e depois do éxon 4. Quando o camundongo apresenta a amplificação de uma banda de 1400pb, esta está associada ao alelo mutante. Por outro lado, quando o animal apresenta a amplificação de uma banda de 1200pb, está associado ao alelo tipo selvagem. Quando o camundongo apresenta as duas bandas amplificadas, este animal é heterozigoto.

O resultado da reação de PCR foi analisado com eletroforese em gel de agarose de 1.5% (Figuras 8 e 9). Após polimerização, as amostras foram aplicadas nos poços do gel com 5 μ L de tampão azul em cada amostra e 3 μ L de padrão de peso molecular foi aplicado em um poço separado do gel. O gel foi corrido a 100V por em torno de 1h. O resultado foi documentado em foto documentador de UV MiniBis Pro (Bio-Imaging Systems).

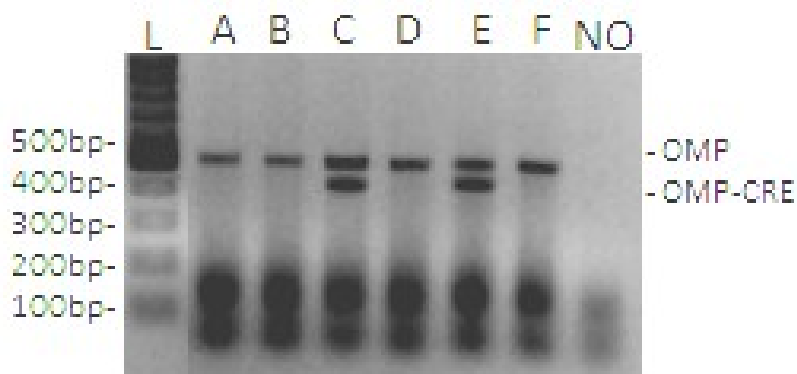


Figura 8. Exemplo de eletroforese em gel de agarose 1,5% para genotipagem de OMP/OMP^{CRE} em animais resultantes dos cruzamentos tipo C3. L = ladder de 100bp. A a F = amostras. NO = controle negativo (somente a mistura de reagentes de PCR sem DNA). As amostras A, B, D e F

são homozigotas para o gene *Omp* tipo selvagem (sem a Cre-recombinase). As amostras C e E são heterozigotas para o gene *Omp* tipo selvagem e *Omp^{cre}* e, portanto, tem o potencial de ter o gene *Ric8b* nocauteado.

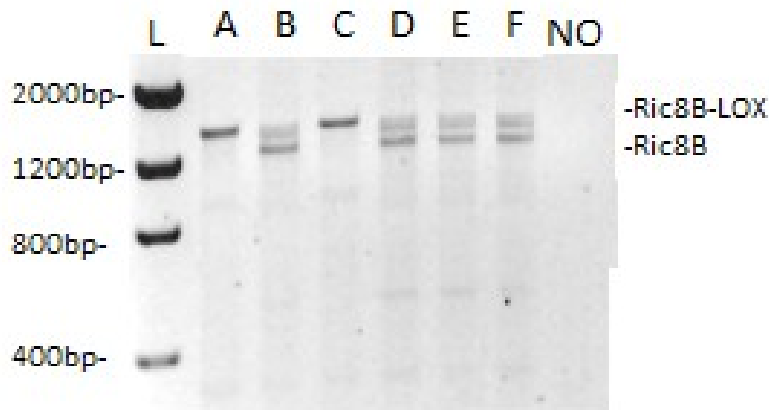


Figura 9. Exemplo de eletroforese em gel de agarose 1,5% para genotipagem de *Ric8b/Ric8b^{lox}* em animais resultantes dos cruzamentos tipo C3. L = low mass ladder. A a F = amostras (as mesmas da Figura 8). NO = controle negativo (somente a mistura de reagentes de PCR sem DNA). As amostras A e C são homozigotas para o gene *Ric8b^{lox}* e tem potencial para ser cKO. As amostras B, D, E e F são heterozigotas para o gene *Ric8b^{lox}* e *Ric8b* tipo selvagem, tendo, portanto, potencial para ser heterozigoto para o *Ric8b*. Juntamente com os resultados da Figura 8, a conclusão do genótipo desses animais quanto ao *knockout* de *Ric8b* é: C=cKO, E=HET e os demais WT.

A combinação desses genótipos define o fenótipo do animal como mostra a Tabela 1 (abaixo).

Combinações de genótipo	<i>Omp/Omp^{CRE}</i>	<i>Ric8b/Ric8b^{lox}</i>	Fenótipo resultante
Combinação 1	<i>Omp/Omp</i>	<i>Ric8b/Ric8b^{lox}</i>	WT
Combinação 2	<i>Omp/Omp</i>	<i>Ric8b^{lox}/Ric8b^{lox}</i>	WT
Combinação 3	<i>Omp/Omp^{CRE}</i>	<i>Ric8b/Ric8b^{lox}</i>	HET
Combinação 4	<i>Omp/Omp^{CRE}</i>	<i>Ric8b^{lox}/Ric8b^{lox}</i>	cKO

Tabela 1: Genótipos e fenótipos da linhagem de camundongos *Ric8b^{lox}/OMP^{cre}*.

As informações de genótipo e idade dos animais utilizados em cada experimento podem ser observadas na Tabela 2 (abaixo).

Código do animal	Genótipo	Data de nascimento	Sexo	Idade	Experimento no qual foi inserido
C3L.6	WT	05/10/16	F	P148	Extração de proteína total de epitélio olfatório
C3M.2 (C2)	WT	08/10/16	F	P59	Extração de RNA e sequenciamento de transcriptoma
C3M.2 (C6)	WT	12/09/16	F	P55	Extração de RNA e sequenciamento de transcriptoma
C3M.4 (C5)	WT	12/09/16	F	P55	Extração de RNA e sequenciamento de transcriptoma
C3M.6 (C1)	cKO	08/10/16	F	P59	Extração de RNA e sequenciamento de transcriptoma
C3M.3 (C4)	cKO	12/09/16	M	P55	Extração de RNA e sequenciamento de transcriptoma
C3M.7 (C3)	cKO	12/09/16	M	P55	Extração de RNA e sequenciamento de transcriptoma
C1 Ric 1	WT	20/09/17	M	P77	Fracionamento de proteínas subcelulares e Western blot
C1 Ric 2	WT	20/09/17	F	P77	Fracionamento de proteínas subcelulares e Western blot
C1 Ric 3	WT	20/09/17	M	P77	Fracionamento de proteínas subcelulares e Western blot
C1 Ric 4	WT	20/09/17	F	P77	Fracionamento de proteínas subcelulares e Western blot
C1 Ric 5	WT	20/09/17	M	P77	Fracionamento de proteínas subcelulares e Western blot
C1 Ric 6	WT	20/09/17	F	P77	Fracionamento de proteínas subcelulares e Western blot
C3P.8	WT	08/09/17	F	P89	Fracionamento de proteínas subcelulares e

					Western blot
C3P.3	WT	28/09/17	M	P69	Fracionamento de proteínas subcelulares e Western blot
C3P.2	WT	28/09/17	F	P69	Fracionamento de proteínas subcelulares e Western blot
C3P.6	WT	28/09/17	F	P69	Fracionamento de proteínas subcelulares e Western blot
C3P.10	WT	28/09/17	F	P69	Fracionamento de proteínas subcelulares e Western blot
C3N.1	WT	28/09/17	M	P69	Fracionamento de proteínas subcelulares e Western blot
C3Q.9	WT	07/05/18	M	P60	Comportamento alimentar
C3S.2	WT	28/09/18	F	P56	Comportamento alimentar
C3Q.3	WT	10/09/18	M	P66	Comportamento alimentar
C3Q.3	cKO	07/05/18	M	P60	Comportamento alimentar
C3S.4	cKO	28/09/18	F	P56	Comportamento alimentar
C3Q.1	cKO	10/09/18	M	Pp66	Comportamento alimentar
C3W.1	WT	08/03/19	M	P59	Comportamento alimentar
C3W.7	WT	08/03/19	M	P59	Comportamento alimentar
C3W.5	cKO	08/03/19	M	P59	Comportamento alimentar
C3W.3	cKO	08/03/19	M	P59	Comportamento alimentar
C4A.7	WT	08/08/19	M	P116	Sensibilidade a gases
C4A.9	WT	08/08/19	M	P116	Sensibilidade a gases
C3S.1	cKO	23/12/18	M	P344	Sensibilidade a gases
C3S.6	cKO	02/02/19	F	P303	Sensibilidade a gases

C3Q.2	cKO	10/09/18	F	P136	Sensibilidade a gases
C3Q.6	WT	10/09/18	F	P136	Sensibilidade a gases
C3Q.6	cKO	07/07/18	F	P123	Sensibilidade a gases
C3T.1	WT	10/07/18	M	P120	Sensibilidade a gases
C3S.7	cKO	03/07/18	M	P127	Sensibilidade a gases

Tabela 2: Animais genotipados e utilizados nos experimentos, com seu código, genótipo, data de nascimento, sexo (F=feminino, M=masculino) e idade. Os animais usados para sequenciamento têm o código das amostras (código usado no sequenciamento) entre parênteses.

3.2 FRACIONAMENTO DE PROTEÍNAS SUBCELULARES A PARTIR DE TECIDO

O fracionamento de proteínas subcelulares foi realizado utilizando o *Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues*, Thermo Scientific (cat#87790). Os tampões do kit foram deixados no gelo durante todo o procedimento. Foram dissecados os epitélios olfatórios de 13 animais e feito um *pool* com todos em uma amostra única (o kit permite 50mg a 200mg de tecido e utilizamos 200mg). Os tecidos foram lavados com PBS e o PBS foi retirado com pipeta. A seguir os tecidos foram picados rapidamente com tesoura e misturados em um tubo eppendorf de 1,5ml. A amostra foi homogeneizada com pistilo em 2ml de tampão CEB (*cytoplasmic extraction buffer*), com 1% do inibidor de protease do kit (halt protease inhibitor cocktail 100x).

Após estar bem homogênea, a amostra foi transferida para o filtro no tubo Falcon de 15ml e centrifugada a 500xg por 5' a 4°C. O eluído foi transferido para tubo eppendorf de 1,5ml com o rótulo CE (*cytoplasmic extract*) e o filtro foi transferido para um novo tubo Falcon de 15ml. Foram aplicados 1,3 mL do tampão MEB (*membrane extraction buffer*), com 1% de inibidor de

protease (Sigma-Aldrich #P8465), sobre o pellet no filtro, agitou-se em vórtex e incubou-se por 10' a 4°C sob agitação suave no orbital. Em seguida a solução foi novamente centrifugada a 500xg por 5' a 4°C. O eluído foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5ml com rótulo ME (*membrane extract*) e o filtro foi transferido para um novo tubo Falcon de 15ml. Foram aplicados 450µL do tampão NEB (*nuclear extraction buffer*), com 1% de inibidor de protease, ao pellet, agitou-se em vórtex rapidamente e incubou-se por 30' a 4°C sob agitação suave no orbital. Então o tubo foi centrifugado a 5.000xg por 5' a 4°C. O eluído foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5ml com o rótulo NE (*nuclear extract*) e o filtro foi transferido para outro tubo Falcon de 15ml. Preparou-se 340µL de tampão para a próxima etapa: 311,7µL tampão NEB, 3,2 µL de inibidor de protease, 15,7 µL de MNase 100 unidades/µL (*micrococcal nuclease*) e 9,4 µL de CaCl₂ 100mM. Adicionou-se esse tampão ao pellet imediatamente e o pellet foi incubado nessa solução por 30' a temperatura ambiente e vortexado. A seguir, a amostra foi centrifugada a 16.000xg por 5' a TA. O eluído foi transferido para um tubo Eppendorf de 1,5ml com o rótulo CB (*chromatine bound*) e o filtro foi transferido para outro tubo Falcon de 15ml. Foram adicionados 250µL do tampão PEB (*pellet extraction buffer*), com 1% de inibidor de protease, sobre o pellet, agitou-se em vórtex e incubou-se por 10' a TA. Em seguida a solução foi centrifugada a 16.000xg por 5' a TA. O eluído foi transferido para um tubo Eppendorf de 1,5ml com o rótulo PE (*pellet extract*) e o restante do pellet foi descartado.

Quantificou-se os extratos de proteína total e das frações subcelulares do epitélio olfatório por reagente de Bradford. O cálculo de concentração das

amostras foi feito com base na equação da linha de tendência das amostras de BSA, de concentração conhecida (Tabela 3 e Figura 10).

Controle	Poço 1	Poço 2	Média	Concentração conhecida
BSA	0,315	0,311	0,313	0
BSA	0,498	0,515	0,507	0,5
BSA	0,532	0,548	0,540	1
BSA	0,730	0,666	0,698	2
BSA	0,879	0,826	0,853	4
BSA	0,954	1,077	0,016	8
Amostra				Concentração calculada (2 μ L/poço)
Wt Tot	1,446	1,435	1,441	11,018
WT CE	1,346	1,265	1,306	9,805
WT ME	0,952	0,937	0,945	5,802
WT NE	0,529	0,574	0,552	1,442
WT CB	0,637	0,636	0,637	2,386
WT PE	0,650	0,655	0,653	2,564

Tabela 3: Cálculo da concentração das amostras de proteína total e fracionadas a partir de amostras de BSA de concentrações conhecidas.

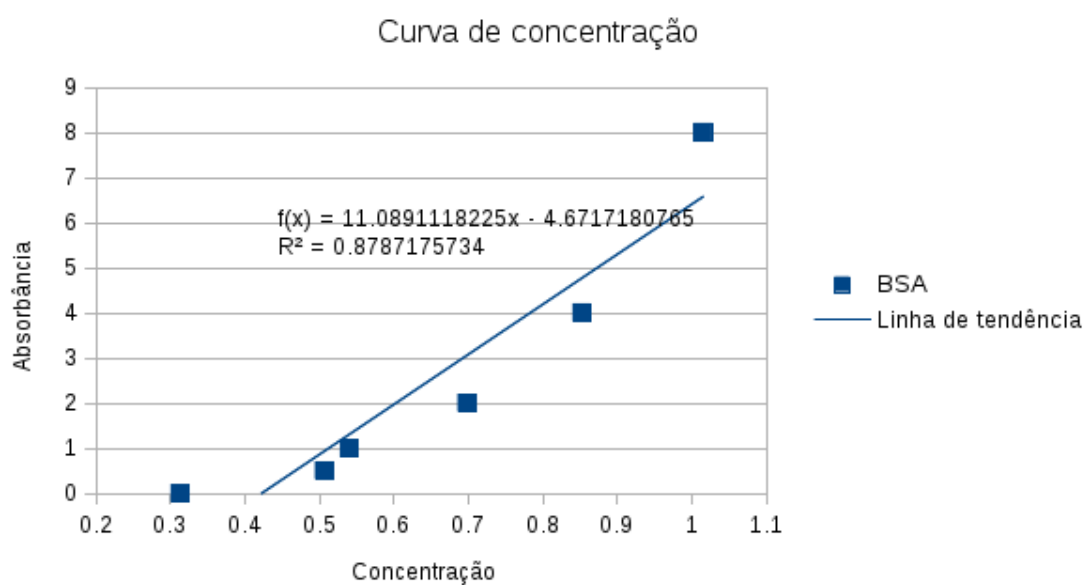


Figura 10: curva de concentração de BSA usada para calcular a concentração das amostras.

3.3 WESTERN BLOT

Amostras de proteína total de epitélio olfatório e frações do fracionamento de proteínas celulares (CE, ME, NE, CB e PE) foram separadas em eletroforese de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, Aparelho BioRad Mini-PROTEAN Tetra Cell) com gel lower a 10% e gel upper a 4%. As amostras foram preparadas com tampão de amostra redutor 4x, com quantidade total de proteína de 20µg por amostra (exceto no caso da fração CE, que concentrou muito a amostra com 20µg, inibindo as outras frações no momento da revelação, e, portanto, foi aplicada com 5µg de proteína total no Western Blot quando se incubou). A eletroforese correu a 30mA por gel até as amostras entrarem no segundo gel e 40mA por gel dali em diante.

As amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose em cuba de transferência (BioRad Mini-PROTEAN 3 Cell) a 120V durante 90 minutos. Após transferência a membrana foi lavada com água destilada, marcada com vermelho de Ponceau, cortada no tamanho das amostras e o *ladder* foi marcado com lápis de cor. A membrana foi lavada três vezes rapidamente com 3ml de TBST 0,1% de Tween e bloqueada com solução de bloqueio (leite desnatado 5% em TBS 1x) por 60 minutos. Em seguida a membrana foi lavada novamente com TBST 0,1% de Tween, cinco vezes cinco minutos (3ml/vez) e foi incubada com anticorpo primário *over night* a 4°C (7ml). No dia seguinte, a membrana foi lavada novamente com TBST 0,1% de Tween, cinco vezes cinco minutos (3ml/vez) e foi incubada com anticorpo secundário (7ml) por 60 minutos a TA. Depois a membrana foi lavada novamente com TBST 0,1% de Tween, cinco vezes cinco minutos (3ml/vez).

As membranas foram reveladas imediatamente após a última lavagem com solução de revelação (GE Healthcare Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent) e cassete de filme Valumax Cassette Plus (MCI Optonix) com filme (GE Healthcare Amersham Hyperfilm ECL), com vários tempos de exposição diferentes em câmara escura.

3.4 EXTRAÇÃO DE RNA

Extraímos RNA total de epitélio olfatório de seis animais: três animais *Ric8b* cKO e três animais WT, as amostras foram identificadas com os códigos C1 a C6 (Tabela 2). Todo o material e a bancada foram limpos com *RNAse away*, a fim de evitar a degradação do RNA.

Os animais foram eutanasiados com gás carbônico usando gelo seco e câmara de gás. O epitélio olfatório foi removido e transferido para um tubo de 1,7mL.

As amostras foram mantidas no gelo o tempo todo para evitar degradação do RNA. Os tecidos coletados foram homogeneizados em Trizol (Thermo Fisher Scientific) com homogeneizador com pistilo e centrifugados para retirar debris. Foi feita separação de fase com 200 μ L de clorofórmio para cada 1ml de Trizol e precipitação com 500 μ L de isopropanol para cada 1ml de Trizol. O RNA foi lavado com 1ml de EtOH 75% para cada 1ml de Trizol. Em seguida, o pellet foi ressuscitado em 50 μ L de água DNase/RNase-free. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C.

Alíquotas das amostras foram diluídas em água DNase/RNase-free numa percentagem final de 10% de amostra em água e foram aplicadas em gel de agarose 1,5% (com tampão de amostra), marcadas com brometo de etídio e visualizadas em fotodocumentador. Observa-se que os RNAs ribossomais 28S, 18S e 5S se apresentaram intactos em todas as amostras, indicando que os RNAs estão íntegros (Figura 11). O RNA ribossomal é o mais abundante nas células e pode ser visualizado nas bandas 28S, 18S e 5S com marcação de brometo de etídio. A integridade no RNA ribossomal indica a provável integridade do RNA total das amostras.

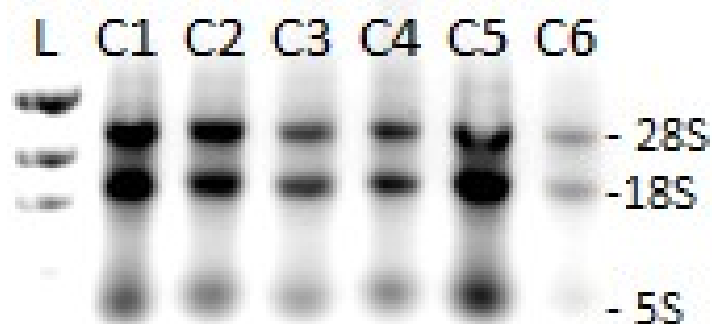


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para visualizar as amostras de RNA total. Legenda: L = ladder de 100bp. C1 a C6 = amostras.

Em seguida, quantificamos estas amostras de RNA utilizando Nanodrop.

As concentrações obtidas estão apresentadas na Tabela 4 (abaixo):

Amostra	Valor de 260/280	Valor de 260/230	Concentração de RNA (ng/ μ L)
C1	2.0	1.23	1468.8
C2	2.0	1.22	1124.5
C3	1.99	0.93	1017.7

C4	1.97	0.89	845.9
C5	2.0	1.45	1674.2
C6	1.86	0.75	458.9

Tabela 4: Quantificação das amostras de RNA com Nanodrop.

A quantificação com Nanodrop indicou que as amostras apresentaram alta concentração de RNA e boa pureza: sem contaminação por proteínas (absorbância 260/280 próximos de 2), porém com alguma contaminação por outros compostos como fenóis e sais (absorbância 260/230 baixa).

