

II TRAINNING PROGRAM IN NEUROSCIENCE

during II WORKSHOP ON METABOLIC DISORDERS & II SYMPOSIUM ON METABOLIC PROGRAMMING AND FETAL OUTCOME

CENTRO DE PESQUISA EM PROGRAMAÇÃO METABÓLICA E MANEJO PERINATAL

Organização:

Adriana Torsoni - Coordenadora do evento Kelly P. Coca - Comissão Científica Mina Desai - Comissão Científica Michael Ross - Comissão Científica Marciane Milanski - Comissão Organizadora Marcio Torsoni - Comissão Organizadora Letícia Ignácio-Souza - Comissão Organizadora Instrutores: Nilton José dos Santos - nilton.unesp@gmail.com Gabriela Pandini Silote - gabrielasilote@gmail.com Beatriz Franco - beafranco15@hotmail.com Lais A. Simino - lsimino@unicamp.br Mayara N. Baqueiro baqueiromayara@gmail.com Beatriz Piatezzi Sigueira - biapiatezzi@gmail.com Prof. David Garcia Galiano – University of Cordoba Prof. Rodrigo Rorato – Unifesp

SUMÁRIO

1. Primer design for PCR	03
2. Behavioral tests in animals	18
3. Imunofluorescência em tecido	26
4. Genetically Modified Organisms (GMO)	42
5. Stereotaxic surgery	48



1. Primer design for PCR

Nilton José dos Santos

Using of NCBI tools – Primer-BLAST (Pick Primers) and BLAST[®]

Introduction

The National Center for Biotechnology Information (NCBI) as a division of the National Library of Medicine (NLM) at the National Institutes of Health (NIH) advances science and health by providing access to biomedical and genomic information. As a national resource for molecular biology information, NCBI's mission is to develop new information technologies to aid in the understanding of fundamental molecular and genetic processes that control health and disease. More specifically, the NCBI has been charged with creating automated systems for storing and analyzing knowledge about molecular biology, biochemistry, and genetics; facilitating the use of such databases and software by the research and medical community; coordinating efforts to gather biotechnology information both nationally and internationally; and performing research into advanced methods of computer-based information processing for analyzing the structure and function of biologically important molecules.

In the NCBI platform you can submit data or manuscript into NCBI databases, download data to your computer, analyze wide variety of data analysis tools that allow users to manipulate, align, visualize, and evaluate biological data, etc.

Aims: This tutorial aims to show and detail step by step how the design of specific oligonucleotide sequences (primers) for PCR is carried out using the NCBI tools.

For this we will follow the steps below:

1º STEP

Access the NCBI homepage: <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</u>

In "All Databases" select the option "Gene"



	onal Library of N Center for Biotechnology	Medicine Information			Log in
	All Databases V	-			Search
	Assembly				
NCBI Home	Biocollections BioProject	NCBI			Popular Resources
Resource List (A-Z)	BioSample	ter for Biotechno	logy Information advances science an	PubMed	
All Resources	Books	enomic information	00.	a needed by promoting decess to	Bookshelf
Chemicals & Bioassays	Conserved Domains	II I Mission I Orga		PubMed Central	
Data & Software	dbGaP dbVar	a i analonina i ana gin			BLAST
DNA & RNA	Gene	Ibmit	Download	Learn	Nucleotide
Domains & Structures	Genome	r manuscripts	Transfer NCBI data to your	Find help documents, attend a	Genome
Genes & Expression	GEO DataSets GEO Profiles	bases	computer	class or watch a tutorial	SNP
Genetics & Medicine	GTR				Gene
Genomes & Maps	HomoloGene				Protein
Homology	MedGen	T.			PubChem
Literature	MeSH				
Proteins	NLM Catalog	2			NCBI News & Blog
Sequence Analysis	D	evelop	Analyze	Pesaarch	NCBI Hidden Markov Models (HMM)
Taxonomy	Line MODILAT	evelop	Identify an NCRI test formation	Fueles NCPI seasch and	Release 12.0 Now Available!
Training & Tutorials	libraries to bu	uild applications	data analysis task	collaborative projects	Release 12.0 of the NCBI protein profile Hidden Markov models (HMMs) used hv

Type the gene of interest in the search bar.

The homepage is presented in English, apparently simple and explicitly contains all the tools, databases, articles, information, and others.

Note: Specifically for primer design we used the Primers-BLAST database. However, we need a target sequence in FASTA format or an accession number of a nucleotide sequence. Through the NCBI website we will be able to find the accession number of the mRNA reference sequence.

2º STEP

Select the gene corresponding to your study species.

Example:

Gene of interest: Interleukin 6 (IL-6) – [Homo sapiens (human)] or [Mus musculus (house mouse)] or [Rattus norvegicus (Norway rat)].

Click on the "Gene ID" number corresponding to the species.



NIH Nation	ional L al Center fo	ibrary of I or Biotechnology	Medicine Information					Log in
Gene	Gene	✓ Interle Create	eukin 6 RSS Save search Advance	d			Search	Help
Gene sources Genomic		Tabular + 20 per	page + Sort by Relevance +	the Cane database	0	Send to: +	Filters: Manage Filters	Hide sidebar >>
Atternatively spliced Annotated genes Non-coding Protein-coding Pseudogene Sequence content		Search result Items: 1 to 20 o	IS If 5021 Escontinued or replaced items.	< fail	<prev 1="" 252="" next<="" of="" page="" td=""><td>> Last >></td><td>Results by taxon Top Organisms [Tree] Homo saplens (499) Mus musculus (348) Rattus norvegicus (303) Bos taurus (44) Sure screen (33)</td><td>۲</td></prev>	> Last >>	Results by taxon Top Organisms [Tree] Homo saplens (499) Mus musculus (348) Rattus norvegicus (303) Bos taurus (44) Sure screen (33)	۲
CCDS. Ensembl		Name/Gene ID	Description	Location	Allases	MIM	All other taxa (3794)	
RefSeq RefSeqGene		D IL6R ID: 3570	interleukin 6 receptor [Homo sapiens (human)]	Chromosome 1, NC_000001.11 (154405343154469450)	CD126, HIES5, IL-1Ra, IL- 6R, IL-6R-1, IL-6RA, IL6Q,	147880	More	
Status V Current	clear	D 11.6	interleukin 6 [Gallus gallus (chicken)]	Chromosome 2, NC_052533.1 (3077135330774770)	CHIL-6, IL-6, interleukin-6		Find related data Database: Select	~
EN dditional filters		D 11_6 10: 3569	interleukin 6 [Homo sapiens (human)]	Chromosome 7, NC_000007.14 (22727200_22731998)	BSF-2, BSF2, CDF, HGF, HSF, IFN-beta-2, IFNB2, IL-6	147620		
		D: 16193	interleukin 6 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Chromosome 5, NC_000071.7 (3021811230224973)	II-6		Search details	۲

The page will generate general information about your gene, charts, generelated articles etc.

Look at the bottom of the page for the tab "NCBI - Reference sequences (Ref-Seq)".

In the "**mRNA and Protein(s)**" option, identify the isoform of interest (if applicable). Two links will be available on this tab. One for the **NM** platform – which is RNA-specific and one for the NP platform, which is protein-specific.

CLICK on **NM**.