Novas alíquotas das amostras foram preparadas numa concentração de 250ng/ μ L e uma análise mais rigorosa da qualidade do RNA foi realizada utilizando o BioAnalyzer (Agilent). Todas as amostras apresentaram bandas bem definidas para 18S e 28S (Figura 12) e $RIN \geq 7.60$ (Figura 13). O RIN (RNA Integrity Number) é uma escala de degradação do RNA na qual RNA completamente degradado apresenta $RIN=1$ e RNA completamente intacto apresenta $RIN=10$ (SCHROEDER et al., 2006). No geral, quanto maior o RIN, melhor a amostra, mas características das amostras podem influenciar no valor do RIN (como a abundância de RNAs mais curtos na amostra) e certos tipos de amostras podem ter RIN baixo mesmo quando íntegras. Por causa disso, não existe um valor limite exato de RIN para que uma amostra seja considerada adequada para sequenciamento. Existe, no entanto, consenso de um valor mínimo de RIN entre 7 e 8 para sequenciamento de transcriptoma. A degradação do RNA pode interferir diretamente nos resultados de sequenciamento, em especial a quantificação de transcriptomas e na detecção de fusão gênica (a fusão de genes resultante de translocação, deleção ou inversão cromossomal) (DAVILA et al., 2016; GALLEGO ROMERO et al.,

2014). No entanto, é possível realizar correções computacionais de erros de RNAseq causados por certa degradação das amostras de RNA (DAVILA et al., 2016). Baseado nesses dados, podemos assumir que o consenso de RIN mínimo em torno de 7 ou 8 é aplicável às nossas amostras.

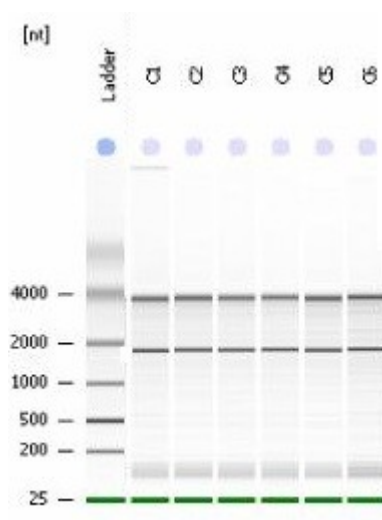


Figura 12: Imagem representativa 'eletroforese-like' das amostras de RNA total do BioAnalyzer.

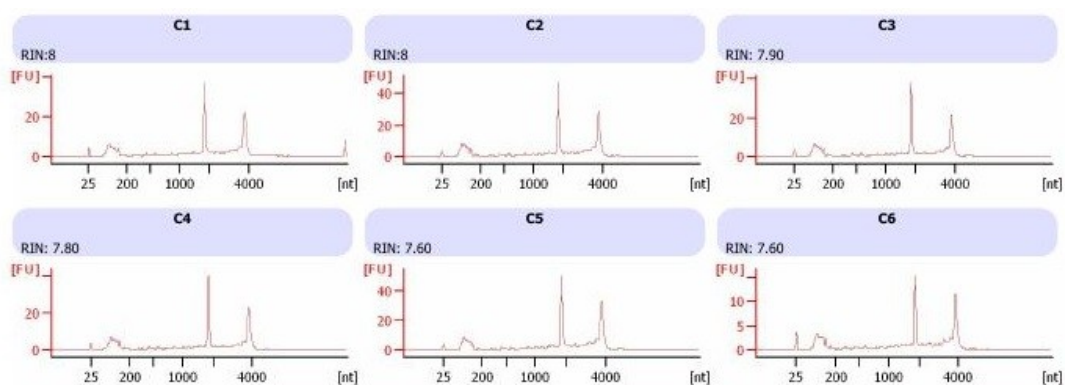


Figura 13: Eletroferogramas das amostras de RNA do BioAnalyzer. Os picos de RNA ribossomal 28S e 18S estão claramente definidos. Os números de integridade de RNA (RIN, *RNA Integrity Number*) estão apresentados.

Essas amostras foram enviadas para sequenciamento de transcriptoma como descrito a seguir.

3.5 SEQUENCIAMENTO DE TRANSCRIPTOMA E ANÁLISE BIOINFORMÁTICA

O sequenciamento de transcriptoma de epitélio olfatório foi feito em colaboração com Paula Fontes Asprino do Hospital Sírio Libanês, que utiliza o equipamento Illumina NextSeq 500/550 e o NextSeq 500/550 High Output v2 kit. As análises de bioinformática foram realizadas pelo nosso colaborador Pedro Galante, do Hospital Sírio Libanês. Para estas análises foram utilizados DESeq2, STAR, Gencode M19, Kallisto, ClustalW e iTOL.

3.6 HIBRIDIZAÇÃO IN SITU

Foram usadas as sondas para *Trpc2* descritas no artigo de Nakahara e colaboradores (Nakahara et al., 2020). Lâminas de epitélio olfatório de animais *Ric8b* cKO e WT foram preparadas previamente em condições RNase-free. As lâminas foram secadas na bancada por 30' e colocadas na caixa de incubação com todo o material RNase-free. As lâminas foram fixadas com 1ml de PFA 4% em PBS, sendo lavadas a seguir duas vezes em PBS por 5' cada vez. As lâminas foram recolocadas na caixa de incubação e permeabilizadas com 1ml de HCl 0,2M por 10' e lavadas novamente em PBS duas vezes, por 5' de cada vez. Em seguida as lâminas foram colocadas em TEA com 1250µl de anidrido acético, sob agitação suave (para bloquear cargas positivas) por 10' e lavadas novamente em PBS duas vezes 5'. A solução de pré-hibridização foi aquecida a 80°C e foi aplicado 400µl da solução de pré-hibridização por lâmina para

bloquear o tecido, deixando na caixa fechada na estufa a 60°C por 1h. O restante da solução de pré-hibridização foi aquecido a 85°C por 10' e foram adicionadas as sondas (fazendo a solução de hibridização), deixando por mais 10' a 85°C (para desnaturar as sondas). Foi retirada a solução de pré-hibridização das lâminas e foi aplicada a solução de hibridização, coberto com lamínula, na caixa de incubação fechada, incubando na estufa a 63°C *over-night*.

No dia seguinte as lamínulas foram deslocadas em 5xSSC a 55°C e foram feitos banhos sucessivos: 2x SSC por 30'a 55°C, 0,2x SSC por 20' a 55°C, 0,1x SSC por 20' a 55°C, 0,1x SSC por 3' a TA, PTw por 10' a TA, TN por 5' a TA e TN por 5' a TA. As lâminas foram incubadas em TNB na caixa fechada por 3 horas a TA e a seguir foram incubadas com a solução contendo os anticorpos a 1:800. diluídos em TNB (200µl/lâmina), a 4°C *over-night* coberto com lamínula de parafilm.

No dia seguinte foi feita coloração: as lâminas foram lavadas seis vezes em TNT a TA sob agitação suave e incubadas em tampão de fosfatase alcalina com PVA 10%, adicionando NBT/BCIP (substrato da enzima) 1:100 e desenvolvendo pelo tempo necessário. As lâminas foram então lavadas por 5' com PBS, montadas com gelvatol e fechadas com esmalte.

3.7 TESTE DE COMPORTAMENTO ALIMENTAR

A ingestão alimentar dos animais foi avaliada usando dois tipos de ração (ambas da marca PragSoluções Biociências): *high fat diet* (HFD, ração

contendo 57,2% de gorduras) e ração *low fat diet* (LFD, ração contendo 4,5% de gorduras). Os animais foram pesados semanalmente colocando-os dentro de um Becker sobre uma balança e esperando até que a medida estabilizasse. Ao mesmo tempo, era recolhida toda a ração que estivesse caída dentro da gaiola e colocada sobre a tampa, pesando-se a tampa com a ração e depois colocando mais ração e pesando novamente. A quantidade de ração ingerida por semana era calculada subtraindo a primeira pesagem da semana em curso da segunda pesagem da semana anterior. Essas medidas foram realizadas ao longo de oito semanas em quatro grupos: camundongo WT com HFD, camundongo *Ric8b* cKO com HFD, camundongo WT com LFD e camundongo *Ric8b* cKO com LFD.

3.8 TESTE DE SENSIBILIDADE A GASES

Em colaboração com o laboratório de fisiologia respiratória do Prof. Thiago Moreira do ICB-USP, realizamos experimentos para a avaliação da sensibilidade dos animais *Ric8b* cKO a CO₂ e O₂. Foi realizada pletismografia de corpo inteiro pelo método barométrico, com o animal acordado. Nesse método, o camundongo é colocado em uma câmara barométrica, que mede a pressão interna. Quando o animal respira, a alteração do volume da sua caixa torácica gera uma pequena alteração da pressão dentro da câmara, que é medida pelo aparelho. Com isso, o aparelho mede frequência respiratória e volume corrente (amplitude da respiração). Multiplicando os dois temos a ventilação pulmonar, que é usada com indicador de sensibilidade a O₂ e CO₂.

Sabe-se que altas concentrações de CO_2 geram aumento da ventilação pulmonar (para eliminar gás carbônico ao ambiente mais rapidamente), e baixas concentrações de O_2 geram aumento da ventilação pulmonar (para aumentar a captação de oxigênio do ambiente).

4 RESULTADOS

4.1 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA PROTEÍNA RIC8B

Como relatado acima, as funções da proteína RIC8B nos neurônios olfatórios ainda não são totalmente conhecidas. Uma maneira de se obter informação a respeito das possíveis funções de uma proteína, é estabelecer qual a sua localização nos diversos compartimentos celulares. Com o objetivo de verificar a localização subcelular da proteína RIC8B, dissecou-se os epitélios olfatórios de 13 camundongos WT e realizou-se fracionamento de proteínas subcelulares do *pool* desses epitélios olfatórios (Figura 14). Um animal foi utilizado para preparo de extrato proteico total, não fracionado, de epitélio olfatório.

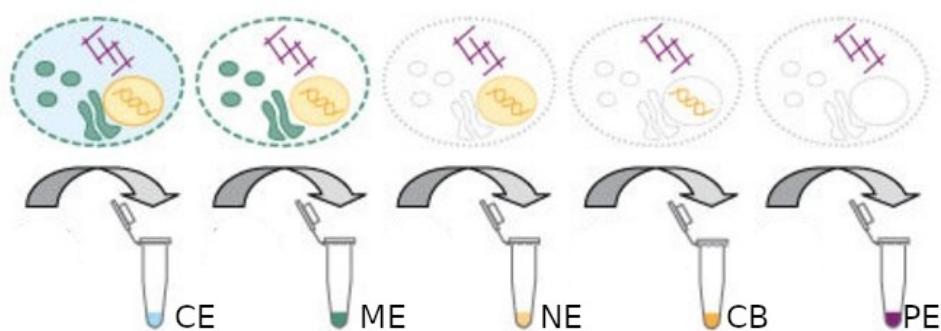


Figura 14. Esquema de fracionamento de proteínas subcelulares de epitélio olfatório. Nesse fracionamento, a amostra é incubada em diferentes tampões sequencialmente de forma a eluir, na ordem: proteínas citoplasmáticas (CE), proteínas de membrana (ME), proteínas nucleares (NE), proteínas associadas a cromatina (CB) e proteínas de citoesqueleto (PE) (adaptado do manual técnico do *Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues*, Thermo Scientific).

A seguir, realizou-se Western blot com anticorpo primário específico para RIC8B utilizando os extratos de proteína total e das frações de proteínas

subcelulares. Repetiu-se o Western blot da mesma forma com anticorpo específico para G α OLF, para verificar se esta se colocava com a RIC8B (Figura 15). Sabendo que a G α OLF é encontrada principalmente nos cílios dos neurônios olfatórios (KURTENBACH et al., 2017), procuramos identificar a localização dos cílios no fracionamento, realizando Western blot para o marcador ciliar α -tubulina acetilada (que é uma forma da α -tubulina muito enriquecida em cílios). A α -tubulina acetilada foi observada principalmente na fração CE, mostrando que os cílios olfatórios devem estar nessa fração nesse fracionamento subcelular, mas também foi encontrada nas frações NE, CB e PE (que devem ter microtúbulos), o que é compatível com o esperado para este tipo de proteína.

Para validar o fracionamento, também utilizamos anticorpos para H3K27m3 (muito abundante em neurônios olfatórios) no Western blot. Esse experimento identificou essa histona modificada na fração CB (como esperado) e na fração CE. Como todas as histonas, a histona H3 é traduzida no citoplasma e importada para o núcleo. As modificações pós-traducionais das histonas podem acontecer parcial ou totalmente no citoplasma, durante ou após a tradução, antes de serem importadas para o núcleo (KECK; PEMBERTON, 2012; RIVERA et al., 2015). Portanto, a presença de H3K27m3 na fração CE do fracionamento pode ser dada por histonas recém traduzidas que sofreram modificações pós-traducionais, mas ainda não foram importadas para o núcleo. Também é possível que as histonas H3K27m3 identificadas no citoplasma sejam proteínas que foram exportadas do núcleo de volta ao citoplasma para serem degradadas e ainda não foram degradadas. Além disso,

quando uma célula está prestas a se dividir, há um aumento na produção de histonas. Nesse período, existe uma fração de histonas ligada a cromatina e outra fração livre (que se ligará a cromatina durante a replicação do DNA). O excesso de histona livre se localiza com centrossomos para degradação mediada por proteassoma (WIKE et al., 2016). Existem muitas células progenitoras no MOE, portanto, é possível que as histonas encontradas na fração CE sejam de células progenitoras que estavam se dividindo, pois nessa fase de divisão celular não há membrana nuclear e as histonas devem eluir na fração citoplasmática. Esses resultados sugerem que a fração CE desse fracionamento não deve conter somente componentes citoplasmáticos, incluindo componentes de outras frações. No entanto, nas outras frações, cada proteína apresentou um padrão diferente, mostrando que houve um fracionamento de proteínas subcelulares.

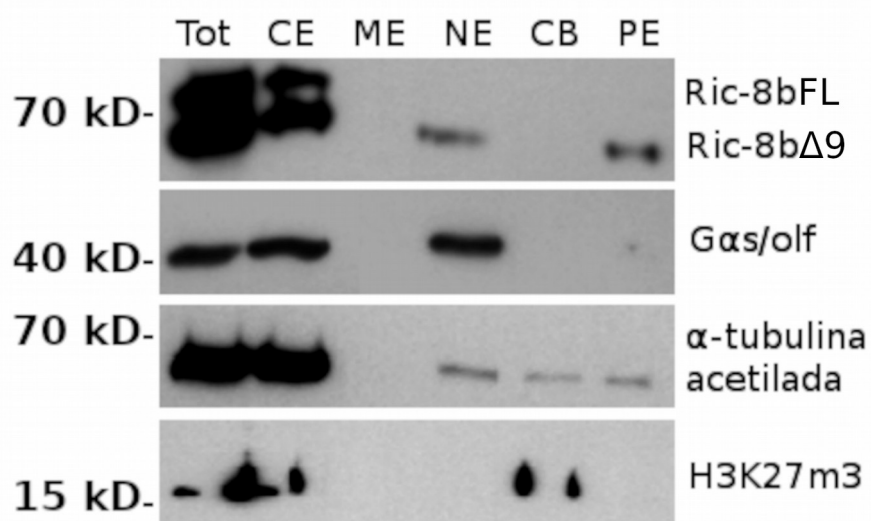


Figura 15: Western blot para Ric8b, Gαolf, α-tubulina acetilada e histona H3K27m3 em proteína total (tot) e fracionamento de proteínas celulares de epitélio olfatório de camundongos tipo

selvagem. As duas bandas em Tot e CE da *Ric8b* correspondem a proteína RIC8BFL e a RIC8B Δ 9. Legenda: CE = extrato citoplasmático, ME = extrato membranar, NE = extrato nuclear, CB = proteínas ligadas a cromatina, PE = extrato do pellet (citoesqueleto).

Todas as proteínas foram observadas no extrato de proteína total de epitélio olfatório. A proteína RIC8B foi encontrada também nas frações NE e PE. Como mencionado acima, nos neurônios olfatórios existem duas isoformas de RIC8B, uma forma que contém todos os exons (RIC8BFL) e uma que não contém o exon 9 (RIC8B Δ 9). Interessantemente, somente a isoforma RIC8B Δ 9 foi observada nessas frações. Como esperado, a proteína G α OLF se colocou com a RIC8B em todas as frações, exceto na PE. Observamos que a G α OLF está preferencialmente localizada na fração CE. Uma quantidade menor de G α OLF também é observada na fração NE. No entanto, como o anticorpo utilizado reconhece tanto G α OLF como G α S, não podemos determinar se esta G α encontrada no núcleo é G α OLF ou G α S.

4.2 TRANSCRIPTOMA DIFERENCIAL DE ANIMAIS *RIC8B* CKO

A fim de verificar as consequências da falta de *Ric8b* no epitélio olfatório, realizamos extração de RNA para sequenciamento de transcriptoma. Os RNAs totais de seis animais (C1 a C6), quatro machos e duas fêmeas, foram sequenciados individualmente. O esquema abaixo (Figura 16) mostra como foram realizados a extração e o sequenciamento de transcriptoma desses animais. É importante ressaltar que o número de machos e fêmeas nos dois

grupos não foi balanceado e isso pode trazer limitações a esse trabalho, pois machos e fêmeas tem expressão gênica diferente entre si.

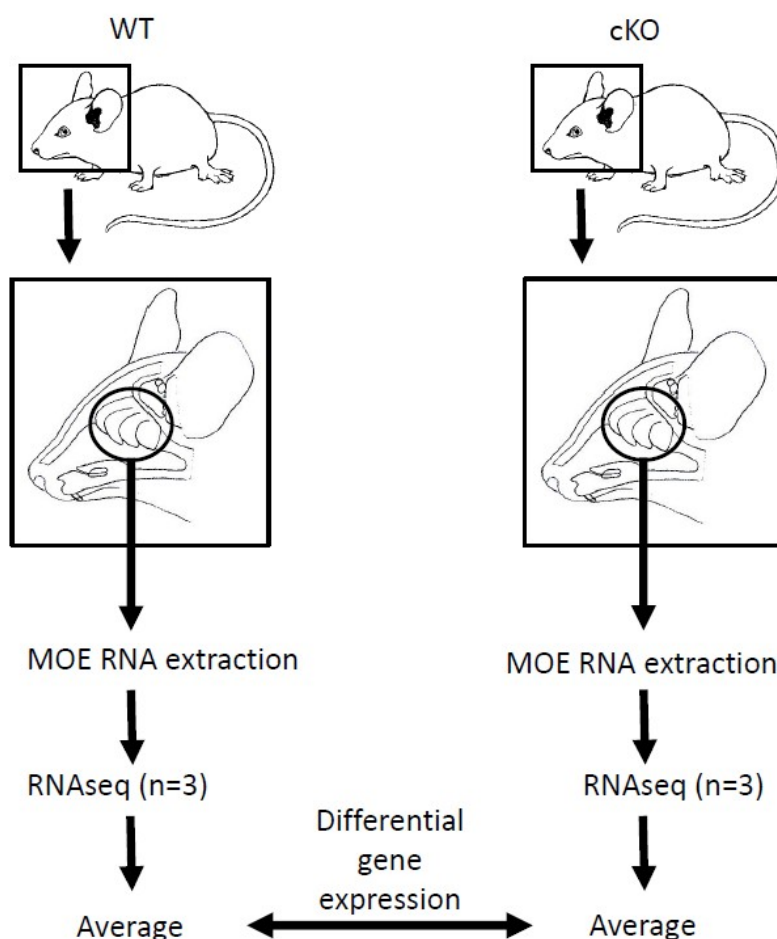


Figura 16: *Workflow* da extração e sequenciamento de RNA, e comparação dos transcriptomas. Os epitélios olfatórios de seis animais (três WT e três cKO) foram dissecados e seu RNA total foi extraído. A sequenciamos o RNA de cada uma das seis amostras individualmente. Calculamos o valor médio de expressão em TPM (*transcripts per million*, ou seja, número de transcritos por milhão de transcritos) dos transcritos sequenciados para cada grupo (WT e cKO) e comparamos a expressão entre os dois grupos.

As amostras de RNA total de epitélio olfatório coletadas foram de animais de idade semelhante (55 a 57 dias de vida) e de duas crias diferentes. O fato de ter amostras de crias diferentes permite a futura comparação dos resultados entre indivíduos de um *pool* genético mais amplo, o que minimiza efeitos de variabilidade entre indivíduos. A integridade das amostras foi

analisada utilizando-se eletroforese em gel de agarose e através de análise com o BioAnalyzer, e ambos mostraram os RNAs ribossomais intactos. A análise da qualidade das amostras realizada usando BioAnalyzer indicou, também, que as amostras estavam em boas condições para sequenciamento, pois as amostras todas apresentaram $RIN \geq 7.60$.

Os *reads* de cada amostra foram alinhados ao genoma de referência e as quantidades de *reads* alinhados das seis amostras foram todas acima de 78% (Figura 17). Amostras com qualidade boa para sequenciamento devem ter alinhamento mínimo de 75 a 80% dos *reads*. A análise dos resultados iniciais do transcriptoma indicou que a qualidade das amostras estava adequada para sequenciamento.

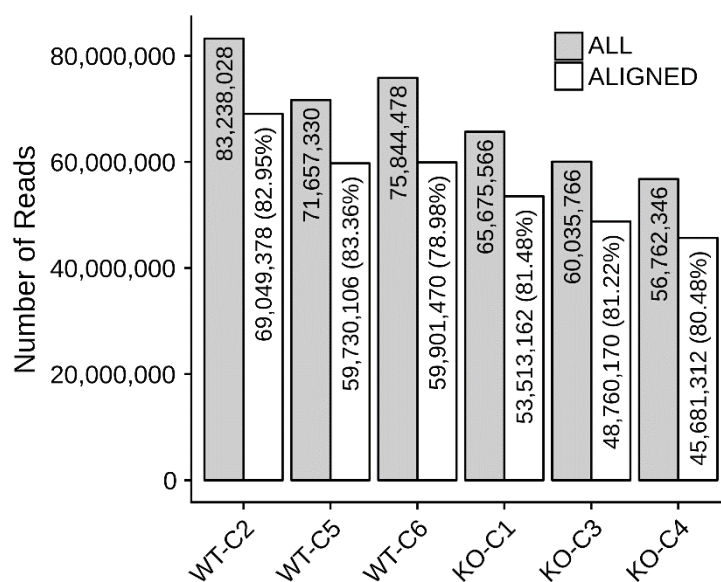


Figura 17. Número total de *reads* sequenciados e mapeados contra o genoma de camundongo (mm10). O alinhamento foi realizado utilizando-se STAR (*indexing the genome, parameter: --sjdbOverhang 69; alignment, parameters: --twopassMode Basic; --seedPerReadNmax 500; STAR VERSION STAR_2.5.3a*). Nenhum filtro de qualidade de mapeamento foi usado.

Além disso, foi verificada a expressão do gene *Ric8b* em cada amostra, para confirmar o *knockout* desse gene nos animais deletados (Figura 18). Os animais WT apresentaram expressão normal de *Ric8b*, enquanto que os animais *Ric8b* cKO apresentaram uma expressão vestigial. Essa expressão vestigial se dá pela produção de um transcrito truncado (no exon 4), que produz uma proteína truncada, não-funcional e marcada para degradação (Figura 18).

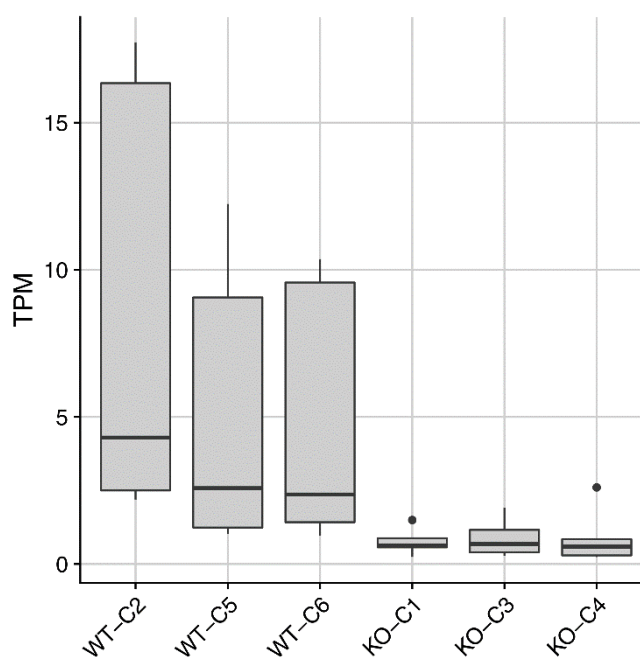


Figura 18. *Box plots* mostram a expressão de todas as isoformas (2 conhecidas e 3 preditas) de RIC8B para cada animal, usando Gencode versão M19. Os traços indicam a mediana de todas as isoformas e os *box* indicam a maior e menor expressão encontradas para as diferentes isoformas de RIC8B. Animais WT apresentaram expressão normal de *Ric8b*, enquanto que animais *Ric8b* cKO apresentaram expressão vestigial.

Os transcritos identificados pelo alinhamento ao genoma de referência foram organizados em transcritos codificadores de proteína e transcritos não codificadores (Figura 19). Essa divisão foi feita porque o sequenciamento cobriu tanto transcritos codificadores quanto os não codificadores, mas o foco

desse trabalho foram os transcritos codificadores. Existe a possibilidade de que os transcritos não codificadores *down*-regulados sejam típicos de OSNs maduros e que possamos, no futuro, identificar esses transcritos dessa forma.

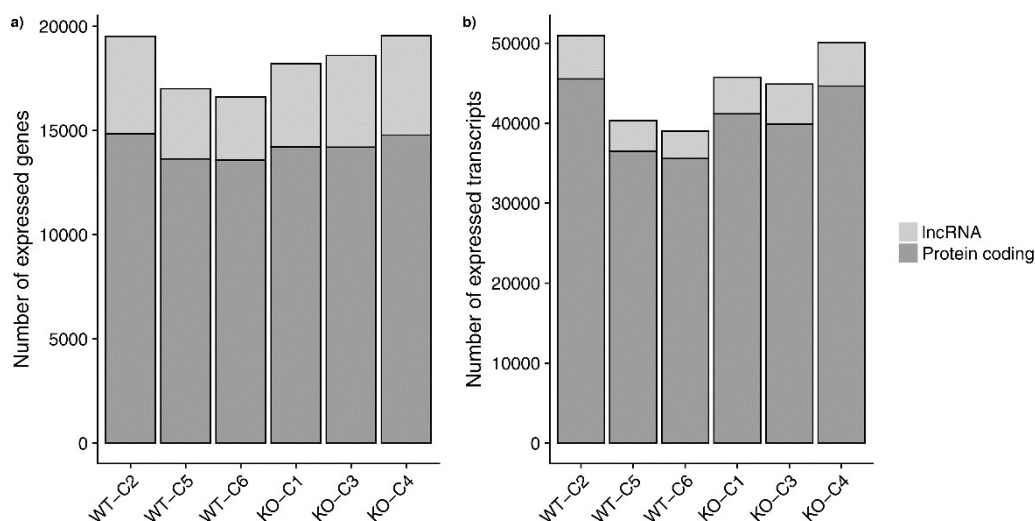


Figura 19. Genes e transcritos expressos em cada amostra. a) Número de genes expressos, considerando pelo menos uma isoforma com TPM maior que 0,1 para cada gene. Genes foram categorizados em “lncRNA” e “protein-coding”, expressão foi obtida com o software Kallisto. b) Número de isoformas de transcritos expressos, considerando TPM maior que 0,1 para cada isoforma. Isoformas foram categorizadas em “lncRNA” e “protein-coding” e expressão foi obtida usando o software Kallisto.

Os genes diferencialmente expressos foram identificados a partir dos *thresholds* de $\text{Log}_2(\text{FC}) \geq 1$ e $\text{p-value} \leq 0,05$, e divididos nas categorias “genes codificadores de OR”, “genes não codificadores” e “genes codificadores de proteínas não-OR” (Figura 20). Foram identificados genes tanto aumentados quanto diminuídos no *Ric8b* cKO, de todas essas categorias.

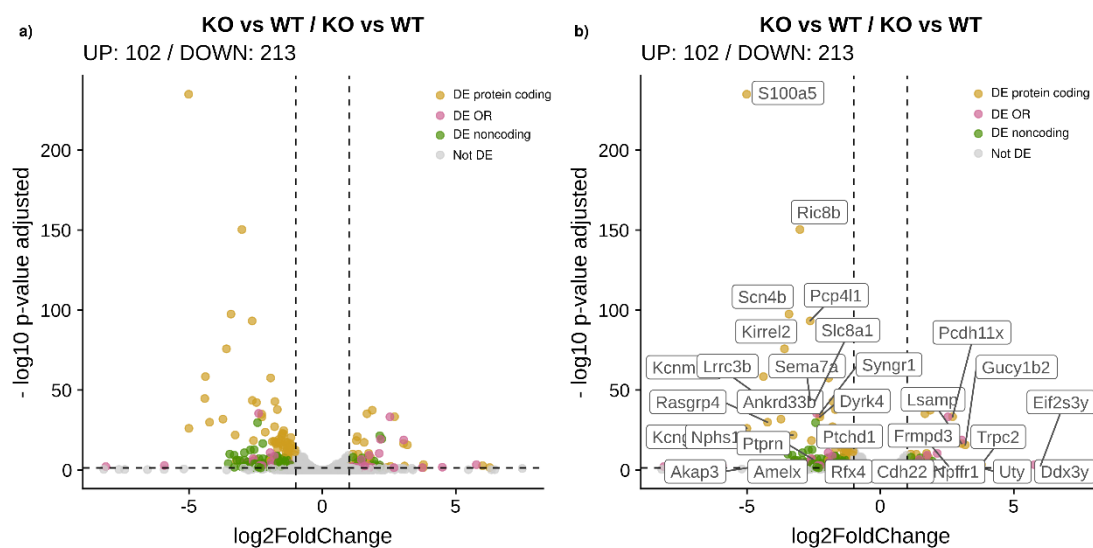


Figura 20. Genes diferencialmente expressos no *Ric8b* cKO. a) Volcano plot do *Fold Change* e *p-value* ajustado (obtidos em DESeq2) entre animais *Ric8b* cKO e WT. Genes diminuídos (*down*) no *Ric8b* cKO se encontram à esquerda e aumentados (*up*) à direita, as linhas pontilhadas representam os *thresholds* que determinam a expressão diferencial significativa ou não. b) Os 50 genes mais diferencialmente expressos receberam rótulo. DE (diferencialmente expressos)

Os genes *downregulados* eram, em sua grande maioria, genes expressos em OSNs maduros. Esse resultado indicou que realmente há menos OSNs maduros no MOE dos *Ric8b* cKO. Portanto, deve haver uma diferença de representação dos diferentes tipos celulares no MOE do *Ric8b* cKO.

Nos chamou a atenção que houveram ORs *up*-regulados e *down*-regulados (Tabela 5). Eles foram identificados e organizados quanto a diversas características: o seu nível de expressão diferencial (Figura 21 e Tabela 5), semelhança filogenética dos receptores (Figura 22), níveis de expressão normal no WT (Figura 23), sua zona de expressão no MOE (Figura 24) e seu locus cromossômico (Figura 25). Foram encontrados 110 genes OR diferencialmente expressos, dentre esses, 86 estavam diminuídos e 24 aumentados no *Ric8b* cKO (Figura 21 e Tabela 5).

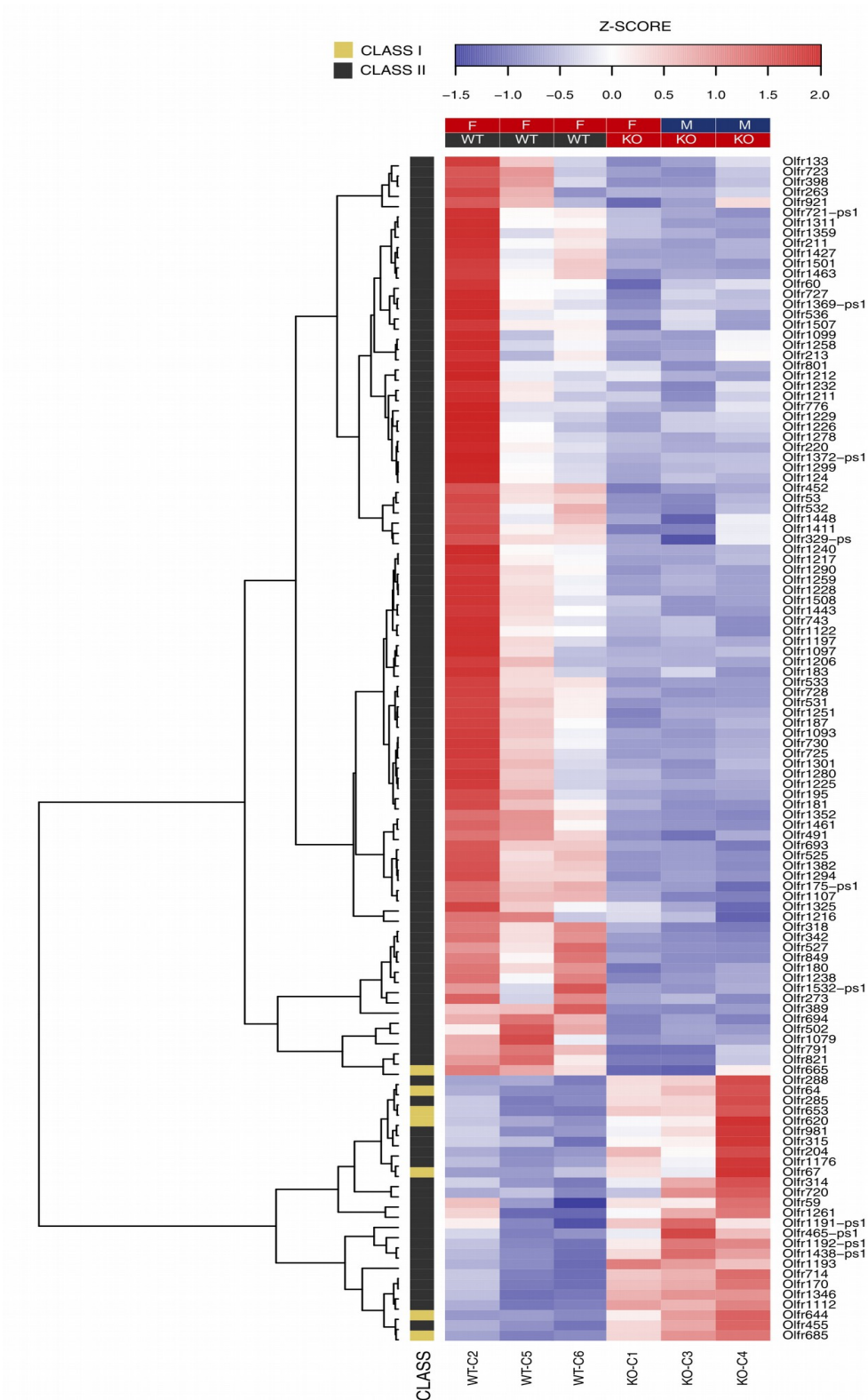


Figura 21. *Heatmap* da expressão de genes OR com identificação de classe do OR (I ou II) e origem da amostra. A expressão foi determinada pelo Z-score de TPM e o *p-value* ajustado $<0,05$ (ajustado pelo DESeq2). A intensidade da cor azul indica intensidade de diminuição no *Ric8b* cKO e a intensidade do vermelho indica a intensidade de aumento no *Ric8b* cKO. Beje indica classe I e preto classe II. Os genes estão clusterizados por semelhança de padrão de

expressão nas diferentes amostras. F (camundongo de sexo feminino) M (camundongo de sexo masculino).

Nome do gene OR	log2FoldChange	p-value	Expressão no <i>Ric8b</i> cKO
<i>Olfr1093</i>	-3.527260665	9.38E-05	DOWN
<i>Olfr525</i>	-3.47010258	1.22E-10	DOWN
<i>Olfr342</i>	-3.304205939	5.32E-10	DOWN
<i>Olfr502</i>	-3.300094468	0.02050744577	DOWN
<i>Olfr53</i>	-3.202308635	5.73E-07	DOWN
<i>Olfr527</i>	-3.098875945	9.38E-07	DOWN
<i>Olfr1079</i>	-3.040980364	0.008295648498	DOWN
<i>Olfr491</i>	-2.949073672	0.007499571197	DOWN
<i>Olfr187</i>	-2.92989265	0.002265672717	DOWN
<i>Olfr195</i>	-2.922535198	1.65E-11	DOWN
<i>Olfr791</i>	-2.921109037	0.0002568668042	DOWN
<i>Olfr1461</i>	-2.917805527	0.006975616932	DOWN
<i>Olfr693</i>	-2.91650671	7.45E-07	DOWN
<i>Olfr1532-ps1</i>	-2.857097992	0.0021105712	DOWN
<i>Olfr175-ps1</i>	-2.796554586	1.06E-05	DOWN
<i>Olfr1501</i>	-2.765997826	0.0006967591642	DOWN
<i>Olfr1382</i>	-2.698457931	3.30E-13	DOWN
<i>Olfr821</i>	-2.681341201	0.00564020828	DOWN
<i>Olfr1107</i>	-2.671051945	0.00012577674	DOWN
<i>Olfr1240</i>	-2.55480767	1.85E-13	DOWN
<i>Olfr1411</i>	-2.548429842	0.02323813081	DOWN
<i>Olfr181</i>	-2.542942458	8.91E-05	DOWN
<i>Olfr725</i>	-2.517880195	0.03467768925	DOWN
<i>Olfr1463</i>	-2.473847892	0.0001882381919	DOWN
<i>Olfr452</i>	-2.442155031	0.01119595924	DOWN
<i>Olfr533</i>	-2.42861205	2.60E-30	DOWN
<i>Olfr723</i>	-2.414469011	0.04083316697	DOWN
<i>Olfr1311</i>	-2.388125087	0.01709916135	DOWN
<i>Olfr1301</i>	-2.380857509	8.68E-08	DOWN
<i>Olfr1299</i>	-2.314674795	0.04980529114	DOWN
<i>Olfr180</i>	-2.274754891	0.0005008544208	DOWN
<i>Olfr694</i>	-2.264616188	0.02374900734	DOWN
<i>Olfr728</i>	-2.232182907	2.76E-17	DOWN
<i>Olfr849</i>	-2.228936096	0.0002315018451	DOWN
<i>Olfr1352</i>	-2.226895746	9.44E-08	DOWN
<i>Olfr1443</i>	-2.219588584	5.01E-05	DOWN
<i>Olfr721-ps1</i>	-2.109590844	0.0105794408	DOWN
<i>Olfr1216</i>	-1.988047718	0.001347253209	DOWN

Olfr531	-1.984453896	3.70E-08	DOWN
Olfr532	-1.973844399	1.10E-07	DOWN
Olfr1097	-1.908267681	0.001003382164	DOWN
Olfr1225	-1.8862698	0.0460865076	DOWN
Olfr1212	-1.839237032	0.0004686824771	DOWN
Olfr1290	-1.82978965	0.007499571197	DOWN
Olfr211	-1.719333062	1.32E-09	DOWN
Olfr1228	-1.696672531	2.18E-09	DOWN
Olfr1238	-1.661423627	2.05E-05	DOWN
Olfr801	-1.647610008	0.004395606667	DOWN
Olfr776	-1.63938321	0.009690424151	DOWN
Olfr1427	-1.627914653	1.27E-06	DOWN
Olfr1448	-1.62170301	0.0134591064	DOWN
Olfr665	-1.610209193	0.04132284283	DOWN
Olfr1294	-1.580613109	0.002002170121	DOWN
Olfr1251	-1.565337155	0.006674217932	DOWN
Olfr1217	-1.537282724	0.0054450637	DOWN
Olfr1369-ps1	-1.508831108	0.006472293439	DOWN
Olfr743	-1.4832127	0.008041901662	DOWN
Olfr1122	-1.474609943	0.0362499646	DOWN
Olfr183	-1.448438027	0.008006046796	DOWN
Olfr124	-1.445499314	3.43E-06	DOWN
Olfr1508	-1.438998827	3.38E-08	DOWN
Olfr1259	-1.435435153	0.002463866954	DOWN
Olfr389	-1.431801268	0.0222718998	DOWN
Olfr1359	-1.415166055	0.001183386316	DOWN
Olfr730	-1.396730703	9.86E-06	DOWN
Olfr1099	-1.395626197	0.03597892812	DOWN
Olfr1206	-1.391217587	0.01792954254	DOWN
Olfr273	-1.373558972	0.0161683386	DOWN
Olfr220	-1.347507327	0.0001999066086	DOWN
Olfr1507	-1.342638593	3.12E-07	DOWN
Olfr133	-1.339765821	0.01439280713	DOWN
Olfr1232	-1.307584683	0.01199889982	DOWN
Olfr398	-1.305177699	0.003082588156	DOWN
Olfr727	-1.271331266	7.26E-05	DOWN
Olfr263	-1.255557233	0.0361853619	DOWN
Olfr1211	-1.243360722	0.0405524539	DOWN
Olfr1280	-1.194952564	0.0006499444647	DOWN
Olfr1197	-1.1861199	0.001644280432	DOWN
Olfr921	-1.179882828	0.02477589744	DOWN
Olfr60	-1.165719029	0.0006372686957	DOWN
Olfr1325	-1.153471935	0.03897057444	DOWN

<i>Olfr213</i>	-1.152878892	0.0145781326	DOWN
<i>Olfr1278</i>	-1.089532442	0.02462470188	DOWN
<i>Olfr1229</i>	-1.08869088	0.03769240825	DOWN
<i>Olfr329-ps</i>	-1.074646715	0.001769203584	DOWN
<i>Olfr536</i>	-1.055652092	7.84E-05	DOWN
<i>Olfr314</i>	1.000466399	0.006042461165	UP
<i>Olfr981</i>	1.03412052	0.02584704496	UP
<i>Olfr59</i>	1.09629856	0.04316631552	UP
<i>Olfr1192-ps1</i>	1.151610903	1.14E-08	UP
<i>Olfr465-ps1</i>	1.254010489	0.01394100583	UP
<i>Olfr720</i>	1.266769929	0.006843646311	UP
<i>Olfr1193</i>	1.306582941	1.57E-05	UP
<i>Olfr1438-ps1</i>	1.332901809	0.0002633787582	UP
<i>Olfr285</i>	1.45037819	1.27E-06	UP
<i>Olfr204</i>	1.501369731	2.60E-08	UP
<i>Olfr653</i>	1.517987143	1.26E-05	UP
<i>Olfr315</i>	1.523725548	0.02724477195	UP
<i>Olfr288</i>	1.62061303	0.001132399219	UP
<i>Olfr67</i>	1.65337211	0.02375181359	UP
<i>Olfr714</i>	1.69649943	0.003834764846	UP
<i>Olfr685</i>	1.752383699	0.002087995464	UP
<i>Olfr1112</i>	1.940607455	2.50E-06	UP
<i>Olfr64</i>	1.985040857	0.0004158370636	UP
<i>Olfr620</i>	2.036826982	0.004770566028	UP
<i>Olfr1176</i>	2.075719139	0.01730974766	UP
<i>Olfr455</i>	2.151946182	4.24E-22	UP
<i>Olfr170</i>	2.154372238	0.0009012155816	UP
<i>Olfr644</i>	2.159725516	0.01848434646	UP
<i>Olfr1346</i>	2.228682809	4.01E-20	UP

Tabela 5: ORs diferencialmente expressos no *Ric8b* cKO com seu log₂FoldChange e p-value.