* NCBI R	eference Sequences (F	(efSeq)	* ?
NEW Try	the new <u>Transcript table</u>		
Ref Seqs	maintained independen	tly of Annotated Genomes	
These r	eference sequences exist	independently of genome builds. Explain	
Geno	mic		
1.	NG_011640.1 RefSeqG	ene	
	Range Download	50549852 GenBank, FASTA, Sequence Viewer (Graphics)	
mRN	A and Protein(s)		
1.	<u>NM_000600.5</u> → <u>NP_00</u>	0591.1 interleukin-6 isoform 1 precursor	
	See identical proteins	and their annotated locations for NP_000591.1	
	Status: REVIEWED		
	Description Source sequence(s) Consensus CDS	Transcript Variant: This variant (1) represents the longer transcript and encodes the longer isoform (1). <u>AK301141, BC015511</u> <u>CCDS5375.1</u>	
EN)	UniProtKB/Swiss-Prot UniProtKB/TrEMBL Related	P05231, Q9UCU4 B4DVM1, Q75MH2 ENSP00000258743.5, ENST00000258743.10	
	Conserved Domains (1) su	mmary	

Note: The mRNA reference sequence accession number that we will be using in the Primer-BLAST platform is NM 000600.5 for the Interleukin 6 gene. This code can be pasted directly into the Primer Blast copied and platform at https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ in "Enter accession, gi, or FASTA sequence". However, as we carry out gene research on the NCBI platform, we can acquire the primers directly.

4º STEP

After clicking on the NM referring to the mRNA of interest, a page will open containing all the information regarding the nucleotides, gene sequences, amounts of base pairs (bp), where it was published, the nucleotide sequence of a given gene, genome, DNA, primer will appear etc. With the data presented, you will be able to use them for various purposes, such as primer designs, identification of genomic sequences of interest, gene products and primer specificity, through software line contained in the site itself.

To design the primers of interest, a simple process will be used, mediated by the "**Pick Primer**" option.



Select the "**Pick Primers**" tab in the "**Analyse this sequence**" section on the right side of the screen.

NIH	NIH National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information					
Nucleotide	e Nucleotide V		Search	Helo		
GenBank + Homo s	apiens interleukin 6 (IL6), transcript va	Send to: +	Change region shown Customize view	•		
FASTA Gra	phics		Analyze this sequence Run BLAST			
LOCUS DEFINITION ACCESSION	NM_000600 1127 bp mRNA linear PRI Homo sapiens interleukin 6 (IL6), transcript variant 1, NM_000600	Design and test primers for this sequence using Primer- BLAST.	Pick Primers Highlight Sequence Features			
VERSION KEYWORDS SOURCE ORGANISM	NM_DBDGGD-5 RefSeq: WANE Select. Homo sapiens (human) <u>Homo sapiens</u> Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Eute	leostomi;	Find in this Sequence Show in Genome Data Viewer			
REFERENCE AUTHORS TITLE	Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrh Catarrhin; Hominidae; Homo. 1 (bases 1 to 1127) Ghazy AA. Influence of IL-6 rs1800795 and IL-8 rs2227306 polymorph	ini; isms on	Articles about the IL6 gene Secretory Phospholipase A2 and Int Levels as Predictive Markers [Int J]	terleukin-6 Mol Sci. 2023]		

5º STEP

Write down the reference code that appears in the text box.

Example: For the IL6 gene, the Refseq code is NM_000600.5.

Primer-BLAST	A tool for finding specific primers
	Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).
Primers for target on one template	Primers common for a group of sequences
PCR Template Enter accession, gi, or FASTA sequence (A re NM_000600.5 Or, upload FASTA file Escolhe	Retrieve recent results Publication Tips for finding specific primers efseq record is preferred)

6º STEP

The page will present a form for entering data regarding the desired parameters, gene sequences, product size and ideal temperature.

Check all the information on the form.



Check that in the organism tab, the code refers to your model.

For a better selection of primers, some filters can be applied following the parameters.

• **PCR Product Size:** 50 – 150;

You can also choose the number of primers you want to find ("# of primers to return"). Eg: 10.

Primer melting temperatures (T_m): 58 - 60 - 62 - 3;

The ideal temperature for annealing ("*Primer melting temperatures*") was defined above, but generally the temperature pre-configured by the application remains. Since the temperature of primer 1 and primer 2 (reverse) must be similar, or with a maximum difference of 3°C.

Exon junction span: Primer must Span an exon-exon junction*

At the end of the page click on "Advanced parameters" and change the parameters in:

- **Prime Size:** 19 20 22
- Primer CG content (%): Min: 30.0 Max: 55.0

Note: Ideally, the region of the chosen primer amplifies exons from different regions to avoid amplification errors.

* If the regions of interest are not selected in the "*Exon Junction Span*" tab, it may be that a contaminated DNA is also amplified. The option "*Primer must span an exon-exon junction*" will direct the program to return at least one primer (within a given primer pair) that spans an exon-exon junction. This is useful for limiting the amplification only to mRNA. You can also exclude such primers if you want to amplify mRNA as well as the corresponding genomic DNA.



If no primer is found change this item to "No Preference".

7º STEP

After changing the settings as described above, click on "Get Primers"

Wait for the page to generate the data (it may take a while).

Select genes according to their efficiency, normally the first is the best.

The best primers will be shown in order from 1 to 10 (according to the stipulated quantity), and we must pay attention to some information:

Check the "Self 3' complementarity" of the other primers, ideally between 2-3.

Product length

Length - Primer size

T_m: Optimum temperature (Maximum variation: 3°C)

CG% - Amount of Guanine (G) and Cytosine (C) bases in percentage (40 - 60% desirable), as they make the tape more stable, requiring high temperatures to dissociate the base pairs.

Select the best primer and copy the "Forward Primer" and "Reverse primer" sequences to assemble the spreadsheet or document (.doc).

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGAGGCACTGGCAGAAAACA	Plus	20	309	328	59.82	50.00	5.00	0.00
Reverse primer	TCACCAGGCAAGTCTCCTCA	Minus	20	403	384	60.47	55.00	3.00	1.00
Product length	95								
Exon junction	387/388 (reverse primer) on templ	ate NM_000600.5							
Products on inten >XM_054358146.1	ded targets PREDICTED: Homo sapiens interleukir	n 6 (IL6), transcript variant 3	(2, mRNA						
Products on inten >XM_054358146.1	ded targets PREDICTED: Homo sapiens interleukir = 95	n 6 (IL6), transcript variant 3	(2, mRNA						
Products on inten >XM_054358146.1 product length Forward primer	ded targets PREDICTED: Homo sapiens interleukir = 95 1 AGAGGCACTGGCAGAAAACA	n 6 (IL6), transcript variant) 20	(2, mRNA						
Products on inten >XM_054358146.1 product length Forward primer Template	ded targets PREDICTED: Homo sapiens interleukir = 95 1 AGAGGCACTGGCAGAAAACA 1188	n 6 (IL6), transcript variant 3 20 1207	(2, mRNA						
Products on inten >XM_054358146.1 product length Forward primer Template Reverse primer	ded targets PREDICTED: Homo sapiens interleukir 95 1 AGAGGCACTGGCAGAAAACA 1188	6 (IL6), transcript variant 3 20 1207 20	(2, mRNA						



Using the BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

The BLAST finds regions of local similarity between sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance of matches. BLAST can be used to infer functional and evolutionary relationships between sequences as well as help identify members of gene families.

Here we will use BLAST only for *in silico* specificity testing and compare the previously designed nucleotide sequence (primer) with the database, in which we will obtain the function, associated species, etc.