Os genes OR diferencialmente expressos eram de ambas as classes (classe I ou II). Os genes da classe I apresentaram maior tendência a ficarem aumentados no *Ric8b* cKO (todos os ORs de classe I que estavam diferencialmente expressos estavam aumentados, exceto um). Já os genes da classe II não apresentaram tendência a estarem aumentados ou diminuídos no *Ric8b* cKO. Ou seja, não houve um padrão claro de aumento ou diminuição de expressão no *Ric8b* cKO segundo semelhança filogenética para os receptores

olfatórios de classe II, enquanto que os de classe I apresentaram tendência ao aumento (Figura 22).

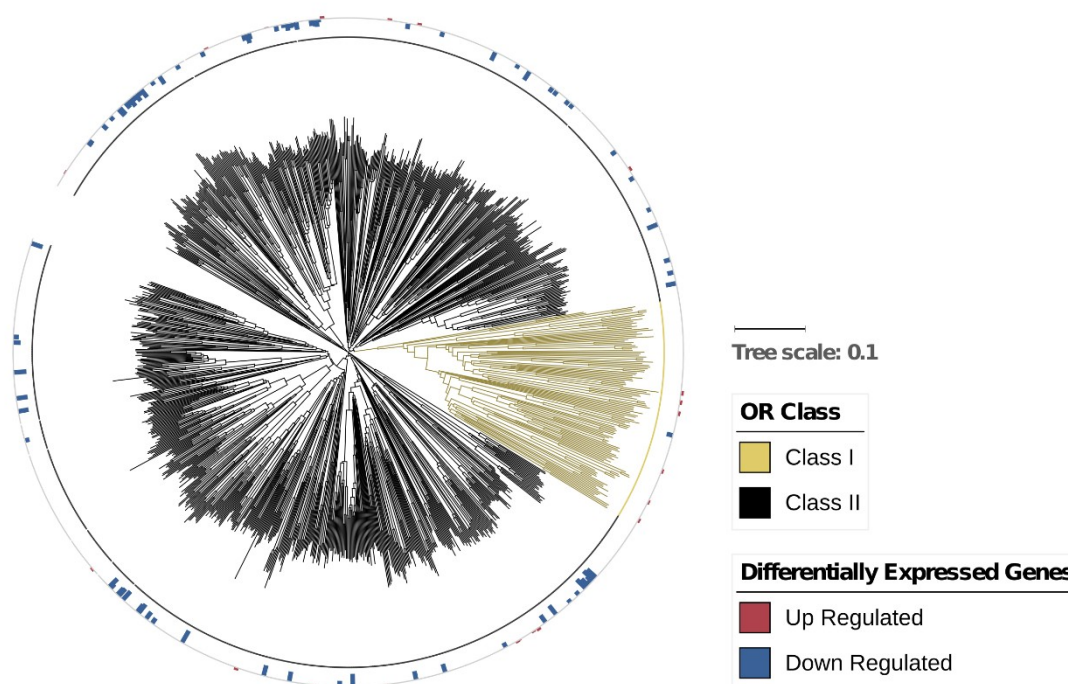


Figura 22. Árvore filogenética contendo todos os ORs de camundongo (sequências de aminoácidos cedidas por Hiroaki Matsunami, da Duke University, EUA). A árvore foi gerada com o software ClustalW e renderizada usando iTOL. $P\text{-value} < 0,05$, $\log_2(\text{FC}) > 1$ (ambos calculados com DESeq2). Os ORs *up* e *down* regulados estão indicados no círculo externo, onde o $\log_2(\text{FC})$ é expresso pelo tamanho da barra externa (azul ou vermelha).

Em seguida, nos perguntamos se os genes OR que apresentam expressão aumentada no *Ric8b* cKO poderiam representar um grupo de genes OR que já são normalmente mais expressos no WT. Analisamos então os genes OR diferencialmente expressos quanto a sua expressão normal no epitélio olfatório de camundongos WT (Figura 23). No entanto, verificamos que os genes mais aumentados no *Ric8b* cKO eram pouco expressos no WT e os genes diferencialmente expressos que eram mais expressos no WT se apresentaram todos diminuídos no *Ric8b* cKO.

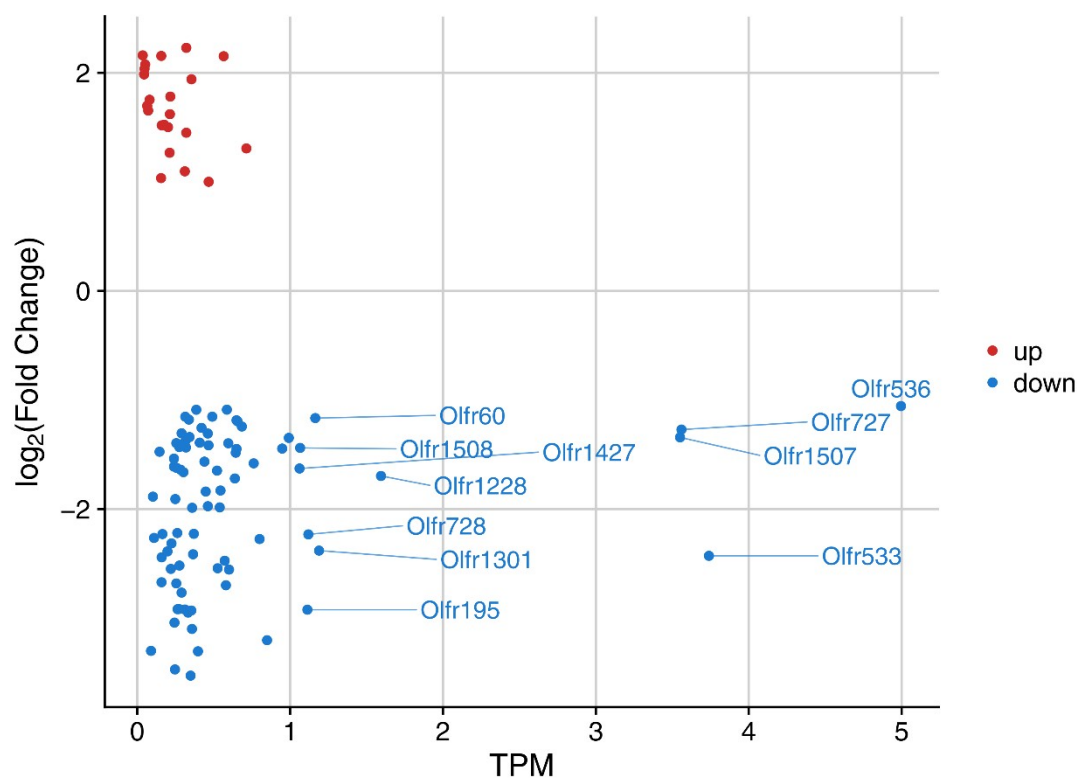


Figura 23. *Scatter plot* de $\log_2(\text{FC})$ e expressão média (no camundongo WT) de genes OR diferencialmente expressos no *Ric8b* cKO. O eixo x mostra a intensidade de expressão do gene nos três animais WT em transcritos por milhão (TPM). O eixo y mostra o quão aumentado ou diminuído o gene está nos animais *Ric8b* cKO em comparação com os WT em \log_2 Fold Change. Os genes rotulados tem expressão maior que 1 TPM (genes mais expressos) no WT e tem $\log_2(\text{FC})$ negativo (estão todos diminuídos no *Ric8b* cKO).

Quando a zona de expressão dos ORs (retirado de Segura et al., 2021) no MOE foi analisada, observou-se que os ORs diferencialmente expressos da zona 1 tenderam a estar aumentados no *Ric8b* cKO (o que reflete o aumento de ORs classe I, pois esses são expressos principalmente na zona 1). A grande maioria dos genes diminuídos no *Ric8b* cKO são expressos nas zonas intermediárias 2, 3 e 4. Já os genes aumentados no *Ric8b* cKO são expressos em todas as zonas (Figura 24).

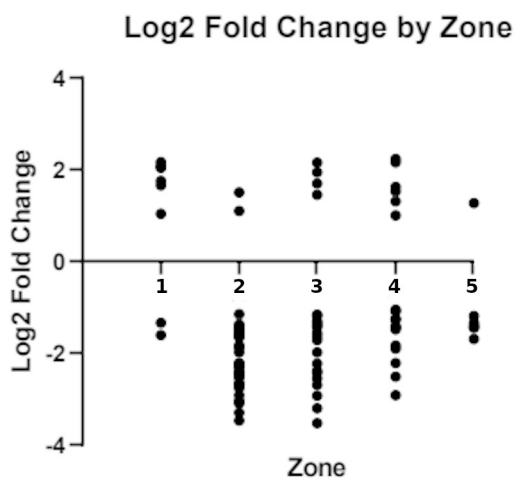


Figura 24: Genes OR com expressão aumentada ou diminuída no *Ric8b* cKO por zona de expressão no epitélio olfatório. No eixo x se observa as zonas 1 a 5 de expressão de genes ORs do epitélio olfatório. No eixo y se observa quão aumentada ou diminuída está a expressão de cada gene. Cada ponto do gráfico corresponde a um gene OR.

Os genes OR foram, ainda, analisados quanto ao seu locus cromossômico (Figura 25) a fim de identificar se o locus cromossômico poderia influenciar no aumento ou diminuição da expressão dos genes no *Ric8b* cKO. Foram analisados os 24 genes OR *up*-regulados e os 37 ORs mais *down*-regulados, num total de 61 genes. Desses genes, 27 (44,3%) estão em loci onde claramente só tem genes *up* ou *down*-regulados (não há os dois juntos) e 34 (55,7%) estão em loci onde isso não fica evidente, na resolução dessa análise. Dez (16,4%) genes estão claramente em loci onde somente tem genes *up*-regulados e 17 (27,9%) genes estão claramente em loci que somente tem genes *down*-regulados (Figura 25 e Tabela 6). Mesmo nos 34 genes restantes, é possível que os genes *up*-regulados não estejam no mesmo loci que os *down*-regulados, pois a resolução dessa análise não permite separar tão claramente todos os loci dos cromossomos. Mas é possível afirmar que alguns

loci parecem tender a ter genes OR aumentados no *Ric8b* cKO e outros parecem tender a ter genes OR diminuídos no *Ric8b* cKO.

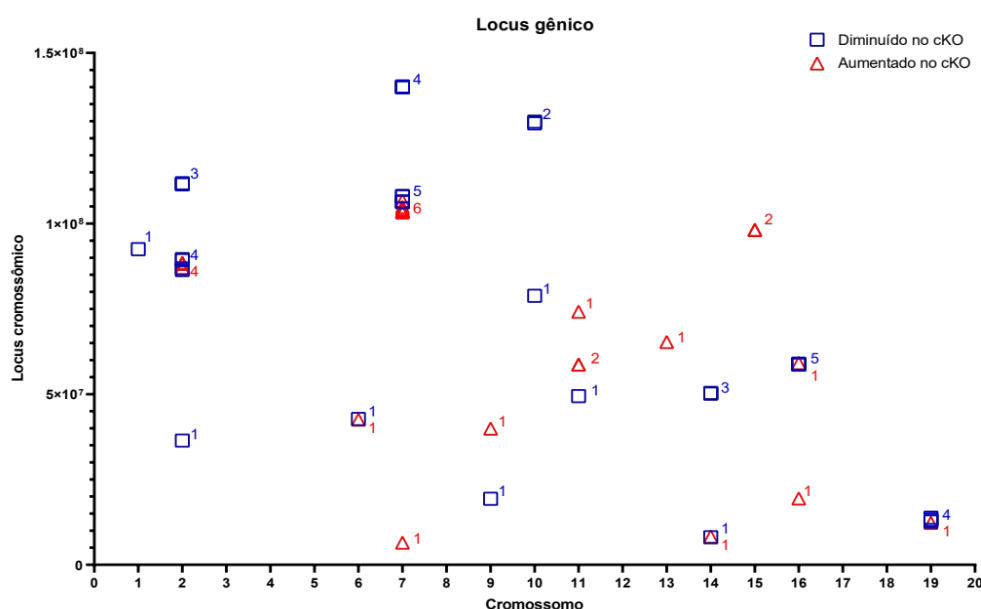


Figura 25. Genes OR com expressão aumentada ou diminuída de acordo com seu locus cromossômico. No eixo x se observa cada um dos cromossomos e no eixo y o lócus de cada cromossomo. Triângulos vermelhos indicam genes OR com expressão aumentada no *Ric8b* cKO e quadrados azuis indicam genes OR com expressão diminuída no *Ric8b* cKO. Os números ao lado dos pontos indicam quantos pontos estão sobrepostos (triângulos em vermelho e quadrados em azul).

Loci com genes somente aumentados	10 (16,4%)	27 (44,3%)
Loci com genes somente diminuídos	17 (27,9%)	
Loci com genes aumentados e diminuídos (aparentemente)	34 (55,7%)	

Tabela 6: proporções de loci com genes aumentados, diminuídos e ambos.

Todos esses resultados juntos sugerem que os genes OR não tem sua expressão diferencial influenciada pelo nível de expressão normal no WT e nem pela zona de expressão do MOE. Mas a semelhança filogenética parece influenciar a expressão diferencial de ORs de classe I e a localização cromossômica do gene OR parece ter alguma influência sobre a expressão diferencial desses genes. Parece haver algum mecanismo de regulação de

expressão gênica que privilegia os genes OR encontrados em certos loci. Pertencer à Classe I de ORs também parece favorecer a expressão aumentada no *Ric8b* cKO.

A seguir, a análise se voltou para os genes não-OR com expressão aumentada no *Ric8b* cKO. Estes genes foram organizados quanto a expressão em cada amostra (Figura 26). Houve muitos genes diferencialmente expressos que não foram explorados nesse trabalho, como os genes aumentados no *Ric8b* cKO *Uty*, *Eif2s3y* e *Ddx3y* (todos ligados ao cromossomo Y, e não foram explorados porque a diferença na sua expressão deve ter ocorrido porque havia camundongos machos apenas no grupo de cKO) e *Lsamp* (envolvido em direcionamento axonal e crescimento neuronal no sistema límbico, SINGH et al., 2018), *Npffr1* (gene relacionado a comportamento alimentar com ação de diminuir a ingestão alimentar, KARNOŠOVÁ et al., 2021). Além desses, genes diminuídos no *Ric8b* cKO também não foram estudados, como *S100a5* (que é o gene mais diminuído de todos no *Ric8b* cKO e é um marcador de atividade neuronal, FISCHL et al., 2014). Interessantemente, alguns dos genes aumentados no *Ric8b* cKO são marcadores de neurônios não canônicos, em especial os genes *Trpc2* e *Gucy1b2* (da subpopulação de neurônios TRPC2+ tipo B e destacados na Figura 26), o que nos levou a imaginar que outras subpopulações celulares no MOE poderiam ter seus marcadores diferencialmente expressos.

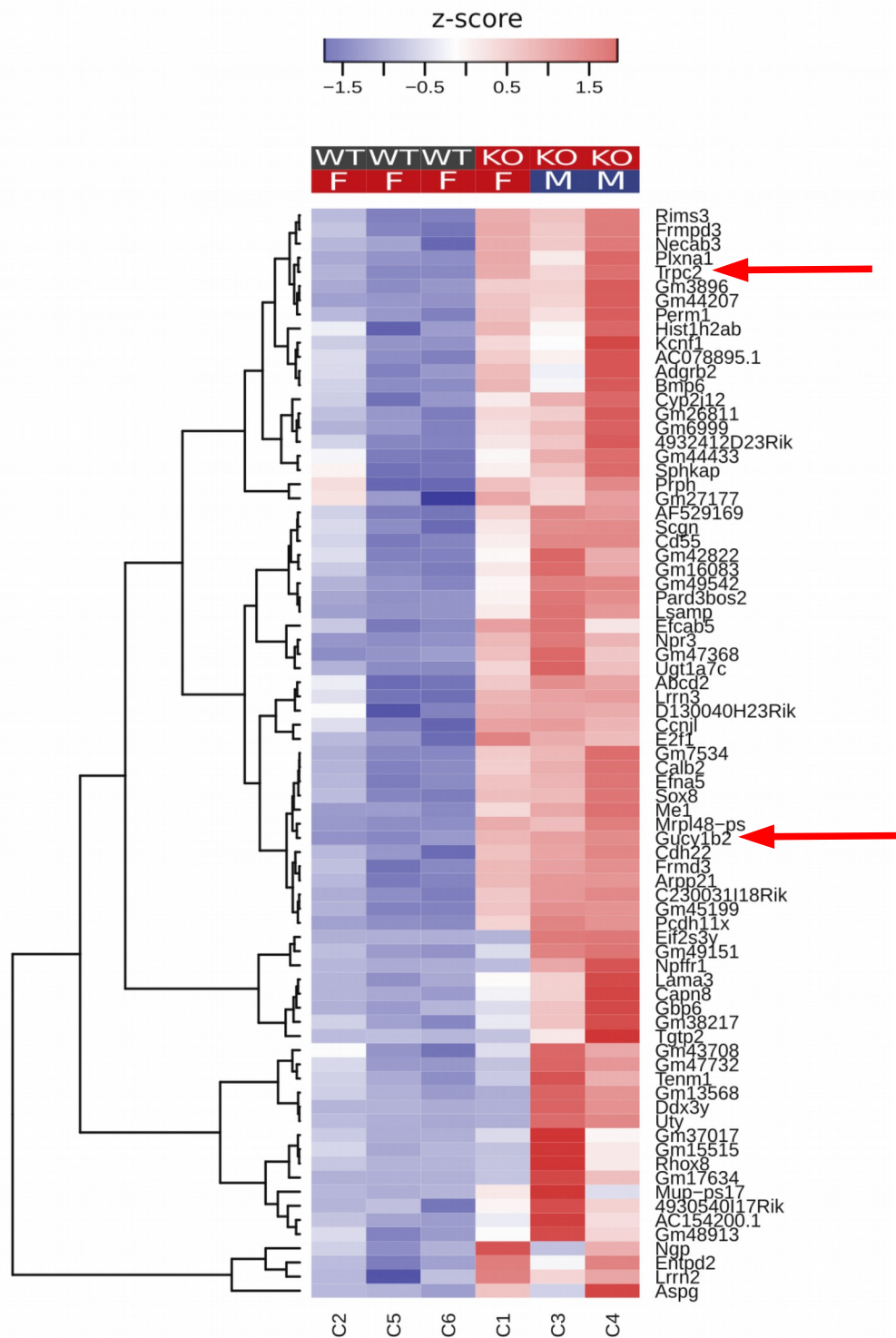


Figura 26. Heatmap com genes não OR diferencialmente expressos que estavam *up*-regulados no *Ric8b* cKO, com $FDR > 0,5$ e $|\log_2(FC)| > 1$. Expressão gênica foi normalizada por Z-score. Genes com expressão aumentada estão em vermelho, com a intensidade da cor relativa à intensidade do aumento da expressão no *Ric8b* cKO (medido em $\log_2(FC)$). As setas vermelhas indicam os genes *Trpc2* e *Gucy1b2*, marcadores dos neurônios TRPC2+ tipo B.

A fim de identificar subpopulações de células diferencialmente representadas no MOE dos animais *Ric8b* cKO, genes marcadores de diferentes tipos celulares do epitélio olfatório foram organizados quanto a sua expressão diferencial no *Ric8b* cKO (Tabela 7). Como esperado, todos os marcadores para OSNs canônicos maduros tiveram a sua expressão diminuída no *Ric8b* cKO (Tabela 7 e Figura 27). Marcadores para OSNs canônicos imaturos e dois dos marcadores de células basais globosas (*Neurod1* e *Neurog1*) tiveram expressão aumentada no *Ric8b* cKO (provavelmente porque os progenitores ficaram proporcionalmente mais prevalentes), mas marcadores de células basais horizontais, de células sustentaculares (SCs, *sustentacular cells*) e de células microvilosas (MVCs, *microvillous cells*) não se encontraram diferencialmente expressas no *Ric8b* cKO. Dos neurônios não canônicos, os marcadores de neurônios TRPC6+, GC-D+, TAAR7+ e CD36+ não estavam diferencialmente expressos, enquanto que marcadores para neurônios TAAR6+, alguns V1R+ (na tabela colocamos somente os diferencialmente expressos) e TRPC2+ encontraram-se aumentados no *Ric8b* cKO. Algumas dessas subpopulações podem ser difíceis de detectar no transcriptoma (como a CD36, cujo marcador é expresso em diversos tipos celulares, incluindo células não OMP+).

O marcador *Trpc2* é um dos genes que teve a sua expressão mais aumentada no transcriptoma do *Ric8b* cKO (Figura 27). Outro marcador de neurônios TRPC2+ também estava particularmente aumentado: o *Gucy1b2*, que é marcador dos neurônios TRPC2+ do tipo B (OMURA; MOMBAERTS, 2014, 2015) (Tabela 7 e Figura 27).

Nome do gene	Células que o expressam	log2FoldChange	pvalue ajustado	Expressão no <i>Ric8b</i> cKO
<i>Omp</i>	mOSN	-2	7.71E-47	DOWN
<i>Cnga2</i>	mOSN	-0.5705825641	6.32E-06	DOWN
<i>Gng13</i>	mOSN	-0.9077915012	3.57E-07	DOWN
<i>Adcy3</i>	mOSN	-0.6312790312	1.58E-06	DOWN
<i>Gng8</i>	iOSN	0.6752456432	0.01687656222	UP
<i>Gap43</i>	iOSN	0.8807149172	1.13E-07	UP
<i>Trp63</i>	HBCs	-0.1393382213	0.4980780033	NDE
<i>Krt5</i>	HBCs	-0.1916199025	0.4406399882	NDE
<i>Krt14</i>	HBCs	-0.3825896885	0.1204550931	NDE
<i>Cyp2g1</i>	SUS	-0.1217716934	0.305180524	NDE
<i>Ascl1</i>	GBCs	0.5920127718	0.1956012178	NDE
<i>Neurod1</i>	GBCs	0.8240484046	9.16E-04	UP
<i>Neurog1</i>	GBCs	1	0.03432701886	UP
<i>Ascl3</i>	MVCs 2	-0.2025071071	0.4930751316	NDE
<i>Cftr</i>	MVCs 2	0.1127822261	0.5248456062	NDE
<i>Trpm5</i>	MVCs 1	0.2358645159	0.4580452443	NDE
<i>Trpc6</i>	TRPC6+	0.48	0.53	NDE
<i>Trpc2</i>	TRPC2+	4	5.72E-06	UP
<i>Gucy1b2</i>	TRPC2+ type B	3	6.24E-19	UP
<i>Gucy2d</i>	GC-D+	0.7794295402	0.2199605286	NDE
<i>Adcy2</i>	GC-D+	0.2076737837	0.4724493713	NDE
<i>Ms4a7</i>	GC-D+	0.13	0.75	NDE
<i>Ms4a1</i>	GC-D+	0.40	0.48	NDE
<i>Ms4a6b</i>	GC-D+	-0.08	0.86	NDE
<i>Ms4a4b</i>	GC-D+	1.17	0.11	NDE
<i>Ms4a6c</i>	GC-D+	-0.06	0.87	NDE
<i>Taar6</i>	TAAR+	1	0.028583496	UP
<i>Taar7b</i>	TAAR+	0.8059712598	0.1717678786	NDE
<i>Cd36</i>	CD36+	-0.057	0.67	NDE
<i>V1R 70</i>	V1R+	1.25	0.02	UP
<i>V1R 184</i>	V1R+	1.11	0.03	UP
<i>V1R 46</i>	V1R+	0.4	0.04	UP
<i>V1R 13</i>	V1R+	2.96	0.04	UP
<i>V1R 180</i>	V1R+	1.11	0.05	UP
<i>V1R 16</i>	V1R+	0.97	0.05	UP

Tabela 7: Log2 *Fold Change*, significância estatística (*p*-value ajustado) e expressão comparativa de WT e *Ric8b* cKO para os genes marcadores de diferentes tipos celulares do epitélio olfatório. Em verde se observa os marcadores aumentados no *Ric8b* cKO e em vermelho os diminuídos. UP = *up*-regulados, DOWN = *down*-regulados, NDE = não diferencialmente expresso.

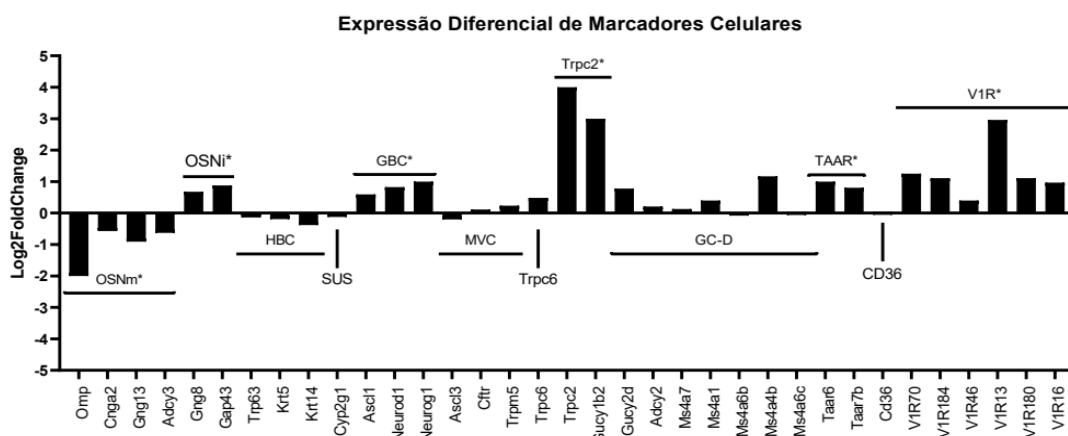


Figura 27. Histograma da expressão diferencial dos marcadores de tipos celulares do MOE. No eixo x se observa os nomes dos genes marcadores. O eixo y mostra a intensidade de expressão diferencial do *Ric8b* cKO em comparação com o WT (por Log2FoldChange). **p*value<0,05.

Estes resultados sugerem que algumas subpopulações de células no MOE do nosso *Ric8b* cKO estão relativamente aumentadas, sendo que a subpopulação mais significativamente aumentada é a de neurônios TRPC2+, em especial do tipo B. Isso é corroborado por resultados preliminares de hibridização *in situ* (ISH, realizadas por Thiago Nakahara). Nessa ISH podemos observar a marcação intensa de *Trpc2* em toda a extensão do epitélio olfatório do *Ric8b* cKO e a marcação no WT, limitada às regiões cul-de-sac e com menos células positivas para *Trpc2* do que no *Ric8b* cKO (Figura 28).

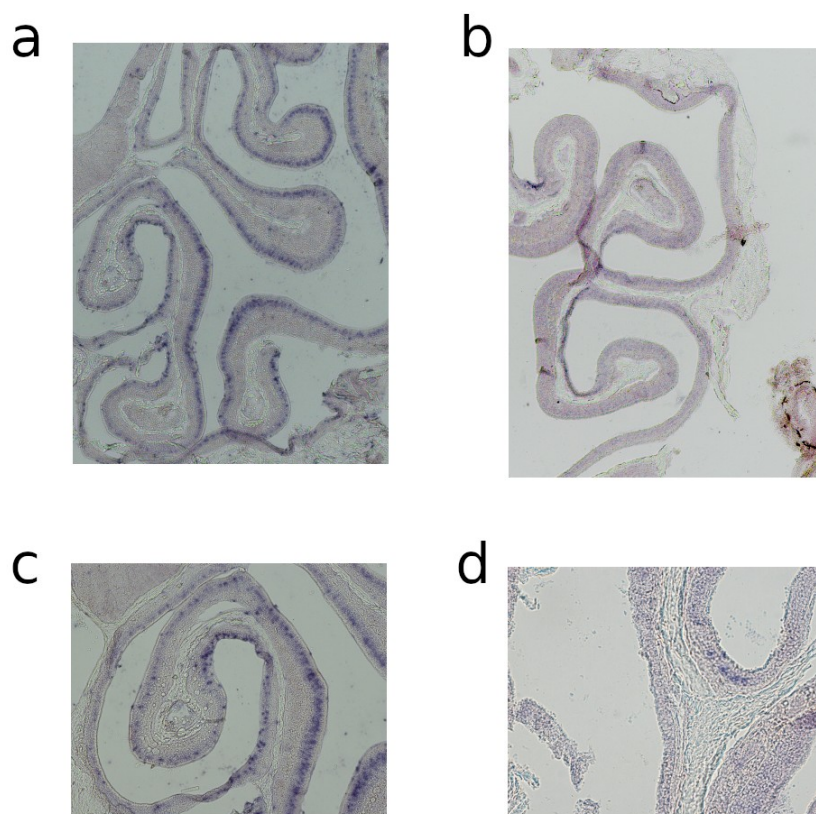


Figura 28: hibridização in situ (resultado preliminar) de animais *Ric8b* cKO (a e c) e WT (b e d) com marcação para *Trpc2*. No WT se vê marcação somente na região cul-se-sac (d) e o tecido como um todo não tem marcação (b). No *Ric8b* cKO há marcação intensa em todo o tecido.

4.3 EXPERIMENTOS FUNCIONAIS

4.3.1 Comportamento alimentar

A relação entre olfato e comportamento alimentar é conhecida, sendo que o olfato tem um papel importante para a ingestão de alimentos (BOESVELDT; DE GRAAF, 2017). Por causa disso, resolvemos avaliar se a ingestão alimentar dos *Ric8b* cKO está alterada de alguma forma. Após medir a ingestão alimentar de animais WT e *Ric8b* cKO com ração HFD (*high fat diet*) e LFD (*low fat diet*), foi observado que há uma diferença de ingestão alimentar entre os camundongos *Ric8b* cKO e os WT. A diferença de ingestão alimentar

foi dependente do tipo de ração, ocorrendo somente com a ração do tipo HFD. A quantidade de ração ingerida foi a mesma para os grupos WT e *Ric8b* cKO com a ração do tipo LFD. Já para a ração HFD houve diferença entre os grupos WT e *Ric8b* cKO: o grupo WT ingeriu mais HFD do que LFD enquanto que o grupo *Ric8b* cKO não apresentou diferença significativa de ingestão entre a HFD e a LFD (Figura 29).

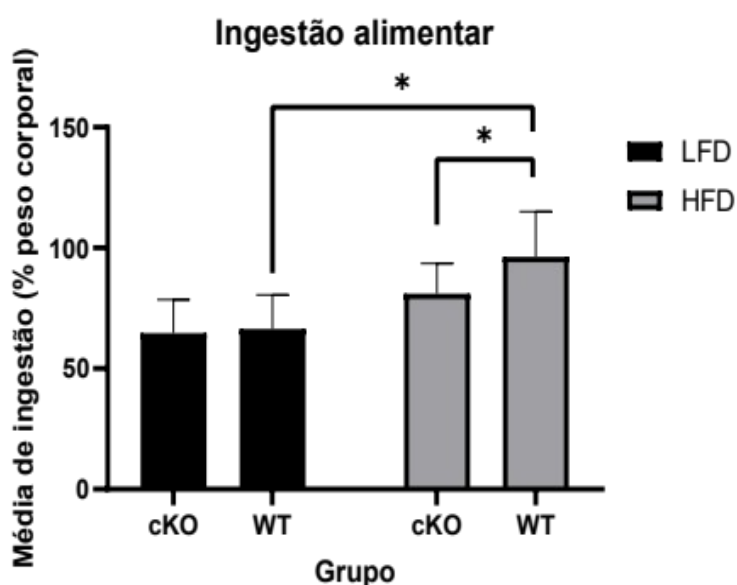


Figura 29. Média da ração ingerida por grupo ao longo das oito semanas. No eixo x observa-se os grupos WT e *Ric8b* cKO com HFD ou LFD. No eixo y se observa a média de ingestão de todos os animais de cada grupo, normalizada pelo peso do animal. N = 3 animais por grupo. * p-value < 0,05.

A ingestão da ração HFD variou ao longo do tempo (Figura 30). Os animais *Ric8b* cKO sempre comiam menos que os animais WT, nas semanas iniciais essa diferença era pequena e foi aumentando constantemente com o ganho de peso dos animais (Figura 30). No entanto, a partir da quarta semana os animais WT passaram a ingerir mais ração num aumento mais intenso que

os animais *Ric8b* cKO, que mantiveram o mesmo aumento gradativo das primeiras semanas (Figura 30).

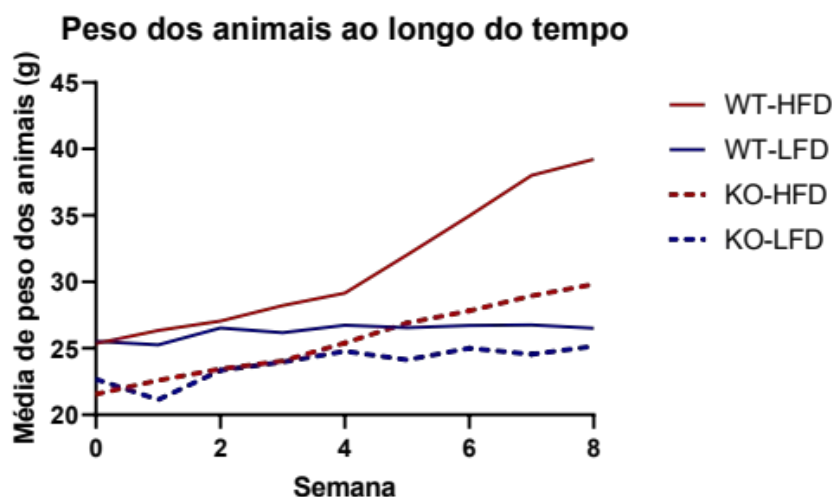


Figura 30. Média de peso em gramas dos animais dos grupos WT e *Ric8b* cKO ao longo das oito semanas. O peso dos animais foi medido semana a semana. Os animais *Ric8b* cKO são sempre menores que os animais WT, mas são aparentemente saudáveis.

Os resultados da avaliação de ingestão alimentar sugerem que os animais *Ric8b* cKO comem menos que os animais WT (quando a medida é normalizada pelo peso do animal, pois os animais *Ric8b* cKO são sempre menores que os seus irmãos WT) e que isso se reflete no ganho de peso mais intenso para os animais WT. Essas diferenças ficaram mais evidentes com a ração HFD.

4.3.2 Sensibilidade a gases

As subpopulações de neurônios não canônicos GC-D+ e TRPC2+ são conhecidas por responderem a certos gases (os GC-D+ respondem a CO₂ e os TRPC2+ type B respondem a CO, NO, H₂S e baixas concentrações de O₂).

Dado isso, realizamos colaboração com o laboratório de fisiologia respiratória do Prof. Thiago Moreira do ICB-USP, para a avaliação da sensibilidade dos animais *Ric8b* cKO a CO₂ e O₂.

Sabe-se que o principal controle da respiração se dá no centro respiratório do bulbo raquidiano do tronco encefálico (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000). Funcionando como marcapasso, esse centro sofre influências de outras regiões do sistema nervoso. Há quimiorreceptores no bulbo raquidiano que detectam a quantidade de CO₂ no sangue através do pH do sangue (pois o CO₂ reage com água formando ácido carbônico) e influenciam a frequência respiratória (número de ciclos respiratórios por minuto) e o volume corrente (quantidade de ar inalado e exalado) da respiração, levando o indivíduo a expirar mais ou menos CO₂, de acordo com a necessidade de equilibrar o pH. O volume total da respiração (chamado de ventilação pulmonar) é calculado multiplicando a frequência respiratória pelo volume corrente da respiração. Esse processo já é bem conhecido, mas mais recentemente foram detectados neurônios no MOE sensíveis a CO₂ (os neurônios não canônicos GC-D+) e outros sensíveis a baixas concentrações de O₂ (os neurônios não canônicos TRPC2+ tipo B). De modo geral, a detecção de CO₂ pelo MOE faz com que os animais evitem ambientes ricos em CO₂ e a detecção de baixos níveis de O₂ faz com que evitem ambientes pobres em O₂. Mas não é claro qual a relação entre a detecção olfatória desses gases e o controle central da respiração. Para explorar essa relação, foram feitos testes de sensibilidade a CO₂ e baixas concentrações de O₂ utilizando-se pletismografia de corpo inteiro pelo método barométrico.

No momento inicial do experimento, com gases na proporção do ar atmosférico (RA, *room air*) com concentração da fração inspirada de CO₂ (FiCO₂, *fractional concentration of inspired CO₂*) de 0,03%, os animais *Ric8b* cKO não apresentaram alterações nos valores basais de ventilação pulmonar (V_E, *ventilation*), frequência respiratória (f_R, *respiratory frequency*) e volume corrente (V_T, *tidal volume*) quando comparado aos animais WT (Figura 31). A exposição a hipercapnia (FiCO₂ = 7%) levou a um aumento adicional no V_T nos *Ric8b* cKO em comparação aos WT, mas não da f_R. O resultado foi um aumento na V_E, ou seja, quando expostos a altos níveis de CO₂, os camundongos *Ric8b* cKO respondem com aumento mais intenso da V_E do que o WT. Isso significa que os *Ric8b* cKO são mais sensíveis a altas concentrações de CO₂ do que os WT.

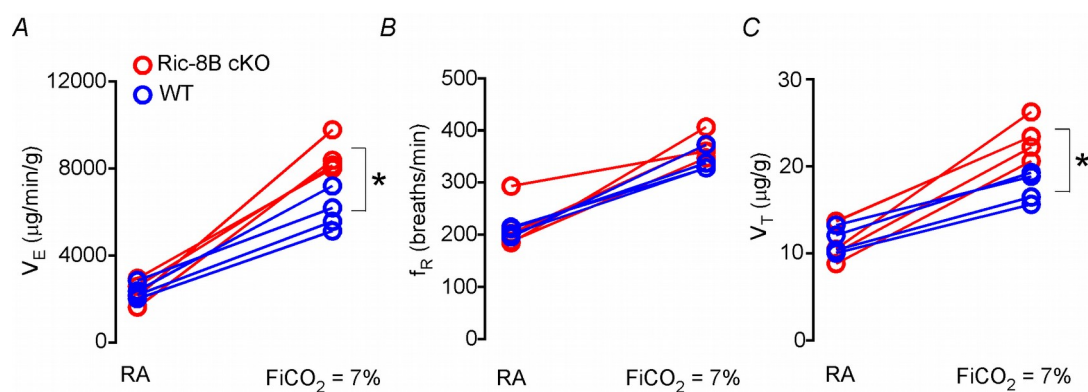


Figura 31. Resposta ventilatória à hipercapnia em animais com deleção do gene *Ric8b*, experimentos realizados por Phellipe Silva, por colaboração com o laboratório do Professor Thiago Moreira (ICB-USP). Alterações na A) ventilação (V_E, µl/g/min), B) frequência respiratória (f_R, bpm) e C) volume corrente (V_T, µl/g) em animais controle (WT, azul) e *Ric8b* cKO (vermelho) expostos ao ar ambiente com ~0,03% CO₂ (RA, *room air*) e 7% CO₂. *Diferente de WT; Two-Way ANOVA; p<0,05; N = 4/grupo de camundongos. Valores basais de ventilação pulmonar: *Ric8b* cKO= 2327 ± 285, WT = 2361 ± 178 µl/min/g (p>0,05), frequência respiratória: *Ric8b* cKO= 217 ± 25, WT = 205 ± 4,3 bpm (p>0,05) e volume corrente: *Ric8b* cKO= 10,7 ± 1, WT = 11,4 ± 0,76 µl/g (p>0,05). Resposta hipercapneica de V_E: *Ric8b* cKO= 7627,9 ± 1779,9, WT = 5758,7 ± 957,5 µl/min/g (F 1,12 = 35,42; p = 0,0015), V_T: *Ric8b* cKO= 22,3 ± 2,7, WT = 17,6 ± 2,1 µl/g (F 1,12 = 13,82; p = 0,002) e f_R: *Ric8b* cKO= 337,1 ± 62,5, WT = 324,5 ± 27,8 bpm (p>0,05). (retirado de Silva et al., 2021).

Quanto à sensibilidade a hipóxia (baixa concentração de O₂), resultados preliminares indicaram que os animais *Ric8b* cKO não tem alteração de sensibilidade. A deleção do gene *Ric8b* não foi capaz de promover alterações nas respostas respiratórias promovidas pela hipóxia (FiO₂ = 8%). Isso significa que não há diferença na sensibilidade a baixas concentrações de O₂ entre o *Ric8b* cKO e o WT, apesar de observarmos um aumento de expressão dos marcadores para os neurônios que detectam baixas concentrações de O₂ (os neurônios TRPC2+ tipo B).

Esses resultados sugerem que a sensibilidade ao gás CO₂ está alterada no *Ric8b* cKO e isso leva a uma alteração na resposta respiratória a esse gás, enquanto que a sensibilidade a O₂ não está alterada no *Ric8b* cKO.

5 DISCUSSÃO

5.1 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA RIC8B

A Ric8b é uma proteína do tipo GEF encontrada no epitélio olfatório que interage com a G α OLF (KERR et al., 2008). Sabe-se que a G α OLF está localizada preferencialmente nos cílios dos neurônios olfatórios, mas a localização subcelular da RIC8B ainda não é bem conhecida. A fim de verificar sua localização subcelular nos neurônios olfatórios realizamos experimentos utilizando um sistema para fracionamento do epitélio olfatório seguido de Western blot. Nesse experimento são obtidas frações de proteínas de citoplasma (CE), de membrana (ME), de núcleo (NE), associadas à cromatina (CB) e de citoesqueleto (PE). Os resultados mostraram que RIC8BFL e RIC8B Δ 9 se encontram preferencialmente na fração CE, onde também devem estar os cílios neuronais. Alguns trabalhos vêm demonstrando o papel de RIC8B como uma chaperona para a subunidade α da proteína G (GABAY et al., 2011; MACHADO et al., 2017). A presença de RIC8B e G α OLF na fração CE corrobora que haja interação entre essas duas proteínas, principalmente da isoforma RIC8BFL, pois a RIC8B Δ 9 não interage com a G α OLF (VON DANNECKER, 2005).