Aims: Learn to use part of the BLAST tool to test the specificity of previously created primers.

1º STEP

Again, go to the NCBI home page - <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</u>

Click on BLAST located on the right side.

	ibrary of Medicine or Biotechnology Information			Log in
All Data	abases 🗸			Search
NCBI Home	Welcome to NCBI			Popular Resources
Resource List (A-Z)	The National Center for Biotechnol	ogy Information advances science an	d health by providing access to	PubMed
All Resources	biomedical and genomic informatio		Bookshelf	
Chemicals & Bioassays	About the NCBI Mission Organ		PubMed Central	
Data & Software				BLAST
DNA & RNA	Submit	Download	Learn	Nucleotide
Domains & Structures	Deposit data or manuscripts	Transfer NCBI data to your	Find help documents, attend a	Genome
Genes & Expression	into NCBI databases	computer	class or watch a tutorial	SNP
Genetics & Medicine		_		Gene
Genomes & Maps				Protein
Homology	Т			PubChem
Literature				
Proteins				NCBI News & Blog
Sequence Analysis	Davalan	Analyza	Baaaarah	NCBI Hidden Markov Models (HMM)
Taxonomy	Use NCBLAPIs and code	Identify an NCBI tool for your	Explore NCBL research and	Release 12.0 Now Available! 24 Apr 2023

2º STEP



Upon entering BLAST, there will be a simple page, with several links, and a set of specific links for in silico testing of specificity of several products.

When observing the BLAST tool area, there will be several options of software line for analysis.

Nucleotide BLAST – DNA sequences.

Protein BLAST – Protein sequences.

Blastx and Tblastn – DNA sequence and its protein product (protein) and protein sequence and DNA sequence.

BLAST®	Home Recent Results Saved Strategies Help
Basic Local Alignment Search Tool BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance. Learn more	IgBLAST 1.21.0 is now available! The improvements in this latest version are available to both the command line and web IgBLAST users. Tue, 21 Mar 2023
Web BLAST	• protein ucleotide

The option of interest is "Nucleotide BLAST". Since we are working with primers.

3º STEP

When clicked, a page similar to the Pick Primers data entry table will open.



	ational Library o	f Medicine				Lo	g in
BLAST [®] »	blastn suite			Home	Recent Results	Saved Strategies H	elp
blastn blas	stp blastx tbl	lastn tblastx	Standard Nucleotide BLA	ST			
Enter Query S Enter accession nu Or, upload file	equence umber(s), gi(s), or FASTA sec Escolher arquivo Nenhur	BLAST quence(s) ? Clear m arquivo escolhido ?	N programs search nucleotide databases using a	nucleotide query. more		Reset page	Bookmark
Job Title	Enter a descriptive title for you re sequences @	Ir BLAST search 🕜]				
Database EN rganism Optional	Set Standard databases (nr RefSeq Select RNA sequ Enter organism name or i	etc.): O rRNA/ITS d	tabases Genomic + transcript databases	s O Betacoronavirus			

- Now, enter the chosen primer sequences in the frame, or upload the file in Enter Query Sequence (Sequence that will be compared).
- Choose sequence database. (In the example, the RefSeq database was used).



				Standard Nucleotide DLAST	
blastn b	lastp blastx	tblastn	tblastx	Standard Nucleotide BLAST	
			BLASTN	programs search nucleotide databases using a nucleotide query. m	ore
Enter Query	Sequence				
Enter accession	number(s), gi(s), or F/	STA sequence(s	6) 🕜 Clear	Query subrange 😮	
AGAGGCACTGG TCACCAGGCAAG	CAGAAAACA STCTCCTCA			From	
			G	то	
Or, upload file	Escolher arquivo	Nenhum arquivo	escolhido 🕜		
Job Title	Nucleotide Sequ	ence			
	Enter a descriptive ti	tle for your BLAST s	earch 🕜		
Align two or n	nore sequences 😮				
Choose Sea	rch Set				
Database	Standard datat	ases (nr etc.): 〇	rRNA/ITS dat	abases 🔘 Genomic + transcript databases 🔘 Betacoronavi	rus
	• RefSeq Select R	NA sequences (re	fseq select)	~ 0	
Organism Optional	Enter organism r	ame or id-compl	etions will be su	uggested exclude Add organism	
	Enter organism com	mon name, binomia	l, or tax id. Only 2	20 top taxa will be shown 😮	
Exclude Optional	Models (XM/X) Uncultured	environmental	sample sequences	

And lastly, select the program (sequence specificity)

MEGABLAST - Optimize for highly similar strings. Find as close as possible in similarity to the primer - RECOMMENDED.

DISCONTIGUOS MEGABLAST - More dissimilar sequences, with small dissimilarities, with absence or presence of few bases.

BLASTN - Optimize for strings something similar. The dissimilarity is greater, and there may be only a few similarities between the primer bases and the database sequence.

We will select the Blastn option.

Click the BLAST button and wait for the page to load the results.



Program Se Optimize for	Iection O Highly similar sequences (megablast) O More dissimilar sequences (discontiguous megablast) Somewhat similar sequences (blastn) Choose a BLAST algorithm 😪
BLAST	Search database RefSeq Select RNA sequences (refseq_select) using Blastn (Optimize for somewhat similar sequences)

- Analysis of sequence specificity data for each primer.
- All data that were related to the primer produced appeared in a descriptive way.
- The page will show data referring to which sequences or species the primer is related to.
- On the right side, data related to the similarity of the primers with gene sequences from other data is shown ("Query cover"), being 100% very similar (How many bases will pair), and ("Ident"), refers to how many bases are identical (in reference to the tested primers) and the ID ("Accession") of the given access data.

Desc	riptions	Graphic Summary	Alignments	Taxonomy								
Sequ	equences producing significant alignments				Download	~	Sele	ct coli	umns	✓ Show	N 1	00 💙 🕜
🗆 se	elect all 1 s	sequences selected	GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
	Description			Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
Z H	Homo sapiens interleukin 6 (IL6), transcript variant 1, mRNA			Homo sapiens	37.4	74.7	100%	0.018	100.00%	1127	NM_000600.5	



Lownload V	GenBank Gr	aphics Sort by: E	value	~	
lomo sapiens	interleukin (6 (IL6), transcrip	t variant 1, mRI	A	
equence ID: <u>NM</u>	000600.5 Ler	ngth: 1127 Number	of Matches: 2		
Range 1: 309 to 3	28 GenBank G	raphics		▼ <u>Next Match</u> ▲	Previous Match
Score 37.4 bits(40)	Expect 0.018	Identities 20/20(100%)	Gaps 0/20(0%)	Strand Plus/Plus	
Juery 1 AGAG bjct 309 AGAG	GCACTGGCAGAAA GCACTGGCAGAAA	AACA 20 AACA 328			
Range 2: 384 to 4	03 <u>GenBank</u> <u>G</u>	raphics	▼ <u>Nex</u>	Match	First Match
		Identities	Gaps	Strand	

In an analysis with another sequence from the list of primers (Primer 2) we have the following results:

2 results with similar sequences were identified in the database, however the results shown appear for different species (*Homo sapiens* and *Rattus norvegicus*) and only the correct species (*Homo sapiens*) appeared correctly for the designed primer (Human IL-6).