Interessantemente, verificamos que uma pequena fração da RIC8B Δ 9, mas não da RIC8BFL, também se localiza nas frações NE e PE. Isso sugere que a RIC8B Δ 9 tem funções no núcleo e no citoesqueleto. Experimentos de imunofluorescência não publicados do nosso laboratório verificaram a presença da proteína RIC8B em pontos focais no núcleo de células HEK293T, além de

uma forte marcação citoplasmática. Esses pontos assemelham-se a centros organizadores de microtúbulos (MTOC), como por exemplo centrossomos (SANCHEZ; FELDMAN, 2017), o que corrobora nosso achado de RIC8B na fração nuclear desse fracionamento de proteínas celulares, e sugere uma possível associação de RIC8B com microtúbulos. A co-localização nestas frações com a α -tubulina acetilada ainda indica que esta possível associação ocorra com microtúbulos enriquecidos para esta modificação, que são mais resistentes ao stress mecânico (PORTRAN et al., 2017; SZYK et al., 2014; XU et al., 2017), como os presentes em cílios primários e móveis, axônios neuronais e MTOCs (SANCHEZ; FELDMAN, 2017). Além disso, sabe-se que o *knockout* total de *Ric8b* é embrionico letal (NAGAI et al., 2020), sendo que a isoforma RIC8B Δ 9 é a mais ativa em fase embrionária, e isso é um indicador de funções importantes da RIC8B que não se relacionam à G α OLF, principalmente durante o desenvolvimento embrionário. Miller e Rand observaram que RIC8 está envolvida em movimentos de centrossomo durante o início da embriogênese em *C. Elegans* (MILLER et al., 2000). David e colaboradores verificaram que a RIC8 regula a localização cortical de G α I envolvida na orientação planar do fuso mitótico durante a divisão celular em drosófila (DAVID et al., 2005)). Woodard e colaboradores também observaram funções de RIC8 e G α I na orientação do fuso mitótico em células de mamíferos (WOODARD et al., 2010). A presença da RIC8B Δ 9 nas frações NE e PE sugere a interessante possibilidade de que ela poderia estar relacionada com alguma dessas funções. Experimentos futuros serão necessários para investigar se isto ocorre de fato.

5.2 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO *RIC8B* CKO

5.2.1 Genes OR diferencialmente expressos

Para compreender melhor o papel de *RIC8B* *in vivo* nós sequenciamos o transcriptoma total de MOE de animais *Ric8b* cKO e comparamos com o de animais WT. A análise comparativa dos transcriptomas indicou muitos genes que são sabidamente expressos em OSNs maduros (como genes OR, por exemplo) com expressão diminuída no *Ric8b* cKO. Este resultado é compatível com o fato de que nestes animais ocorre um aumento de morte de OSNs maduros no MOE (MACHADO et al., 2017). Observamos um grande grupo de genes OR com expressão diminuída no *Ric8b* cKO, como esperado. Além de serem típicos de OSNs maduros, a expressão de alguns genes ORs depende da ativação do neurônio (VAN DER LINDEN et al., 2020; ZHAO et al., 2013) e a ativação dos OSNs canônicos depende da presença de G α OLF. Como não há essa proteína no *Ric8b* cKO (MACHADO et al., 2017), os neurônios não devem ser ativados e isso deveria causar morte neuronal e diminuição da expressão dos genes OR no *Ric8b* cKO. A diminuição drástica de expressão da proteína S100A5 (marcadora de atividade neural) corrobora que haja diminuição de atividade neural.

No entanto, van der Linden e colaboradores observaram um subgrupo de genes OR que tem sua expressão aumentada quando não há ativação do neurônio (VAN DER LINDEN et al., 2020). Esse poderia ser o caso dos *Ric8b* cKO, pois, curiosamente, observamos que há um grupo de genes OR com

expressão aumentada no *Ric8b* cKO. Outro trabalho mostrou o mesmo efeito de aumento de expressão com diminuição da atividade neural (ZHAO et al., 2013), mas o grupo de ORs que se encontram aumentados no *Ric8b* cKO e os que se encontram aumentados em cada um desses trabalhos não correspondem.

Além disso, sabemos que a expressão de RIC8B em sistema heterólogo auxilia na expressão funcional de ORs (VON DANNECKER; MERCADANTE; MALNIC, 2006), o que indica a possibilidade dessa proteína estar envolvida de alguma forma com a expressão de ORs *in vivo*. Isso explicaria a diminuição de expressão de ORs no *Ric8b* cKO, juntamente com a diminuição de OSNs maduros, e levanta a hipótese de haver alguns ORs que dependem de RIC8B para sua expressão (os diminuídos no *Ric8b* cKO) e outros que independem de RIC8B para sua expressão (os aumentados ou não diferencialmente expressos no *Ric8b* cKO). Sabe-se que a função e a escolha de ORs nos OSNs imaturos depende de proteínas acessórias (IKEGAMI et al., 2017) e é possível que a RIC8B influencie essas proteínas direta ou indiretamente.

Já foi demonstrado que OSNs imaturos expressam mais de um OR durante seu desenvolvimento até escolher um único OR que será expresso abundantemente no OSN maduro (FUSS; ÇELIK; DESPLAN, 2007; HANCHATE et al., 2015; LOMVARDAS et al., 2006; SARAIVA et al., 2015; SERIZAWA et al., 2003; TAN; LI; XIE, 2015). Os genes OR com expressão aumentada no *Ric8b* cKO podem ser genes que tem maior facilidade de serem expressos em neurônios imaturos, mas não sabemos porque haveria essa preferência por esses ORs específicos. Um estudo de Krolewski e

colaboradores identificou um subgrupo de ORs que tem sua expressão alta nos OSNs imaturos e diminuída ao longo do processo de maturação dos OSNs (KROLEWSKI et al., 2020). Se os receptores aumentados no nosso *Ric8b* cKO forem expressos em OSNs imaturos, isso poderia explicar o seu aumento, pois os dados de transcriptoma sugerem que há um aumento de OSNs imaturos no *Ric8b* cKO. No entanto, dos 18 genes OR citados em Krolewski e colaboradores, seis não estão significativamente diferentes no *Ric8b* cKO, um estava diminuído do *Ric8b* cKO e onze não foram identificados pelo nosso sequenciamento.

Exploramos a possibilidade de que os ORs com expressão aumentada tivessem normalmente (no WT) uma expressão muito mais alta que os outros ORs, e o efeito de estarem aumentados no transcriptoma pudesse ser somente um reflexo de ter mais neurônios com esses ORs (e, portanto, uma maior chance de sobrevivência de OSNs expressando esses ORs). No entanto, ao verificar a relação entre a expressão normal no WT e a intensidade da alteração no *Ric8b* cKO, não houve correlação. Ou seja, os ORs com expressão aumentada não estão aumentados simplesmente por normalmente serem expressos num número maior de neurônios, pelo contrário, na realidade, os ORs mais abundantes no WT estão todos diminuídos no *Ric8b* cKO. Um exemplo disso é o *Olf1507*, que é um dos genes OR mais abundantemente expresso no camundongo WT, mas que está diminuído no *Ric8b* cKO (Log2FoldChange = -1,34 e pvalue = 1.93 e-9). Um fato curioso é que a diminuição de expressão do *Olf1507* não ficou evidente num trabalho anterior do laboratório (MACHADO et al., 2017), mas nesse trabalho os animais

testados eram mais jovens (P21) e sabemos hoje que as diferenças ficam mais evidentes em animais mais velhos, como os usados no presente estudo (P60).

Uma possibilidade que explicaria o aumento de expressão de alguns ORs no *Ric8b* cKO é se os neurônios que expressam esses ORs tivessem vias alternativas (independentes de G α OLF e RIC8B) que levassem à sua despolarização e sobrevivência. Já foi observado, por exemplo, que neurônios que expressam *Olf73* apresentam uma via de transdução de sinal alternativa, independente de G α OLF, que inclui G α O e culmina na abertura de um canal que permite efluxo de cloro, despolarizando o neurônio (OSTERLOH et al., 2016). No entanto, no *Ric8b* cKO, *Olf73* não está diferencialmente expresso, assim como *Gao*, e não parece haver expressão diferencial para os genes de OR filogeneticamente semelhantes ao *Olf73*, então essa não parece ser a causa para o aumento de expressão desses ORs.

Consideramos ainda a possibilidade de que esses ORs sejam co-expressos em neurônios olfatórios não canônicos que não dependem de RIC8B. Por exemplo, um terço dos OSNs que expressam *Olf69* co-expressam *Trpc2* (TRPC2+ tipo A, OMURA; MOMBAERTS, 2014). No entanto, o *Olf69* não está diferencialmente expresso no *Ric8b* cKO, apesar de o *Trpc2* estar. Isso indica que os neurônios TRPC2+ não devem estar todos aumentados no *Ric8b* cKO, mas sim principalmente os do tipo B, pois os ORs coexpressos nas TRPC2+ tipo A não estão diferencialmente expressos e sabe-se que os neurônios TRPC2+ tipos A expressam *G α olf*. Existe a possibilidade de que os ORs com expressão aumentada no *Ric8b* cKO sejam coexpressos em outros

neurônios não canônicos, que não TRPC2+ tipo A, que independam de RIC8B e G α OLF.

É possível que os ORs com expressão aumentada tivessem alguma característica intrínseca que permitisse que os neurônios sobrevivessem por mais tempo. Fomos, então, observar se havia algum padrão de aumento ou diminuição de expressão de ORs segundo semelhança filogenética. Parece haver alguns pontos na árvore filogenética de ORs com os genes com expressão mais aumentada ou diminuída, e dos ORs diferencialmente expressos, os ORs classe 1 estão todos, menos um, com expressão aumentada, mas não parece haver um padrão claro de aumento ou diminuição de ORs por semelhança filogenética.

Analisamos, ainda, outras possibilidades que poderiam explicar o aumento de alguns ORs no *Ric8b* cKO: localização genômica, zona de expressão no MOE, dimorfismo sexual e escapar de RNA *decay*. Quanto à localização genômica dos genes OR, ela poderia ser responsável por esta expressão diferencial, isto é, pode ser que alguns loci cromossômicos de ORs sejam mais fáceis de expressar do que outros (ZAZHYTSKA et al., 2021). Observando os loci dos genes OR diferencialmente expressos observamos que pelo menos 44,3% dos genes estavam em loci onde havia somente genes com expressão aumentada ou diminuída (e não os dois juntos). A resolução da análise que fizemos não permitiu determinar se todos os genes OR diferencialmente expressos estavam em loci únicos (somente aumentado ou somente diminuído no *Ric8b* cKO) ou mistos (com ambos). Mas parece haver uma tendência aos loci serem únicos, ou seja, alguns loci tendem ao aumento

de expressão do gene OR no *Ric8b* cKO e outros tendem à diminuição de expressão do gene. Para verificar essa hipótese são necessárias análises mais aprofundadas dos loci, a fim de identificar se os loci se relacionam com os *clusters* cromossômicos de ORs, se estão mais próximos de *enhancers* e outros elementos de regulação de expressão de ORs entre outros fatores. Leme Silva e colaboradores observaram, por exemplo, que o loci de metilação de DNA influencia a expressão gênica (LEME SILVA et al., 2021), mostrando que localização genômica pode influenciar a expressão de genes.

Imaginamos que pudesse haver alguma correlação entre a expressão diferencial e a zona de expressão do gene OR no MOE, já que se sabe que a neurogênese pode ocorrer de maneira diferente nas diferentes zonas (VEDIN et al., 2009). No entanto, essa não parece ser uma variável significativa para a determinação de aumento ou diminuição de expressão de ORs no *Ric8b* cKO.

Vimos, ainda, que Vihani e colaboradores observaram que há dimorfismo sexual na expressão de ORs (VIHANI et al., 2019). Como tivemos diferença de número de machos entre os grupos de animais cujos MOEs foram sequenciados, decidimos verificar se a diferença de ORs estava relacionada ao dimorfismo sexual. No entanto, essa relação não foi encontrada.

Ainda há a possibilidade dos ORs com expressão aumentada no *Ric8b* cKO escaparem de *RNA decay*, pois há certos ORs que escapam dessa degradação por não se associarem ao fator UPF3B (TAN et al., 2020), mas esse não parece ser um fator determinante na regulação de expressão dos ORs no *Ric8b* cKO, pois os ORs que escapam de *RNA decay* não são os mesmos que estão aumentados no *Ric8B* cKO.

Em resumo, observamos diversos artigos nos quais são citadas variações de expressão de ORs, com ORs com expressão aumentada ou diminuída por diferentes razões (IKEGAMI et al., 2017; KROLEWSKI et al., 2020; TAN et al., 2020; VAN DER LINDEN et al., 2020; VIHANI et al., 2019; ZHAO et al., 2013). Em cada um desses trabalhos, o subgrupo de ORs aumentado é diferente. Isso indica que a regulação de expressão de ORs é complexa e depende de muitos fatores, como: ativação do neurônio (VAN DER LINDEN et al., 2020; ZHAO et al., 2013), proteínas acessórias (IKEGAMI et al., 2017), maturação dos OSNs (KROLEWSKI et al., 2020), degradação de RNA (TAN et al., 2020) e sexo dos animais (VIHANI et al., 2019).

5.2.2 Subpopulações de neurônios no MOE

Além dos OSNs canônicos, no MOE WT existem outros tipos de neurônios, como os neurônios não canônicos TAAR+, GC-D+, TRPC+, V1R+ e CD36+. Nossos resultados sugerem que o MOE do *Ric8b* cKO apresenta uma alteração populacional de tipos neuronais. Essa alteração é um fenômeno muito interessante e pode gerar consequências complexas e variadas no olfato do animal. A diminuição de OSNs maduros nos *Ric8b* cKO gera uma alteração na representatividade dos tipos neuronais, certos tipos neuronais que antes representavam uma porção pequena dos neurônios totais do MOE passam a representar uma porção aumentada nesse epitélio.

Com o *knockout* de *Ric8b* e a diminuição de OSNs canônicos maduros, esperava-se que as subpopulações de neurônios não canônicos que não dependessem de RIC8B e G α OLF sofressem um aumento relativo na

população total de neurônios do MOE do cKO. Efetivamente, algumas subpopulações de neurônios não canônicos encontraram-se aumentadas e não foram encontradas subpopulações de neurônios não canônicos diminuídas no *Ric8b* cKO (os tipos neuronais não canônicos no *Ric8b* cKO encontram-se aumentados ou não diferencialmente expressos, nunca diminuídos). É possível que as subpopulações de neurônios não canônicos que não sofreram aumento relativo no MOE (não estavam diferencialmente expressas) dependam de RIC8B ou G α OLF para seu funcionamento, como os neurônios canônicos (Figura 32a) ou são pouco abundantes e não foram detectados no nosso sequenciamento.

Há um aumento de OSNs canônicos imaturos, provavelmente como uma tentativa de repor os neurônios olfatórios canônicos maduros que morreram por falta de ativação, pois a morte neuronal estimula a diferenciação de células progenitoras (BRANN; FIRESTEIN, 2014; CALOF et al., 1996; PFISTERER; KHODOSEVICH, 2017). Um gene diferencialmente expresso corrobora essa hipótese: o gene *s100a5* (o gene com expressão mais reduzida de todos no *Ric8b* cKO, é marcador de atividade neuronal, FISCHL et al., 2014).

Já as subpopulações de neurônios não canônicos que sofreram aumento de representação no MOE dos *Ric8b* cKO não devem depender de RIC8B e G α OLF: TAAR6+, algumas V1R+ e TRPC2+. Foi inesperado encontrar um tipo de neurônio TAAR+ aumentado no *Ric8b* cKO, pois sabe-se que os neurônios TAAR+ expressam G α OLF (LIBERLES; BUCK, 2006). Os presentes resultados sugerem que esses neurônios podem não depender de G α OLF para seu funcionamento. Já os neurônios V1R+ expressos no MOE são pouco

numerosos e não apresentam função bem conhecida. Nos neurônios vomeronasais, onde os receptores V1R são normalmente expressos, não existe a expressão de $G\alpha_{olf}$, mas de outros tipos de proteína G (Figura 32b). É possível portanto que também nos neurônios do MOE, estes receptores não sejam co-expressos com $G\alpha_{OLF}$, e faria sentido que eles não dependam de $G\alpha_{OLF}$. Quanto às células TRPC2+, as TRPC2+ tipo A expressam $G\alpha_{OLF}$ (podendo depender dessa proteína para seu funcionamento, Figura 32c). Já as células TRPC2+ tipo B, cujos marcadores (*Gucy1b2* e *Trpc2*) estão entre os genes mais diferencialmente expressos no *Ric8b* cKO, não expressam *Gaolf* (Figura 32d). Além disso, nossos resultados sugerem que os neurônios *Trpc2* tipo B independam de RIC8B (Figura 32d), mas a presença de RIC8B nas tipo A ainda precisa ser verificada (Figura 32c).

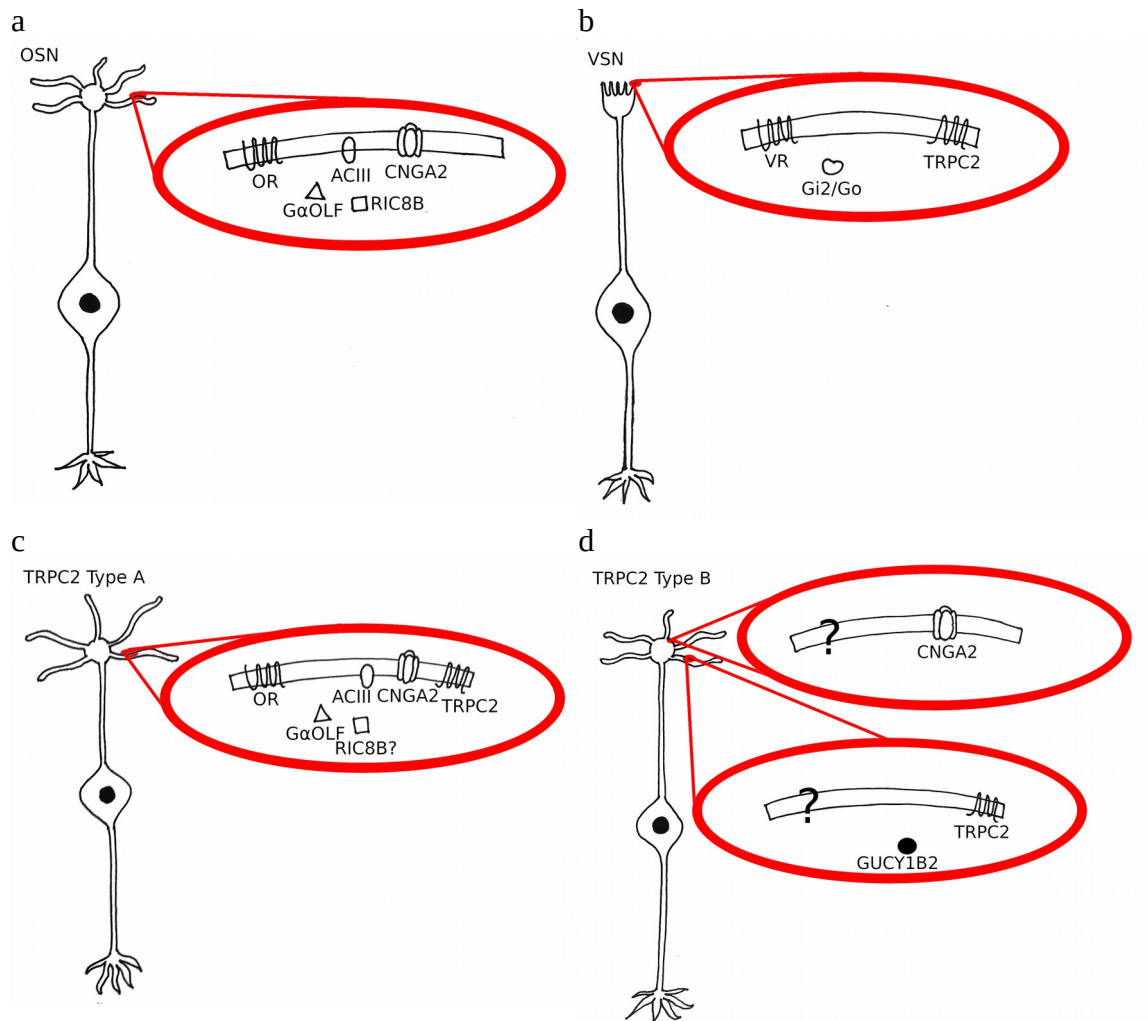
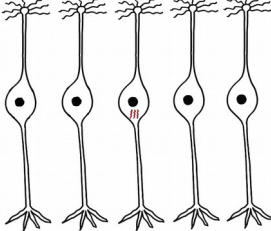
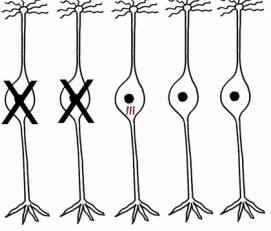
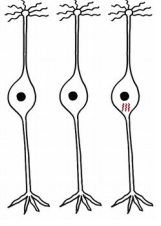
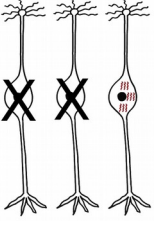
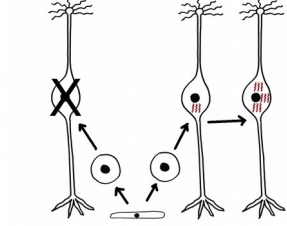
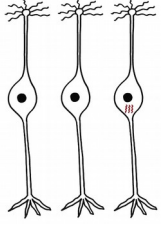
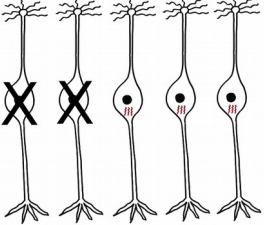
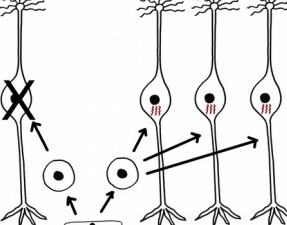
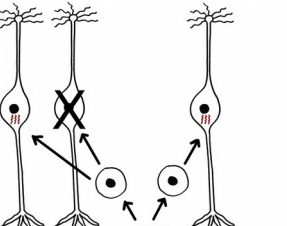


Figura 32. Elementos conhecidos da cascata de sinalização dos neurônios olfatórios canônicos (a), neurônios do órgão vomeronasal (b) e neurônios TRPC2+ (tipo A e B) (c e d, respectivamente) no MOE.