Des	criptions	Graphic Summary	Alignments	Taxonomy									
Seq	juences pro	oducing significant al			Downloa	ad ~	s	elect	column	s Y S	how	100 🌱 🔞	
	select all 2	sequences selected		GenB	ank	Graph	nics	Distance	e tree of	results	MSA Viewer		
		Descripti	ion		Scientific Name		Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
	Rattus norvegio	cus SHC adaptor protein 3 (Sho	<u>c3), mRNA</u>		Rattus norvegicus		41.0	41.0	85%	0.001	88.24%	1968	NM_001105743.1
	Homo sapiens interleukin 6 (IL6), transcript variant 1, mRNA		Homo sapiens		37.4	74.7	100%	0.018	100.00%	1127	NM_000600.5		

7º STEP

After designing the primers, selecting the best primer and testing specificity, the Forward and Reverse sequences can be copied to the spreadsheets of the companies that synthesize the primers.



One last check is recommended before sending primer sequences to be synthesized. This step is to verify if the designed primer has dimers and can be performed in silico on the *ThermoFisher Scientific* website on the Multiple Primer Analyzer platform Available in: <u>https://shorturl.at/emDG5</u>

1º STEP

- Type the sequences of the primers in the first frame.
- A name is required for each primer (eg. Seq1 agtcagtcagtcagtcagtc).
- The results will appear instantly in the output fields (lower windows), and update automatically if you make changes to the sequences.

The results will appear instantly in the output fie following results:	s (lower windows), and update automatically if you make changes to the sequences. The analyzer will give	the
 Tm (°C)* CG content (%) Length of the primers (nt) Number of individual bases (A, T, C and G) Extinction coefficient (l/(mol·cm)) 	Molecular weight (g/mol) Amount / OD unit (nmol/OD260) Mass (µg/OD260) Primer-dimer estimation**	
Type or paste (Ctrl-V) sequence(s) of the primer(s) her Number of primers: 2	FASTA or two column format.	
seq1 AGAGGCACTGGCAGAAAACA seq2 TCACCAGGCAAGTCTCCTCA	e	
4	*	
Parametrs for calculation of primer Tm:	Parametrs for delection of primer dimens:	

No Self or Cross dimers were detected for the analyzed primer sequences.



Self-Dir	ers:		
Cross Pri	ner Dimers:		
		þ	

Access links:

- NCBI Home Page: <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</u>
- BLAST Home Page: <u>https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</u>
- Primer-BLAST: <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-</u> blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome
- User guide Primer-BLAST: <u>https://ftp.ncbi.nih.gov/pub/factsheets/HowTo_PrimerBLAST.pdf</u>
- NCBI Tutorials "How to: Design PCR primers and check them for specificity" <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/howto/design-pcr-</u> primers/



2. Behavioral tests in animals

Gabriela Pandini Silote

Beatriz Franco

Behavioral tests play an essential role in exploring the mechanisms involved in pathological and physiological conditions, understanding the effect of an intervention (e.g. diet or drug treatment), investigating novel compounds to treat disease, behavioral screening of genetically modified animals, evaluating the animal welfare and overall health in the laboratory (ANDREATINI, 2002; BRACKE; HOPSTER, 2006; MONTEGGIA; HEIMER; NESTLER, 2018; PLANCHEZ; SURGET; BELZUNG, 2019; VAN DER STAAY, 2006; VAN SLUYTERS; OBERNIER, 2004). However, some symptoms presented in the patient could not be mimicked using animals, such as psychological concepts in psychiatric disorders (like low self-esteem and the ability to perceive the future) or specific symptoms (for example, excessive guilt or suicide) limiting our knowledge (CRYAN; SLATTERY, 2007; PLANCHEZ; SURGET; BELZUNG, 2019). Despite these limitations, the use of behavioral tests in animals is a valuable tool in research.

Behavioral tests can reproduce specific aspects of physiological or pathological conditions. For example, the open field test (OFT) is used to assess general exploratory behavior and measure the locomotor activity of the animal, and also, the exploratory in the center of the arena allow us to evaluate anxiety-related behavior (ZHANG et al., 2017; KRAEUTER et al., 2019). Moreover, the elevated plus-maze (EPM) allows us to evaluate the anxiety-related behaviors, the effect of intervention, and screening anxiolytic compounds in rodents (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; LISTER, 1987; PELLOW et al., 1985). Finally, novel object recognition (NOR) is used to assess learning and memory in animals and the possible effect of intervention in this issue (LEGER et al., 2013; LUEPTOW, 2017). Besides that, it is important to use more than one test to confirm and reinforce the behavioral outcomes. Therefore, the aim of present training will be to present the conceptual and methodological aspects involved in the OFT, EPM and NOR behavioral tests, as well as to demonstrate in practice the behavioral tests in animals.



1. Open field test (OFT)

The Open Field Test (OFT) is used to assess exploratory behavior and measure the locomotor activity of the animal induced by the drug treatment or interventions (e.g. high-fat diet) in the rodents, and can also be used to assess the general health and well-being of the animal (ZHANG et al., 2017; KRAEUTER et al., 2019).

Activity records are obtained in a square acrylic box measuring 30cm x 30cm x 30cm. Through a camera, the animals' movements are determined by tracking sensors. The analyzed route is divided into 16 quadrants, 4 in the central area and 12 in the peripheral area. The time spent in each area (seconds), the number of quadrants covered and the speed of movements are recorded. The time and number of *grooming, rearing* and *freezing* can be measured. Adaptation to the environment and to the test, recording time, time of day, arena measurements and analysis software can vary according to the needs of the experiment.



Figure 1. Video and diagram of the Open Field test in progress (data not published - CEUA: 6013-1/2022).

2. Elevated plus-maze (EPM)

The elevated plus-maze is an essential tool to investigate the anxiety-related behaviors induced by intervention (e.g. high-fat diet or drug treatment) and to screen



potential compounds with anxiety-related effects (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; LISTER, 1987; PELLOW et al., 1985).

The apparatus is built based on rodents' natural behaviour, avoiding open and elevated places. The equipment is a plus-shaped maze made of acrylic and consists of 2 equals enclosed arms (EA; 30 cm x 6 cm; surrounded by walls 15 cm high) disposed perpendicularly to 2 equals open arms (OA; 30 cm x 6 cm; Figure 2). In the test, the animals will be individually placed in the center of the equipment facing one of the EA and allowed to explore the maze freely for 5 minutes. A video camera recorded the test session from the top of the equipment. Then, an experimenter blind to experimental group analysed the anxiety-related behaviours: OA entries, time, and percentage of time spent in the OA. EA entries were assessed as an index of exploratory behaviour (KOMADA; TAKAO; MIYAKAWA, 2008). The treatment with clinical effective anxiolytic drugs increases the OA exploration in the EPM (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). The apparatus is cleaned with 70% alcohol between each animal to avoid possible interference from olfactory cues.



Figure 2. Elevated plus maze. Schematic figure with elevated plus maze test dimensions (EA and OA: 30 cm x 6 cm) elevated 50 cm from the floor.



3. Novel object recognition (NOR)

Novel object recognition (NOR) is used to assess some aspects of learning and memory in mice. The test was based on an innate preference for novelty, animals will explore most of the time on a new object over a familiar one. Due to this natural behavior, there is no need for long training sessions or positive or negative reinforcement to motivate the behavior (LEGER et al., 2013; LUEPTOW, 2017).