O aumento de expressão de *Trpc2* pode ser um reflexo da diminuição de OSNs canônicos, pode ter sido causado por aumento da intensidade de expressão de *Trpc2* nas células já existentes ou pelo aumento do número de células expressando *Trpc2* (Figura 33). Os resultados preliminares de *in situ* de *Trpc2* parecem descartar as duas primeiras hipóteses, mas há diversos mecanismos possíveis que podem gerar esses cenários (Figura 33):

1. A falta de RIC8B e G α OLF nos neurônios e o aumento da morte de OSNs canônicos gera um aumento somente relativo (de proporção) dos neurônios TRPC2+, que sobrevivem.
2. A falta de RIC8B e G α OLF nos neurônios e o aumento da morte de OSNs canônicos gera aumento na expressão gênica de *Trpc2* nos neurônios TRPC2+.
3. A falta de RIC8B e G α OLF nos neurônios e o aumento da morte de OSNs canônicos gera uma desorganização do tecido e tem um efeito regulatório sobre o tecido, de tal forma que são produzidos mais neurônios TRPC2+ tipo A (espalhadas pelo tecido) e/ou tipo B (nas zonas cul-de-sac). Sendo que pode ocorrer a transdiferenciação de neurônios TRPC2+ tipo A a neurônios TRPC2+ tipo B.
4. A falta de RIC8B e G α OLF nos neurônios e o aumento da morte de OSNs canônicos gera uma alteração na diferenciação celular dos neurônios canônicos e eles passam a se diferenciar (ou transdiferenciar) em neurônios TRPC2+.
5. A falta de RIC8B e G α OLF nos neurônios e o aumento da morte de OSNs canônicos gera expressão ectópica de *Trpc2* nos neurônios canônicos.

Hipótese	WT	<i>Ric8b</i> cKO	Mecanismo
<p><i>Ric8b</i> cKO tem a mesma quantidade total de <i>Trpc2</i>, mas em uma proporção maior do total</p>	<p>OSNc OSNc TRPC2+ Outros Outros</p>  <p>ex: TRPC2+ = 1 em 5 (valor ilustrativo)</p>	<p>OSNc OSNc TRPC2+ Outros Outros</p>  <p>ex: TRPC2+ = 1 em 3 (valor ilustrativo)</p>	<p>O <i>knock-out</i> de <i>Ric8b</i> e a morte de neurônios olfatórios maduros (canônicos e não canônicos dependentes de <i>Ric8b</i> e <i>Gaolf</i>) gera somente um aumento proporcional de neurônios TRPC2+, mantendo o número total igual.</p>
<p><i>Ric8b</i> cKO tem mais transcritos por célula TRPC2+</p>	<p>OSNc OSNc TRPC2+</p> 	<p>OSNc OSNc TRPC2+</p> 	 <p>O <i>knock-out</i> de <i>Ric8b</i> e a morte de neurônios olfatórios maduros (canônicos e não canônicos dependentes de <i>Ric8b</i> e <i>Gaolf</i>) gera alteração no nível de expressão gênica de <i>Trpc2</i>.</p>
<p><i>Ric8b</i> cKO tem mais células TRPC2+</p>	<p>OSNc OSNc TRPC2+</p> 	<p>OSNc OSNc TRPC2+ TRPC2+ TRPC2+</p> 	 <p>O <i>knock-out</i> de <i>Ric8b</i> e a morte de neurônios olfatórios maduros (canônicos e não canônicos dependentes de <i>Ric8b</i> e <i>Gaolf</i>) gera um efeito regulatório pela desorganização do tecido de tal forma que são produzidas mais células TRPC2+.</p>  <p>O <i>knock-out</i> de <i>Ric8b</i> e a morte de neurônios olfatórios maduros (canônicos e não canônicos dependentes de <i>Ric8b</i> e <i>Gaolf</i>) altera a diferenciação celular e células precursoras que dariam origem a neurônios canônicos passam a dar origem a neurônios TRPC2+.</p>

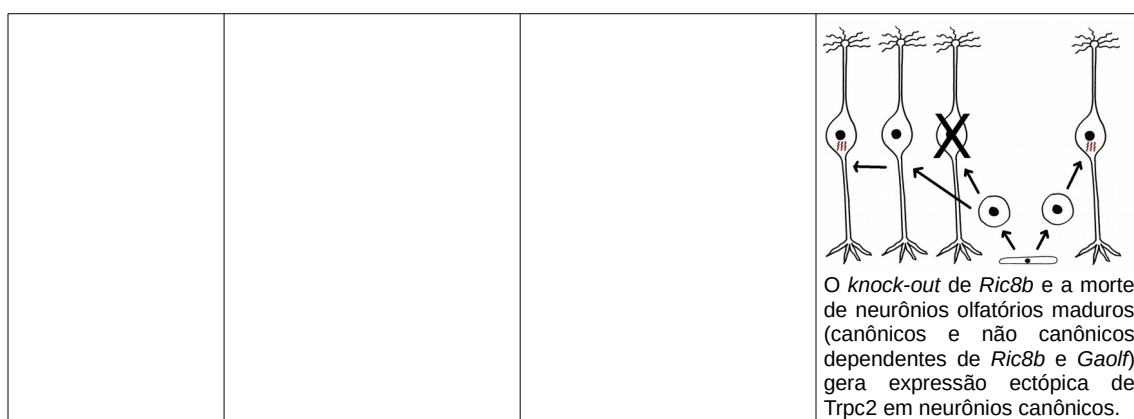


Figura 33. Esquema de hipóteses do mecanismo por trás do aumento de *Trpc2* e *Gucy1b2* no epitélio olfatório de *Ric8b* cKO.

Para verificar essas hipóteses poderia ser feito hibridização in situ para *Trpc2* e *Gucy1b2* em diversas idades diferentes, para ver se os neurônios TRPC2+ se espalham ao MOE todo a partir das regiões cul-de-sac (a partir de neurônios TRPC2+ tipo B) ou a partir de todo o tecido (a partir de neurônios TRPC2+ tipo A ou OSNs canônicos). Além disso, realizar hibridização in situ com dupla marcação para marcadores de tipos neuronais poderia ajudar a definir quais neurônios estão expressando *Trpc2* (OSNs canônicos ou neurônios TRPC2+ novos). A própria in situ com dupla marcação de *Trpc2* e *Gucy1b2* pode determinar se há mais neurônios *Trpc2*+ tipo A, tipo B ou ambos.

Essa alteração de representação de tipos neuronais no MOE é corroborada por resultados preliminares de hibridização in situ para *Trpc2* e deve gerar consequências funcionais e comportamentais complexas, e esse foi o próximo ponto que exploramos nesse trabalho.

É importante ressaltar que a alteração de população de células neuronais em um determinado tecido é um fenômeno muito interessante e complexo, que pode gerar diversas consequências funcionais e pode acontecer

no MOE de diversos tipos de animais transgênicos. Os animais KO para *Gαolf* (BELLUSCIO et al., 1998a), por exemplo, podem ter diminuição de todos os tipos celulares que dependem dessa proteína, apresentando uma alteração de populações neurais semelhante à encontrada no *Ric8b* cKO. Já animais knockout para *Cnga2* (CHEN et al., 2014) podem ter outro padrão de aumento e diminuição de neurônios no epitélio olfatório, que, nesse caso, levam a alterações de comportamento de ansiedade e depressão (CHEN et al., 2014).

5.3 CONSEQUÊNCIAS COMPORTAMENTAIS

5.3.1 Sensibilidade a CO₂ e O₂

Recentemente foram identificados neurônios não canônicos no MOE que respondem a gases, como os GC-D+ (que respondem a CO₂, KENEMUTH et al., 2013b) e os TRPC2+ tipo B (que respondem a CO, NO, H₂S e baixas concentrações de O₂, KOIKE et al., 2021; OMURA; MOMBARTS, 2014). Essas descobertas apontam para uma função do sistema olfatório de detectar a qualidade do ar inalado. Essa detecção pode ser fundamental para a sobrevivência de diversas espécies, como, por exemplo, animais que vivem em tocas, onde a concentração de CO₂ pode aumentar demasiadamente e causar dificuldade de trocas gasosas nos pulmões, assim como acúmulo de gás carbônico e falta de oxigênio para os tecidos. Detectar esses gases de uma forma direta, no sistema olfatório, pode dar uma vantagem de sobrevivência enorme para os animais.

Os neurônios não canônicos que se encontram mais diferencialmente expressos no nosso *Ric8b* cKO são os TRPC2+ tipo B (que expressam *Gucy1b2*). Sabe-se que esses neurônios respondem a CO, NO, H₂S e baixas concentrações de O₂ (KOIKE et al., 2021; OMURA; MOMBARTS, 2014), mas não se sabe se respondem a CO₂. Interessantemente, em testes (realizados em colaboração com o Prof. Tiago Moreira do ICB-USP) de tolerância a hipercapnia (altas concentrações de gás carbônico) e hipóxia (baixas concentrações de oxigênio), nossa linhagem de animais *Ric8b* cKO apresentou maior sensibilidade a hipercapnia, mas não a hipóxia. Os neurônios que são conhecidos por responder a gás carbônico são os neurônios GC-D+, que expressam a guanilato ciclase de membrana *Gucy2d*. Nesse processo, o gás carbônico difunde para dentro da célula e é convertido a HCO₃⁻, pela anidrase carbônica II. O HCO₃⁻, por sua vez, ativa a GC-D produzindo cGMP, que abre canais CNGA3, permitindo a entrada de Ca⁺², que então ativa canais de cloro, despolarizando o neurônio (HU et al., 2007b; OMURA; MOMBARTS, 2014, 2015).

Apesar da sensibilidade a CO₂ estar aumentada, os marcadores de neurônios GC-D+ não estão diferencialmente expressos. Sabe-se que os neurônios GC-D+ não são os únicos a responderem a gás carbônico, porque animais KO pra GC-D foram capazes de responder a esse gás (KENEMUTH et al., 2013). No entanto, não se sabe qual outra subpopulação de células também responde a gás carbônico. As células TRPC2+ tipo B tem algumas semelhanças com a população de neurônios GC-D+: ambos expressam guanilato ciclase (GC-D é de membrana e os neurônios TRPC2+ expressam

Gucy1b2, que é solúvel), ambos são encontrados nas regiões *cul-de-sac* do MOE (os TRPC2+ nas *cul-de-sac* mais dorsais e os GC-D+ em todas as *cul-de-sac*), ambas expressam uma CNGA (GC-D+ expressam CNGA3 e Trpc2+ expressam CNGA2). Há a possibilidade dos neurônios TRPC2+ tipo B responderem a CO₂, mas são necessários mais estudos para verificar essa hipótese.

Ao mesmo tempo, em um trabalho anterior, foi observado que os neurônios TRPC2+ do tipo B respondem a hipóxia, mas não são necessários para a resposta hiperventilatória a baixos níveis de O₂ ambiental, o que indica que esses neurônios não são necessários para as respostas respiratórias centrais (BLEYMEHL et al., 2016). Nossos ensaios preliminares corroboraram esses achados, pois a sensibilidade a hipóxia não apresentou diferença significativa nos camundongos *Ric8b* cKO. Esse dado pode parecer inicialmente contraditório ao fato dos neurônios TRPC2+ tipo B estarem aumentados no *Ric8b* cKO. Sabemos da importância de oxigênio para o funcionamento do organismo e a regulação fina da concentração de oxigênio no sangue é essencial para a vida. A regulação de oxigênio plasmático pela respiração se baseia na suposição de que o ar ambiental seja rico em oxigênio (pois ele funciona como fonte de oxigênio quando a concentração plasmática de oxigênio cai). Para que essa regulação funcione, é necessário que o ar ambiental esteja com uma quantidade mínima adequada de oxigênio. Para tal, a sensibilidade a baixas concentrações de O₂ no sistema olfatório impulsiona o comportamento de evitação a ambientes com concentração de oxigênio abaixo do mínimo necessário para o bom funcionamento da resposta respiratória.

Baseados em nossos resultados, conseguimos propor que a sensibilidade a oxigênio tenha dois níveis: um nível diretamente relacionado ao meio ambiente e a comportamento (o nível olfatório) e outro indiretamente relacionado ao meio ambiente e diretamente relacionado à fisiologia de gases no sangue (o nível central do controle respiratório).

A concentração ambiental de CO_2 também é importante, pois a concentração plasmática de CO_2 tem um efeito imediato para o corpo: altera o pH do sangue. Por isso, a concentração de CO_2 no sangue não deve passar de um certo limite. Como o CO_2 é produzido pelas células do organismo, a falta de CO_2 no ambiente não é um problema, mas o excesso de CO_2 no ambiente é. O excesso de CO_2 no organismo ocorre quando o organismo não consegue eliminar CO_2 adequadamente através da respiração. A regulação da concentração de CO_2 pela respiração funciona primariamente através da sensibilidade ao pH do sangue na zona quimiossensível do bulbo raquidiano. Quando aumenta a concentração de H^+ (que significa que aumentou a concentração de CO_2) no sangue, a zona quimiossensível estimula a zona inspiratória aumentando a ventilação alveolar, que difunde CO_2 ao ar nos alvéolos, eliminando-o e reestabelecendo o pH adequado ao sangue (controle central da respiração). Para que a regulação respiratória central da concentração de CO_2 plasmática seja eficaz, é necessário que o ambiente não tenha uma concentração muito alta de CO_2 (senão o aumento da ventilação alveolar não é suficiente para difundir CO_2 do organismo ao ambiente). Por isso, a sensibilidade olfatória ao excesso de CO_2 no ambiente é importante e deve passar por uma regulação fina. Assim como as respostas a baixas

concentrações de oxigênio, as respostas a altas concentrações de gás carbônico no ambiente também tem dois níveis: um nível olfatório, diretamente relacionado ao meio ambiente e a comportamento, e um nível central de controle respiratório, indiretamente relacionado ao meio ambiente e diretamente relacionado à fisiologia de gases no sangue (em especial ao pH do sangue).

É importante observar que o sistema olfatório não é o único a influenciar a regulação de CO_2 e O_2 do sangue, a resposta respiratória a esses estímulos não reflete diretamente a resposta dos neurônios olfatórios a esses estímulos, parece haver uma comunicação entre a sensibilidade a esses gases ambientais no sistema olfatório e os sistemas centrais de controle respiratório para a regulação desses gases no sangue. O controle da respiração no centro respiratório do bulbo raquidiano é ativado principalmente pela alteração de pH do sangue, enquanto que a sensibilidade olfatória a gases é ativada diretamente pelos gases. O controle respiratório central regula a respiração através de consequências fisiológicas do acúmulo de CO_2 no sangue. A sensibilidade a gases no sistema olfatório se ativa antes que qualquer consequência fisiológica se instale. Com isso, imaginamos que a sensibilidade olfatória a gases esteja mais relacionada com comportamentos que evitem as consequências fisiológicas (como evitar lugares com alta concentração de CO_2 ou baixa concentração de O_2), enquanto que o controle central esteja relacionado com o reequilíbrio do pH do sangue uma vez que as consequências fisiológicas já se instalaram. Pode haver algum *crosstalk* entre esses sistemas: se diminui a sinalização do olfato, o sistema central pode

compensar ficando mais sensível a altas concentrações de CO₂ (ou baixas concentrações de O₂), para evitar que a consequência fisiológica seja severa demais e cause danos.

Além disso, há outros neurônios no sistema olfatório, no GG, que tem muitas semelhanças aos neurônios GC-D+ do MOE, inclusive expressando guanilato ciclases como GC-G (ZUFALL; MUNGER, 2010). Esses neurônios inervam regiões do MOB próximas aos *necklace glomeruli* e poderiam ser uma alternativa para sensibilidade a CO₂, mas mais estudos são necessários para verificar essa hipótese. É possível que haja um *crosstalk* entre todas as estruturas mencionadas: os neurônios GC-D+ do MOE (com sensibilidade a CO₂), os neurônios TRPC2+ tipo B do MOE (com sensibilidade a O₂ e possivelmente a CO₂), os neurônios GC-G+ do GG (com possível sensibilidade a gases) e o centro de controle respiratório no bulbo raquidiano. Diversos desses neurônios respondem a mais de um tipo de estímulo e podem ser pontos iniciais de integração de sinais, mostrando haver uma relação fisiológica entre os estímulos. Além disso, seria fisiologicamente interessante que os neurônios que respondem a baixas concentrações ambientais de oxigênio se comunicassem diretamente com os neurônios que respondem a altas concentrações de gás carbônico, pela relação essencial entre esses dois gases no organismo, pois essa seria uma forma de integrar as duas informações. Ou seja, a integração de sinais de gases para o organismo pode acontecer no nível celular (dentro de um único neurônio que responde a mais de um tipo de gás), tecidual (entre neurônios que respondem a gases) e sistêmico (entre o sistema olfatório e o sistema central de controle respiratório).

É interessante saber que os genes *Trpc2* e *Gucy1b2* são pseudogenes no ser humano. Isso indica que os humanos não devem ter essa subpopulação de neurônios no MOE e as funções dessa subpopulação pode não ser tão importante para o ser humano quanto é para os camundongos. Isso faz sentido evolutivamente, porque o ser humano não vive em tocas, onde pode acontecer acúmulo de CO₂ e falta de O₂, como os camundongos vivem. Ao viver num ambiente aberto, a sensibilidade a esses gases se torna menos importante e a manutenção de neurônios que identificam esses gases se torna desnecessária. Ao mesmo tempo, a falta dessa sensibilidade não deixou de ter suas desvantagens, por exemplo, com pessoas que faleceram ao ficar com o carro ligado dentro de garagem fechada e não perceber o excesso de CO₂. A importância do olfato para o ser humano é classicamente ligada à alimentação e é sabido que anosmia traz problemas nutricionais complexos. Resta identificar como sensibilidade olfatória de populações de neurônios não canônicos, que identificam outros tipos de moléculas, que não odorantes, pode afetar o ser humano.

5.3.2 Comportamento alimentar

A fim de verificar se a alteração populacional de neurônios no MOE tem alguma consequência funcional relacionada ao olfato, analisamos o comportamento alimentar de animais WT e *Ric8b* cKO, pois é sabido que o olfato influencia a ingestão alimentar. Observamos que os animais *Ric8b* cKO comem menos do que os animais WT (mesmo quando a ingestão alimentar é normalizada pelo peso do animal), o que é o esperado para animais anósmicos

(BELLUSCIO et al., 1998a; CHEN et al., 2014), principalmente para a ração do tipo HFD (KINNEY; ANTILL, 1996). Em animais WT, ocorre preferência por HFD mediada por olfato e outros processos (ZHAO et al., 2013). No camundongo *Ric8b* cKO, apesar de sua anosmia, houve alguma preferência por HFD, pois eles apresentam uma tendência a comer mais HFD do que LFD. No WT essa diferença é mediada por um sistema olfatório íntegro, já nos *Ric8b* cKO isso parece ser mediado por um sistema olfatório com uma alteração na representação dos diferentes tipos neuronais. Interessantemente, um dos genes mais aumentados no *Ric8b* cKO é o *Npffr1*, que se sabe ser relacionado a comportamento alimentar, mais especificamente inibindo a ingestão alimentar (LIN et al., 2017). Isso indica que pode haver um sistema mais complexo de inibição alimentar que faz com que os animais *Ric8b* cKO comam menos que os animais WT.

O aumento de expressão de alguns ORs no *Ric8b* cKO indica que podem haver alguns neurônios canônicos que sobrevivem por algum tempo no MOE do cKO, gerando uma sensibilidade olfatória vestigial. Se esse for o caso, esses OSNs podem ser a causa da alteração de comportamento alimentar: os animais *Ric8b* cKO não sentem cheiros tão bem quanto o WT, fazendo com que comam menos, mas apresentam uma sensibilidade vestigial que mantém uma tendência a preferência pela ração HFD.

Um trabalho de Riera e colaboradores mostrou que animais anósmicos (camundongos mutantes para o gene *Nckx4*) comiam a mesma quantidade de ração que os animais WT, mas engordavam menos (tendo resistência a obesidade e não desenvolvendo resistência à insulina, RIERA et al., 2017). Nós

não observamos isso nos *Ric8b* cKO, os nossos animais comiam menos que os WT, como outros animais anósmicos: KO para *Gaolf*, KO para *Cngc* e KO para *Acii* (BELLUSCIO et al., 1998a; BRUNET; GOLD; NGAI, 1997; WONG et al., 2000).

6 CONCLUSÕES

A principal conclusão deste trabalho é que alteração de representação de subpopulações de neurônios no MOE gera consequências múltiplas e complexas, tanto comportamentais quanto fisiológicas. O sistema olfatório íntegro é como uma orquestra com diversos instrumentos (diversos tipos de neurônios) que precisam estar muito bem sincronizados para gerar uma música (uma resposta adequada aos sinais do meio ambiente). Quando há uma alteração na representação de certos tipos neuronais em detrimento de outros, a sensibilidade do indivíduo muda, assim como sua resposta comportamental e fisiológica aos estímulos do meio ambiente. É como uma orquestra com apenas uma parte dos instrumentos, que produz um som diferente da música original.