The apparatus consists of a square arena (dimensions: 33 cm x 33 cm) built in wood. In this test, the mouse will go through three stages: 1) <u>Habituation</u>: the mice will be habituated to explore freely the acrylic box for 5 minutes; 2) <u>Training</u>: 24 hours after the habituation, two identical objects will be placed in the arena for the animal to explore for 10 minutes; 3) <u>Test</u>: one of the known objects is exchanged for a new one, and the animal will be allowed to explore the objects for 10 minutes, as described previously (LEGER et al., 2013; LUEPTOW, 2017). During the test session, exploration time for new and familiar objects will be measured. The exploration of objects is defined when the animal sniffs or touches objects with its paws and nose. The discrimination index will be calculated by the ratio of [time exploring the new object / time exploring two objects]. The apparatus and objects are cleaned with 70° alcohol to minimize any olfactory cue between each session (training and test) and each animal.





References

ANDREATINI, Roberto. A importância dos modelos animais em psiquiatria. Revista

labdime

 Brasileira de Psiquiatria, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 164–164, 2002. DOI: 10.1590/S1516

 44462002000400003.
 Disponível
 em:

 http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516 44462002000400003&nrm=iso%5Cnhttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext

 t&pid=S1516-44462002000400003&lng=pt&tlng=pt.

BRACKE, Marc B. M.; HOPSTER, H. Assessing the importance of natural behavior for animal welfare. Journal of Agricultural and Environmental Ethics, [S. I.], v. 19, n. 1, p. 77–89, 2006. DOI: 10.1007/s10806-005-4493-7.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, *[S. l.]*, v. 29, n. 8, p. 1193–1205, 2005. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2005.04.017.

CRYAN, John F.; SLATTERY, David A. Animal models of mood disorders: Recent developments. **Current Opinion in Psychiatry**, *[S. l.]*, v. 20, n. 1, p. 1–7, 2007. DOI: 10.1097/YCO.0b013e3280117733.

KOMADA, Munekazu; TAKAO, Keizo; MIYAKAWA, Tsuyoshi. Elevated plus maze for mice. Journal of Visualized Experiments, [S. I.], v. e1088, n. 22, p. 1–4, 2008. DOI: 10.3791/1088.

KRAEUTER AK, GUEST PC, SARNYAI Z. The Open Field Test for Measuring

Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. Methods Mol Biol. 2019;1916:99-

103. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2 9.

LEGER, Marianne; QUIEDEVILLE, Anne; BOUET, Valentine; HAELEWYN, Benoît; BOULOUARD, Michel; SCHUMANN-BARD, Pascale; FRERET, Thomas. Object recognition test in mice. **Nature Protocols**, *[S. l.]*, v. 8, n. 12, p. 2531–2537, 2013. DOI: 10.1038/nprot.2013.155.

LISTER, Richard G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychohparmacology**, [S. I.], v. 92, n. t 987, p. 180–185, 1987.

LUEPTOW, Lindsay M. Novel object recognition test for the investigation of learning



and memory in mice. **Journal of Visualized Experiments**, *[S. l.]*, v. 2017, n. 126, p. 1–9, 2017. DOI: 10.3791/55718.

MONTEGGIA, Lisa M.; HEIMER, Hakon; NESTLER, Eric J. Meeting Report: Can We Make Animal Models of Human Mental Illness? **Biological Psychiatry**, *[S. l.]*, v. 84, n. 7, p. 542–545, 2018. DOI: 10.1016/j.biopsych.2018.02.010. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.02.010.

PELLOW, Sharon; CHOPIN, Philippe; FILE, Sandra E.; BRILEY, Mike. Validation of open " closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. [S. I.], v. 14, p. 149–167, 1985.

PLANCHEZ, Barbara; SURGET, Alexandre; BELZUNG, Catherine. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. Journal of Neural Transmission, [S. l.], v. 126, n. 11, p. 1383–1408, 2019. DOI: 10.1007/s00702-019-02084-y. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00702-019-02084-y.

VAN DER STAAY, F. Josef. Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. **Brain Research Reviews**, *[S. l.]*, v. 52, n. 1, p. 131–159, 2006. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2006.01.006.

VAN SLUYTERS, Richard C.; OBERNIER, Jennifer A. Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research. [s.l: s.n.]. v. 43 DOI: 10.17226/10732.

ZHANG M, LIU Y, ZHAO M, TANG W, WANG X, DONG Z, YU S. Depression and

anxiety behaviour in a rat model of chronic migraine. J Headache Pain. 2017

Dec;18(1):27. doi: 10.1186/s10194-017-0736-z.

- Complementary materials:
- a) Articles for reading



Sturman O, Germain PL, Bohacek J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. Stress. 2018 Sep;21(5):443-452. doi: 10.1080/10253890.2018.

Himanshu; Dharmila; Sarkar D; Nutan. A Review of Behavioral Tests to Evaluate Different Types of Anxiety and Anti-anxiety Effects. Clin Psychopharmacol Neurosci. 2020 Aug 31;18(3):341-351. doi: 10.9758/cpn.2020.18.3.341.

Franco B, Mota DS, Daubian-Nosé P, Rodrigues NA, Simino LAP, de Fante T, Bezerra RMN, Manchado Gobatto FB, Manconi M, Torsoni AS, Esteves AM. Iron deficiency in pregnancy: Influence on sleep, behavior, and molecular markers of adult male offspring. J Neurosci Res. 2021 Dec;99(12):3325-3338. doi: 10.1002/jnr.24968.

Videos:

> Open field test videos:

- Open Field Behavior Test: A Method to Assess General Locomotion and Exploration Habits – Video: https://app.jove.com/v/20062/open-field-behaviortest-a-method-to-assess-general-locomotion-and-exploration-habits.
- Open Field Behavior Test: A Method to Assess General Locomotion and Exploration Habits – Video: https://app.jove.com/v/20784/open-field-behaviortest-a-method-to-assess-general-locomotion-and-exploration-habits.
- Behavioral Assessments of Spontaneous Locomotion in a Murine MPTPinduced Parkinson's Disease Model – Video: https://app.jove.com/v/58653/behavioral-assessments-spontaneouslocomotion-murine-mptp-induced (DOI: 10.3791/58653).
- Elevated plus maze videos:



1.ElevatedPlusMazeforMice–Video:https://app.jove.com/t/1088/elevated-plus-maze-for-mice(DOI:10.3791/1088-v).

2. Elevated Plus Maze Test Combined with Video Tracking Software to Investigate the Anxiolytic Effect of Exogenous Ketogenic Supplements - Video: https://app.jove.com/v/58396/elevated-plus-maze-test-combined-with-videotracking-software-to-investigate-the-anxiolytic-effect-of-exogenous-ketogenicsupplements (DOI: 10.3791/58396-v).

> Novel Object Recognition video:

1. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice – Vídeo: https://app.jove.com/v/55718/novel-object-recognition-test-for-the-investigation-of-learning-and-memory-in-mice



3. Imunofluorescência em tecido

Lais A. Simino

Mayara N. Baqueiro

1. TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

A técnica imunoquímica de marcação por Imunofluorescência comumente é utilizada para detecção de proteínas e permite muitas aplicações, incluindo a identificação e localização de antígenos em diversos tipos celulares e tecidos. Esta técnica permite analisar a localização subcelular, expressão relativa e os estados de ativação das proteínas-alvos (DONALDSON, 2015; IM et al., 2019).

As reações imunológicas da imunofluorescência são realizadas por meio da ligação antígeno-anticorpo e podem ser visualizadas pela marcação dos anticorpos específicos com fluoróforos (IM et al., 2019; AOKI et al., 2010). A visualização do conteúdo proteico específico é realizada por meio do uso destes anticorpos combinado com técnicas de fluorescência (Figura 1).



Figura 1 – Técnicas de Imunofluorescência: Direta e indireta. Adaptado de: Cell Signaling Technology, 2017.

Para a realização desta técnica alguns pontos devem ser considerados, incluindo: tipo, permeabilização e fixação da amostra; proteínas-alvos; especificidade e sensibilidade do anticorpo primário, propriedades do anticorpo secundário e do fluoróforo a ser usado. Estes detalhes serão abordados ao longo do documento.



2. PERFUSÃO TRANSCARDÍACA E COLETA DO TECIDO

Antes de iniciar o protocolo de imunofluorescência a compreensão de alguns aspectos são importantes.

2.1 Aspectos anatômicos

Para a realização dos cortes dos tecidos que serão utilizados para a técnica de imunofluorescência, o conhecimento acerca dos planos anatômicos é essencial.

As divisões dos planos anatômicos são elas: superior (cranial) e inferior (caudal); lateral e medial, proximal e distal, posterior (dorsal) e anterior (ventral).



Figura 2. Planos anatômicos de roedores, cabras e humanos.

2.2 Regiões do Encéfalo

Para a realização da Imunofluorescência em tecido, é necessário a compreensão acerca das estruturas do tecido-alvo. No caso do encéfalo, o conhecimento de suas estruturas é essencial. O encéfalo é dividido em: tronco encefálico, cerebelo e cérebro.

O tronco encefálico é dividido em: mesencéfalo, ponte e bulbo. Esta importante estrutura conecta o cérebro à medula espinhal e conecta o cerebelo a outras partes do cérebro por meio dos pedúnculos cerebelares (OLIVEIRA, PINTO JÚNIOR, RODRIGUES, 2021).



O cerebelo, estrutura do sistema nervoso central que mantém conexões com o tronco encefálico por meio dos pedúnculos cerebelares, é situado na fossa posterior do crânio (OLIVEIRA, PINTO JÚNIOR, RODRIGUES, 2021).

O cérebro é formado pelo diencéfalo e pelo telencéfalo. O diencéfalo, estrutura pequena e central, é dividido em tálamo, hipotálamo, epitálamo e subtálamo. O terceiro ventrículo divide o diencéfalo em direita e esquerda. O Telencéfalo é uma estrutura periférica do sistema nervoso central importante para a capacidade cognitiva. É composto por dois hemisférios cerebrais, que apresentam sulcos e giros, e pela lâmina terminal (OLIVEIRA, PINTO JÚNIOR, RODRIGUES, 2021).

Para a realização do corte do tecido cerebral, após a coleta do mesmo, utiliza-se um atlas no qual as regiões são especificadas. No caso de camundongos adultos, o atlas "The Mouse Brain"é utilizado como referência para a localização das áreas cerebrais de interesse.











2.3 Perfusão transcardíaca

Para limpar o sangue dos tecidos e fixar o tecido, de modo a manter a preservação das estruturas celulares e das proteínas, é realizada a técnica de perfusão transcardíaca com solução salina tamponada (PBS 0,1M) e Paraformolaldeído 4% (PFA 4%) (Wu et al., 2021).

É importante ressaltar que este procedimento deve ser realizado de acordo com os protocolos éticos adequados.

Para a realização da técnica de perfusão transcardíaca, é realizada a preparação pré-procedimento na qual se dá pela imobilização do animal seguido pela aplicação da anestesia intraperitoneal no quadrante inferior esquerdo ou direito do abdômen. (Wu et al., 2021). **Atenção:** ao aplicar a anestesia, não avançar profundamente com a agulha para não lesionar os órgãos internos.





Figura 4. Injeção intraperitoneal. Fonte: Wu et al., 2021

Após aplicar a anestesia, aguardar o animal encontrar-se 100% anestesiado observado através da ausência de repostas após estímulo na cauda e/ou patas.

A partir deste momento, o ideal é realizar os procedimentos em uma capela. Prender as quatro patas do animal em uma estrutura inclinada de isopor ou madeira.

Neste momento, deixe preparado, uma seringa com aproximadamente 20ml de PBS 0,1M e outra contendo 20 ml de PFA 4% ambas encaixadas em um scalpe de 2 entradas.

Com o animal anestesiado, será realizada a toracotomia para expor os órgãos internos do tórax. Faça uma incisão da caixa torácica, até expor o xifóide. Faça então incisões laterais na região do tórax, até expor o diafragma, fígado. E então, no diafragma, faça incisões. Usando uma pinça hemostática, traga o esterno até a cabeça do animal de modo a expor o pulmão e coração (Wu et al., 2021).

Neste momento, espera-se que o coração do animal permaneça batendo.





Figura 5. Toracotomia. Fonte: Wu et al., 2021

Segure o coração com uma pinça e insira a agulha na ponta do ventrículo esquerdo até que ela entre na aorta. Cuidado com a pressão neste momento para não atravessar o coração e para não atingir o ventrículo direito ou o átrio esquerdo. Neste momento, a agulha deve-se manter estável no mesmo local. Faça um pequeno corte no átrio direito, imediatamente o sangue venoso fluirá.





Figura 6. Inserção da agulha para a realização da perfusão transcardíaca. A, B. posição e direção da agulha. C, D. posicione a agulha na aorta e prenda nesta posição. Fonte: Wu et al., 2021

Após, iniciar a perfusão transcardíaca com o PBS 0,1M em velocidade constante (aproximadamente 1ml/5s). Poderá utilizar uma bomba peristáltica ou empurrar a seringa com a mão. Ao longo deste procedimento, a solução salina tamponada vai retirando o sangue dos tecidos, os quais vão esbranquiçados. Quando os tecidos já estiverem pálidos, e o líquido saindo do animal estiver ausente de sangue, poderá interromper a perfusão com PBS. Em camundongos adultos, o volume de PBS normalmente é de 20ml (Wu et al., 2021).

Inicie então a troca para a de PFA 4%, solução que atua na fixação do tecido. Em velocidade constante (cerca e 1ml/5s), perfundir o PFA. Neste momento, verificam-se alguns sinais no animal, tais como contração do corpo, movimentos da cauda e cabeça,



este é um indicativo que o PFA está na circulação e está sendo bem perfundido. Em camundongos adultos, assim como o PBS, são necessários aproximadamente 20 ml de PFA. Após a administração com PFA os órgãos ficam rígidos. Remova a agulha e retire o animal da estação (Wu et al., 2021).

No caso do uso do cérebro para a técnica de Imunofluorescência, deve-se decapitar o animal, remover a pele da cabeça e expor o crânio. Em seguida, cortar o crânio com cuidado e expor o cérebro. Neste momento, será possível verificar o cérebro pálido e endurecido, sendo um sinal de que a perfusão ocorreu da maneira correta. Remova cuidadosamente o cérebro com auxílio de uma pinça e acondicione em um tubo falcon contendo aproximadamente 10 ml de PFA 4% com 20% de sacarose por 24 horas.