No *Ric8b* cKO, foi possível observar que algumas subpopulações de ORs e de neurônios não canônicos independem de Ric-8b e $G\alpha_{olf}$, de forma a terem sua representatividade no MOE relativamente aumentadas. Essa alteração de representatividade de neurônios influencia o comportamento alimentar e gera (direta e indiretamente) alterações fisiológicas de sensibilidade a CO₂ e de regulação da respiração.

A alteração de representação de tipos neuronais pode ocorrer de várias formas e observamos que até neurônios canônicos estão sujeitos a essas alterações, com subpopulações de ORs aumentadas por diversas razões (como ativação neural ou maturação dos OSNs). As alterações de representação de subpopulações de neurônios canônicos e não canônicos são

complexas e podem gerar consequências ainda mais complexas em sensibilidade, comportamento e fisiologia. É interessante notar que é possível que isso aconteça, inclusive, em humanos. A anosmia humana (por exemplo, causada por COVID-19) raramente é completa, no geral sendo uma hiposmia seletiva (ZAZHYTSKA et al., 2021). Isso indica que certas subpopulações de neurônios no MOE devem ter sido afetadas mais intensamente do que outras, gerando um indivíduo com alteração de representação de subpopulações de neurônios no MOE. Em humanos, anosmia pode ser o primeiro sintoma de doenças neurodegenerativas (BOESVELDT; DE GRAAF, 2017) e anosmia e hiposmia tendem a ser seguida de parosmia (identificar um cheiro incorretamente) durante o período de recuperação, que pode durar anos (LIU et al., 2021). A recuperação de anosmia tende a durar anos porque há alterações distais (nos OSNs) e centrais (no processamento olfatório) a corrigir. Isso tudo indica a complexidade do sistema olfatório e sua importância para a saúde humana.

Como conclusões secundárias, baseado nos achados desse trabalho, concluímos que a proteína RIC8B deve ter diversas funções ainda desconhecidas, em especial sua variante RIC8B Δ 9, e principalmente relacionadas ao núcleo e ao citoesqueleto de neurônios olfatórios. Concluímos também que o nosso modelo de *Ric8b* cKO representa um bom modelo para estudar as subpopulações de neurônios não canônicos TRPC2+ tipo B. Além disso, o nosso modelo pode ser interessante para estudar a comunicação entre diferentes circuitos do comportamento e da fisiologia.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- AGMO, A.; SNOEREN, E. M. S. A cooperative function for multisensory stimuli in the induction of approach behavior of a potential mate. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, 2017.
- ANTUNES, G.; SIMOES DE SOUZA, F. M. Olfactory receptor signaling. **Methods in cell biology**, v. 132, p. 127–145, 2016.
- ARAKAWA, H. et al. The receptor guanylyl cyclase type D (GC-D) ligand uroguanylin promotes the acquisition of food preferences in mice. **Chemical senses**, v. 38, n. 5, p. 391–397, jun. 2013.
- BEAR, D. M. A Variant Mode of Mammalian Olfaction. **Doctoral dissertation**, 2017.
- BELLUSCIO, L. et al. Mice deficient in G(olf) are anosmic. **Neuron**, v. 20, n. 1, p. 69–81, 1998a.
- BELLUSCIO, L. et al. Mice Deficient in Golf Are Anosmic. **Neuron**, v. 20, n. 1, p. 69–81, 1 jan. 1998b.
- BLEYMEHL, K. et al. A Sensor for Low Environmental Oxygen in the Mouse Main Olfactory Epithelium. **Neuron**, v. 92, n. 6, p. 1196–1203, 21 dez. 2016.
- BOESVELDT, S.; DE GRAAF, K. The Differential Role of Smell and Taste For Eating Behavior. **Perception**, v. 46, n. 3–4, p. 307–319, 1 mar. 2017.
- BOS, J.; REHMANN, H.; WITTINGHOFER, A. GEFs and GAPs : Critical Elements in the Control of Small G Proteins. **Cell**, p. 865–877, 2007.
- BRANN, J. H.; FIRESTEIN, S. J. A lifetime of neurogenesis in the olfactory system. n. 8 JUN, p. 182, 2014.
- BRUNET, L. J.; GOLD, G. H.; NGAI, J. General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel Brunet, L.J., Gold, G.H. and Ngai, J. **Neuron** 17, 681–693 . **Trends in Genetics**, v. 13, n. 3, p. 97, 1997.
- BUCK, L.; AXEL, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. **Cell**, v. 65, n. 1, p. 175–187, 1991.
- BUCK, L. B. Information Coding in the Vertebrate Olfactory System. **Annual Review of Neuroscience**, v. 19, n. 1, p. 517–544, mar. 1996.
- CALOF, A. L. et al. Neurogenesis and cell death in olfactory epithelium. **Journal of Neurobiology**, v. 30, n. 1, p. 67–81, maio 1996.

- CHAO, Y. Y.-C. et al. Receptor guanylyl cyclase-G is a novel thermosensory protein activated by cool temperatures. v. 34, n. 3, 3 fev. 2015.
- CHEN, Y. et al. Anxiety- and depressive-like behaviors in olfactory deficient Cnga2 knockout mice. **Behavioural brain research**, v. 275, p. 219–224, 5 dez. 2014.
- COCKERHAM, R. E. et al. An Olfactory Subsystem that Detects Carbon Disulfide and Mediates Food-Related Social Learning. **Current Biology**, v. 20, n. 16, p. 1438–1444, 24 ago. 2010.
- COCKERHAM, R. E.; MARGOLIS, F. L.; MUNGER, S. D. Afferent activity to necklace glomeruli is dependent on external stimuli. **BMC Research Notes**, v. 2, p. 1–5, 2009.
- DAVID, N. B. et al. Drosophila Ric-8 regulates G α i cortical localization to promote G α i-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. **Nature Cell Biology** 2005 7:11, v. 7, n. 11, p. 1083–1090, 16 out. 2005.
- DAVILA, J. I. et al. Impact of RNA degradation on fusion detection by RNA-seq. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2016.
- DULAC, C. Sensory coding of pheromone signals in mammals. **Current opinion in neurobiology**, v. 10, n. 4, p. 511–518, 1 ago. 2000.
- FEINSTEIN, P. et al. Axon guidance of mouse olfactory sensory neurons by odorant receptors and the β 2 adrenergic receptor. **Cell**, v. 117, n. 6, p. 833–846, 2004.
- FISCHL, A. M. et al. Activity-Dependent Genes in Mouse Olfactory Sensory Neurons. v. 39, n. 5, 2014.
- FUSS, S.; ÇELIK, A.; DESPLAN, C. Olfactory identity kicked up a NOTCH. **Nature Neuroscience** 2007 10:2, v. 10, n. 2, p. 138–140, fev. 2007.
- GABAY, M. et al. Ric-8 Proteins Are Molecular Chaperones That Direct Nascent G Protein Subunit Membrane Association. **Science Signaling**, v. 4, n. 200, p. ra79–ra79, 22 nov. 2011.
- GALLEGO ROMERO, I. et al. RNA-seq: Impact of RNA degradation on transcript quantification. **BMC Biology**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2014.
- GODFREY, P. A. et al. The mouse olfactory receptor gene family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 7, p. 2156–61, 2004.
- GONZALEZ-TERRAZAS, T. P. et al. Finding flowers in the dark: nectar-feeding bats integrate olfaction and echolocation while foraging for nectar. **Royal Society Open Science**, v. 3, n. 8, p. 160199, 2016.

GREER, P. L. et al. A Family of non-GPCR Chemosensors Defines an Alternative Logic for Mammalian Olfaction. **Cell**, v. 165, n. 7, p. 1734–1748, 2016.

HANCHATE, N. K. et al. Single-cell transcriptomics reveals receptor transformations during olfactory neurogenesis. **Science**, v. 350, n. 6265, p. 1251–1255, 4 dez. 2015.

HAUACHE, O. M. Receptores acoplados à proteína G: implicações para a fisiologia e doenças endócrinas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 3, p. 228–239, 2001.

HU, J. et al. Detection of near-atmospheric concentrations of CO₂ by an olfactory subsystem in the mouse. **Science**, v. 317, n. 5840, p. 953–957, 17 ago. 2007.

IKEGAMI, K. et al. **Olfactory receptor accessory proteins play crucial roles in receptor function and gene choice** *Life*, 2017.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. **Principles of Neural Science**. [s.l.: s.n.]. v. 4

KARNOŠOVÁ, A. et al. Palmitoylation of Prolactin-Releasing Peptide Increased Affinity for and Activation of the GPR10, NPFF-R2 and NPFF-R1 Receptors: In Vitro Study. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 16, 2 ago. 2021.

KECK, K. M.; PEMBERTON, L. F. **Histone chaperones link histone nuclear import and chromatin assembly** *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 2012.

KELLIHER, K. R.; MUNGER, S. D. Chemostimuli for guanylyl cyclase-D-expressing olfactory sensory neurons promote the acquisition of preferences for foods adulterated with the rodenticide warfarin. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. JUL, p. 1–7, 2015.

KENEMUTH, J. K. et al. Investigation of nasal CO₂ receptor transduction mechanisms in wild-Type and GC-D knockout mice. **Chemical Senses**, v. 38, n. 9, p. 769–781, nov. 2013.

KERR, D. S. et al. Ric-8B interacts with G α olf and G γ 13 and co-localizes with G α olf, G β 1 and G γ 13 in the cilia of olfactory sensory neurons. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 38, n. 3, p. 341–348, 2008.

KIDA, H. et al. Vapor detection and discrimination with a panel of odorant receptors. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 4556, 2018.

KINNEY, N. E.; ANTILL, R. W. Role of olfaction in the formation of preference for high-fat foods in mice. **Physiology & behavior**, v. 59, n. 3, p. 475–478, 1996.

KLATTENHOFF, C. et al. Human brain synembryon interacts with G α s and G α q and is translocated to the plasma membrane in response to isoproterenol and carbachol. **Journal of Cellular Physiology**, v. 195, n. 2, p. 151–157, maio 2003.

KOIKE, K. et al. Danger perception and stress response through an olfactory sensor for the bacterial metabolite hydrogen sulfide. **Neuron**, v. 109, n. 15, p. 2469-2484.e7, 4 ago. 2021.

KROLEWSKI, R. C. et al. A Group of Olfactory Receptor Alleles that Encode Full Length Proteins are Down-Regulated as Olfactory Sensory Neurons Mature. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020.

KURIAN, S. M. et al. Odor coding in the mammalian olfactory epithelium. **Cell and tissue research**, v. 383, n. 1, p. 445–456, 1 jan. 2021.

KURTENBACH, S. et al. The BEACH Protein LRBA Promotes the Localization of the Heterotrimeric G-protein G_{olf} to Olfactory Cilia. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

LEME SILVA, A. G. et al. Genetic Background Effects on the Expression of an Odorant Receptor Gene. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 15, 25 fev. 2021.

LI, F. et al. Heterotrimeric G Protein Subunit G₁₃ Is Critical to Olfaction. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 18, p. 7975–7984, 2013.

LIBERLES, S. D.; BUCK, L. B. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. **Nature**, v. 442, n. 7103, p. 645–650, 10 ago. 2006.

LIN, Y. T. et al. NPFFR2 activates the HPA axis and induces anxiogenic effects in rodents. **International Journal of Molecular Sciences**, 2017.

LIU, D. T. et al. Parosmia is Associated with Relevant Olfactory Recovery After Olfactory Training. **The Laryngoscope**, v. 131, n. 3, p. 618–623, 1 mar. 2021.

LOMVARDAS, S. et al. Interchromosomal Interactions and Olfactory Receptor Choice. **Cell**, v. 126, n. 2, p. 403–413, 28 jul. 2006.

MA, M. et al. Olfactory signal transduction in the mouse septal organ. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 317–324, 1 jan. 2003.

MACHADO, C. F. et al. Conditional deletion of Ric-8b in olfactory sensory neurons leads to olfactory impairment. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 37, n. 50, p. 12202–12213, 2017.

MALNIC, B. et al. Combinatorial receptor codes for odors. **Cell**, v. 96, n. 5, p. 713–723, 5 mar. 1999.

MALNIC, B.; GODFREY, P. A.; BUCK, L. B. The human olfactory receptor gene family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 8, p. 2584–9, 2004.

- MALNIC, B.; MERCADANTE, A. F. F. The odorant signaling pathway. **Annual Review of Biomedical Sciences**, v. 11, 4 mar. 2009.
- MILLER, K. G. et al. RIC-8 (Synembryn): a novel conserved protein that is required for G(q)alpha signaling in the *C. elegans* nervous system. **Neuron**, v. 27, n. 2, p. 289–99, ago. 2000.
- MILLIGAN, G.; KOSTENIS, E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. SUPPL. 1, p. S46–S55, 2 fev. 2006.
- MUNGER, S. D.; LEINDERS-ZUFALL, T.; ZUFALL, F. Subsystem Organization of the Mammalian Sense of Smell. **Annual Review of Physiology**, v. 71, n. 1, p. 115–140, 2008.
- NAGAI, M. H. et al. Depletion of Ric-8B leads to reduced mTORC2 activity. **PLOS Genetics**, v. 16, n. 5, p. e1008255, 1 maio 2020.
- NAKAHARA, T. S. et al. Peripheral oxytocin injection modulates vomeronasal sensory activity and reduces pup-directed aggression in male mice. **SCIENTIFIC REPORTS**, v. 10, n. 1, NOV 17 2020.
- NGAL, J. et al. The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish. **Cell**, v. 72, n. 5, p. 657–666, 12 mar. 1993.
- NIIMURA, Y.; MATSUI, A.; TOUHARA, K. Extreme expansion of the olfactory receptor gene repertoire in African elephants and evolutionary dynamics of orthologous gene groups in 13 placental mammals. **Genome research**, v. 24, n. 9, p. 1485–1496, 1 set. 2014.
- OMURA, M.; MOMBAERTS, P. Trpc2-Expressing Sensory Neurons in the Main Olfactory Epithelium of the Mouse. **Cell Reports**, v. 8, n. 2, p. 583–595, 2014.
- OMURA, M.; MOMBAERTS, P. Trpc2-expressing sensory neurons in the mouse main olfactory epithelium of type B express the soluble guanylate cyclase Gucy1b2. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 65, p. 114–124, 2015.
- OSTERLOH, S. et al. Identification of a Novel Gnao-Mediated Alternate Olfactory Signaling Pathway in Murine OSNs. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, n. March, p. 1–11, 2016.
- PFISTERER, U.; KHODOSEVICH, K. Neuronal survival in the brain: Neuron type-specific mechanisms. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 3, p. e2643-14, 2 mar. 2017.
- PIFFERI, S.; MENINI, A.; KURAHASHI, T. Signal Transduction in Vertebrate Olfactory Cilia. **The Neurobiology of Olfaction**, p. 203–224, 2009.
- PORTRAN, D. et al. Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. **Nature cell biology**, v. 19, n. 4, p. 391–398, 2017.

- RESSLER, K. J.; SULLIVAN, S. L.; BUCK, L. B. A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. **Cell**, v. 73, n. 3, p. 597–609, 7 maio 1993.
- RIERA, C. E. et al. The Sense of Smell Impacts Metabolic Health and Obesity. **Cell Metabolism**, 2017.
- RIVERA, C. et al. Methylation of histone H3 lysine 9 occurs during translation. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 19, p. 9097–9106, 2015.
- SANCHEZ, A. D.; FELDMAN, J. L. Microtubule-organizing centers: from the centrosome to non-centrosomal sites. **Current opinion in cell biology**, v. 44, p. 93–101, 1 fev. 2017.
- SARAIVA, L. R. et al. Hierarchical deconstruction of mouse olfactory sensory neurons: from whole mucosa to single-cell RNA-seq. v. 5, n. 1, p. 1–17, 16 dez. 2015.
- SCHROEDER, A. et al. The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Molecular Biology**, v. 7, p. 1–14, 2006.
- SCOTT, K. **Out of thin air: Sensory detection of oxygen and carbon dioxide** *Neuron*, 2011.
- SEGURA, M. L. R. T. et al. A 3D transcriptomics atlas of the mouse olfactory mucosa. **bioRxiv**, p. 2021.06.16.448475, 13 ago. 2021.
- SERIZAWA, S. et al. Negative Feedback Regulation Ensures the One Receptor-One Olfactory Neuron Rule in Mouse. **Science**, v. 302, n. 5653, p. 2088–2094, 19 dez. 2003.
- SINGH, K. et al. The combined impact of IgLON family proteins Lsamp and Neurotrimin on developing neurons and behavioral profiles in mouse. **Brain research bulletin**, v. 140, p. 5–18, 1 jun. 2018.
- SMITH, T. D.; BHATNAGAR, K. P. Anatomy of the olfactory system. **Handbook of clinical neurology**, v. 164, p. 17–28, 1 jan. 2019.
- SUN, L. et al. Guanylyl cyclase-D in the olfactory CO₂ neurons is activated by bicarbonate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 6, p. 2041–2046, 10 fev. 2009.
- SZYK, A. et al. Molecular basis for age-dependent microtubule acetylation by tubulin acetyltransferase. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1405–1415, 5 jun. 2014.
- TALL, G. G.; GILMAN, A. G. Resistance to inhibitors of cholinesterase 8A catalyzes release of Galphai-GTP and nuclear mitotic apparatus protein (NuMA) from NuMA/LGN/Galphai-GDP complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2005.

- TALL, G. G.; KRUMINS, A. M.; GILMAN, A. G. Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric G α protein guanine nucleotide exchange factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8356–8362, 7 mar. 2003.
- TAN, K. et al. The role of the nmd factor *upf3b* in olfactory sensory neurons. **eLife**, v. 9, p. 1–29, 2020.
- TAN, L.; LI, Q.; XIE, X. S. Olfactory sensory neurons transiently express multiple olfactory receptors during development. **Molecular Systems Biology**, v. 11, n. 12, p. 844, 1 dez. 2015.
- VAN DER LINDEN, C. J. et al. Olfactory Stimulation Regulates the Birth of Neurons That Express Specific Odorant Receptors. **Cell Reports**, v. 33, n. 1, p. 108210, 2020.
- VASSAR, R.; NGAI, J.; AXEL, R. Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. **Cell**, v. 74, n. 2, p. 309–318, 30 jul. 1993.
- VEDIN, V. et al. Regional differences in olfactory epithelial homeostasis in the adult mouse. **The Journal of comparative neurology**, v. 513, n. 4, p. 375–384, 1 abr. 2009.
- VIHANI, A. et al. Semiochemical responsive olfactory sensory neurons are sexually dimorphic and plastic. **eLife**, p. 1–29, 2019.
- VON DANNECKER, L. E. C. Ric-8B, an Olfactory Putative GTP Exchange Factor, Amplifies Signal Transduction through the Olfactory-Specific G-Protein G α olf. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 15, p. 3793–3800, 13 abr. 2005.
- VON DANNECKER, L. E. C.; MERCADANTE, A. F.; MALNIC, B. Ric-8B promotes functional expression of odorant receptors. **PNAS**, v. 103, n. 24, p. 9310–9314, 13 jun. 2006.
- WATT, W. C. et al. Odorant stimulation enhances survival of olfactory sensory neurons via MAPK and CREB. **Neuron**, v. 41, n. 6, p. 955–967, 25 mar. 2004.
- WEILER, E.; FARBMAN, A. I. The septal organ of the rat during postnatal development. **Chemical Senses**, v. 28, n. 7, p. 581–593, 1 set. 2003.
- WIKE, C. L. et al. Excess free histone H3 localizes to centrosomes for proteasome-mediated degradation during mitosis in metazoans. **Cell Cycle**, v. 15, n. 16, p. 2216–2225, 2016.
- WONG, S. T. et al. Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. **Neuron**, v. 27, n. 3, p. 487–497, 2000.
- WOODARD, G. E. et al. Ric-8A and G α Recruit LGN, NuMA, and Dynein to the Cell Cortex To Help Orient the Mitotic Spindle. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, n. 14, p. 3519–3530, 15 jul. 2010.

XAVIER, A. M. et al. CD36 is expressed in a defined subpopulation of neurons in the olfactory epithelium. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–15, 2016.

XU, Z. et al. Microtubules acquire resistance from mechanical breakage through intraluminal acetylation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 356, n. 6335, p. 328–332, 21 abr. 2017.

ZARZO, M. Relevant psychological dimensions in the perceptual space of perfumery odors. **Food Quality and Preference**, 2008.

ZAZHYTSKA, M. et al. Disruption of nuclear architecture as a cause of COVID-19 induced anosmia. [s.d.].

ZHAO, S. et al. Activity-Dependent Modulation of Odorant Receptor Gene Expression in the Mouse Olfactory Epithelium. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–9, 2013.

ZUFALL, F. Receptor guanylyl cyclases in mammalian olfaction: from genes to function. **BMC Pharmacology**, 2009.

ZUFALL, F.; KELLIHER, K. R.; LEINDERS-ZUFALL, T. Pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. **Microscopy research and technique**, v. 58, n. 3, p. 251–260, 1 ago. 2002.

ZUFALL, F.; MUNGER, S. D. Receptor guanylyl cyclases in mammalian olfactory function. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 334, n. 1–2, p. 191–197, 2010.