Figura 7. Cérebros dissecados. A. Cérebro não perfundido. B. Cérebro perfundido sem sucesso. C. Cérebro perfundido com sucesso. **Fonte:** Wu et al., 2021

3. PREPARO, CONGELAMENTO E CORTE DO TECIDO

Após a extração e coleta, o encéfalo passará pela etapa de preparo para melhor preservação de suas estruturas, através da criopreservação (com sacarose) e fixação química (com PFA). Logo após a coleta, incubar o tecido em um tubo falcon com aproximadamente 10 mL de uma solução PFA 4% e com 20% de sacarose. O tecido permanecerá nessa solução até decantar (descer para o fundo do tubo falcon) e serão realizadas trocas subsequentes de soluções criopreservantes e fixadoras, conforme descrito abaixo:

1ª Solução: 20% de sacarose + PFA 4% (Dia sacrifício)



2ª Solução: 20% sacarose + PBS 0,1

3ª Solução: 30% sacarose + PBS 0,1

4ª solução: 40% Sacarose + PBS 0,1

Observação: a troca da solução é determinada pelo tempo do tecido decantar (descer).

O tecido deverá ser mantido na 4ª solução até decantar e, em seguida, os próximos passos serão o congelamento e corte. Se não for possível realizar estas etapas logo após o decantamento do tecido, você deverá mantê-lo na 4ª solução até que seja possível prosseguir com o protocolo, mas é importante que não sejam ultrapassados 3 a 4 dias para que a integridade do tecido não seja prejudicada.

Para amostras de animais que foram perfundidos de forma eficiente e foram submetidas aos passos de criopreservação e fixação das estruturas, conforme descrito anteriormente, o melhor método para congelamento e corte do tecido é através do uso do criostato.



Figura 8. Criostato. Fonte: www.leicabiosystems.com

O congelamento é realizado dentro do próprio equipamento criostato, a uma temperatura de -30°C. O encéfalo deve ser posicionado em um suporte metálico específico do equipamento com o uso da solução OCT (do inglês, "Optimal Cutting Temperature") (Sakura, #4583). Essa solução é viscosa em temperatura ambiente e



possui formulação de glicóis e resinas transparentes e solúveis em água que, ao ser submetida a temperaturas abaixo de -10°C, torna-se uma espécie de "cola" para sustentar o encéfalo na posição desejada para o corte. A posição/direcionamento a ser fixado o encéfalo na base do suporte metálico vai depender da região/estrutura que você deseja avaliar com a técnica de imunofluorescência.

O encéfalo deverá ser congelado por, pelo menos, 30 minutos a -30°C e, em seguida, os cortes das fatias deverão ser realizados em temperatura de -25°C, com espessura entre 10 a 30 μm, a depender, novamente, da estrutura a ser avaliada. Para encontrar a região da sua estrutura de interesse, você deve se basear nas estruturas anatômicas do encéfalo do animal, através das coordenadas fornecidas pelo atlas *"The mouse Brain in stereotaxic coordinates"* (Elsevier, 2ª edição).

Após o corte de cada fatia da região de interesse, o mesmo deverá ser incluído em lâminas preferencialmente silanizadas, para melhor aderência das fatias. As lâminas com os cortes já realizados devem permanecer em temperatura ambiente até que todos os cortes sejam realizados ou, pelo menos, por 15 minutos antes de serem congeladas (-20°C) para armazenamento ou subsequentemente submetidas aos próximos passos para aplicação da técnica de imunofluorescência.

4. ETAPAS DE PREPARO DA LÂMINA E DA TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Após o corte das fatias da região de interesse e inclusão na lâmina, as lâminas devem ser incubadas em temperatura ambiente por, pelo menos, 15 minutos, antes de serem iniciados os próximos passos. Utilize uma caneta hidrofóbica para circundar a região onde os cortes foram incluídos na lâmina e aguarde até que seque completamente para prosseguir.

4.1 Fixação

A etapa de fixação do tecido após incluídas as fatias em lâminas não necessita ser realizada caso as etapas anteriores de perfusão transcardíaca do animal e a criopreservação e fixação química do encéfalo após extração tenham sido realizadas



de forma adequada e, ainda, se as lâminas utilizadas para inclusão dos cortes forem lâminas previamente tratadas para melhor aderência dos cortes.

Caso algumas dessas etapas não tenha sido realizada, recomenda-se a fixação das amostras através da incubação das lâminas em metanol ou PFA, da seguinte forma:

- Metanol 100% (resfriado a -20°C) em temperatura ambiente por 5 minutos,
 OU
- PFA 4% em temperatura ambiente por 10 minutos.

Após a fixação, as lâminas devem ser lavadas 3x em PBS gelado.

4.2 Bloqueio

A etapa de bloqueio é importante pois reduz o sinal de fundo, também chamado de ruído ou marcação inespecífica, causado pela ligação não específica de anticorpos primários e secundários a locais diferentes do alvo pretendido. O reagente de bloqueio ocupará superfícies de proteínas carregadas ou hidrofóbicas expostas, sem interferir no reconhecimento de anticorpos primários/secundários.

Diferentes agentes de bloqueio podem ser utilizados e pode ser útil consultar as especificações e recomendações dos seus anticorpos primário e secundário para saber se algum agente de bloqueio específico é necessário para utilização em conjunto com esses anticorpos. De forma geral, utiliza-se como agente de bloqueio uma solução de PBT + 3% de BSA (albumina). Com o auxílio de uma micropipeta, adicione 1 mL da solução de bloqueio na região dos cortes na lâmina, previamente delimitada pela caneta hidrofóbica. Incube em temperatura ambiente por, pelo menos, 90 minutos.

4.3 Anticorpos

A técnica de detecção utilizada na imunofluorescência compreende o uso de anticorpos marcados com fluorocromos para visualizar os alvos. Os antígenos presentes na amostra podem ser detectados de forma direta ou indireta, a depender da escolha ou disponibilidade dos anticorpos a serem utilizados. A detecção direta

abdim

envolve o uso de anticorpos primários que já são conjugados com fluorocromo e, nesse caso, não é necessária a utilização de um anticorpo secundário. A detecção indireta envolve um anticorpo primário não marcado, ou seja, não conjugado ao fluorocromo e, portanto, deve ser utilizado um anticorpo secundário, que reconhece o anticorpo primário e é conjugado ao fluorocromo.

É importante a utilização dos anticorpos em sua diluição recomendada pelo fabricante para obter uma captação do sinal, mas o mínimo de ruído (ligações inespecíficas). Se o anticorpo for utilizado em concentração muito baixa, o sinal de fluorescência será muito fraco para distinguir do ruído de fundo, mas, por outro lado, uma concentração excessivamente alta contribuirá para a coloração de fundo.

Mesmo que a amostra tenha sido bloqueada na etapa anterior, os anticorpos são sempre diluídos e aplicados às amostras em um tampão de diluição contendo uma proteína transportadora (albumina). Assim, a diluição do anticorpo é realizada na mesma solução utilizada para o bloqueio das lâminas.

De forma geral, as etapas empregadas na imunofluorescência indireta, são as seguintes:

 Adicionar 1 mL de anticorpo primário (diluído, na concentração recomendada pelo fabricante, em solução de bloqueio) e incubar overnight à 4°C (geladeira);

- No dia seguinte, lavar as lâminas com PBT por 3x, 5 minutos cada;

Em uma sala escura, dispor as lâminas em caixa apropriada (escura) e adicionar
 1mL de anticorpo secundário (diluído, na concentração recomendada pelo fabricante,
 em solução de bloqueio) e incubar por, no mínimo, 90 minutos, ou seguindo as
 orientações do fabricante do anticorpo, na ausência de luz.

Importante: a solução de anticorpo secundário deve ser, idealmente, preparada em ambiente escuro, e todas as etapas de manipulação do anticorpo secundário e das lâminas após incubação com anticorpo secundário também devem ser realizadas ao abrigo da luz.

- Lavar as lâminas com PBT por 3x, 5 minutos cada.



Em seguida, é realizada uma etapa para marcação do núcleo celular. O reagente mais utilizado para essa função é o DAPI (diamidino-2-phenylindole), que contém uma sonda fluorescente azul que se liga ao DNA de fita dupla, onde sua fluorescência é aproximadamente 20 vezes maior do que no estado não ligado. Essa seletividade para o DNA, juntamente com a permeabilidade celular, permite a coloração de núcleos com pouco fundo do citoplasma, o que faz do DAPI a contra-coloração nuclear clássica para microscopia de imunofluorescência. O DAPI deve ser diluído em PBT, na concentração recomendada pelo fabricante, e adicionado às lâminas também pelo tempo determinado pelo fabricante (geralmente entre 10 e 20 minutos). As lâminas são, novamente, lavadas com PBT por 3x, 5 minutos cada e, em seguida, são montadas para visualização em microscópio.

A montagem das lâminas se dá pela adição de um meio de montagem (meio viscosos que, geralmente, possuem ação protetiva da capacidade de fluorescência dos anticorpos) e uma lamínula, de forma que as amostras fiquem protegidas entre duas superfícies (lâmina e lamínula).

As lâminas devem ser armazenadas entre -20 e +4°C, protegidas da luz, até que a imunofluorescência seja identificada em microscópio.

4.4 Captura das imagens de fluorescência

A captura da imunofluorescência pode ser realizada em qualquer microscópio de fluorescência com fonte de excitação e filtragem apropriadas, sendo a microscopia confocal a técnica mais indicada pois garante melhores resultados. A microscopia confocal é uma técnica que obtém imagens fluorescentes de alta resolução de células e tecidos, eliminando lâminas fora de foco.

Ao realizar a análise das imagens de imunofluorescência, é prudente considerar os parâmetros de imagem no início do processo, de preferência com experimentos-piloto. Normalmente, esses parâmetros a serem pré-determinados incluem: tempo de exposição, intensidade de excitação, ganho da câmera, entre outros ajustes de imagem. Os parâmetros devem ser ajustados de modo que o sinal esteja na faixa



dinâmica da câmera e os pixels não estão saturados, ao mesmo tempo que garanta que os ruídos ou marcações inespecíficas sejam minimizados.



Figura 9. A. Microscópio confocal, Fonte: <u>www.leicabiosystems.com</u>, B. Imagem obtida em microscópio confocal, onde a proteína de interesse na região do 3° ventrículo hipotalâmico está marcada em verde e o núcleo (DAPI) em azul, Fonte: acervo do Laboratório de Distúrbios do Metabolismo (Labdime).

5. SOLUÇÕES IMUNOFLUORESCÊNCIA

PBS 0,1M

Inicialmente, preparar a solução PBS 0,2M:

- Solução A: 27,6g de Na2HPO4 em 1 litro de água deionizada.
- Solução B: 53,6g de Na2HPO4 7H20 em 1 litro de água deionizada.
- Para 1 litro de solução PBS 0,2M: Adicionar 230 ml de Solução A + 770 ml de

Solução B e adicionar 18g de NaCl

Volume final da solução = 1 litro

Atenção: Para fazer PBS 0,1 M diluir o PBS 0,2M (1:2) em água deionizada.

PBS 0,2M

Solução A: 27,6g de Na2HPO4 em 1 litro de água deionizada.



Solução B: 53,6g de Na2HPO4 7H20 em 1 litro de água deionizada.

Para 1 litro de solução PBS 0,2:

Adicionar 230 ml de Solução A + 770 ml de Solução B e adicionar 18g de NaCl Volume final da solução = 1 litro

Atenção: Para fazer PBS 0,1 M diluir o PBS 0,2M (1:2) em água deionizada.

PBT

PBS 0,1M

Triton 0,3%

SOLUÇÃO DE BLOQUEIO

PBT

BSA (albumina) 3%

PFA 4%

Inicialmente preparar a solução à 8%:

- Paraformolaldeído – 40g

- 5 pellets de NaOH

- Água deionizada– 500ml

Preparo:

 Aquecer lentamente no agitador a 45°C e verificar se a solução está transparente. Se não estiver, ir adicionando 1 Pellet de NaOH e aquecer até 55°C no máximo (obs. Aquecer aos poucos)

2. Após o preparo da solução, deixar esfriar em temperatura ambiente

3. Para o PFA 4%, misturar solução de PFA 8% em 500 ml de PBS 0,2M, filtrar e arrumar o pH da solução para 7,4.

Volume final: 1 litro PFA 4%.









REFERÊNCIAS

Aoki, V., Sousa Jr, J. X., Fukumori, L. M. I., Périgo, A. M., Freitas, E. L., & Oliveira, Z. N. P. (2010). Imunofluorescência direta e indireta. **Anais brasileiros de dermatologia**, 85(4), 490-500. https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000400010

Cell Signaling Technology. (2017). A guide to successful immunofluorescence.Retrievedfrom:https://www.cellsignal.com/learn/protocols-immunofluorescence-protocol-guide.

Donaldson, J. G. (2015). Immunofluorescence staining. **Current protocols in cell biology**, 69, 4.3.1-4.3.7. https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0403s69

Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019). An introduction to performing immunofluorescence staining. In Methods in molecular biology (Vol. 1897, pp. 299-311). **Humana Press**. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26

Oliveira, A. S. B., Pinto Júnior, G. B., & Rodrigues, I. M. I. (2021). Neuroanatomia na prática: Atlas do Sistema Nervoso Central (1st ed.). UFPB.

Wu, J., Cai, Y., Wu, X., Ying, Y., Tai, Y., & He, M. (2021). Transcardiac perfusion of the mouse for brain tissue dissection and fixation. **Bio Protocols**, 11(5), e3988. <u>https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3988</u>



4. Genetically Modified Organisms (GMO)

Nilton José dos Santos

Introduction

Genetically modified mouse models (GEMMs) have made an important contribution to the understanding of numerous human diseases. Traditional knockout models have been important in illustrating the role that certain genes play in the organism or metabolism.

The conditional gene deletion technique allowed a tissue-specific model of gene deletion necessary to obtain interesting and physiologically relevant results. The Cre-loxP recombination system (*Sternberg and Hamilton, 1981; Abremski and Hoess, 1984; Sauer & Henderson, 1988; Capecchi, 1989*) allowed the conditional deletion of genes, cell and tissue-specific, being limited only by promoter availability and specificity (*Gu et al. 1994; Greenberg et al. 1994*).

There are two main parts of the Cre-Lox system, the Cyclization recombinase, and LoxP Sites. The **Cyclization recombinase (Cre)** is one of the tyrosine site-specific recombinases, which is known to catalyse the site-specific recombination event between two DNA recognition sites (LoxP sites). Cre recombinase consists of 343 amino acids, which can specifically recognize Lox sites. The palindromic DNA region recognized by Cre recombinase are known loxP (locus of X-over P1) sites. **LoxP sites** are directional 34 bp sequences made up of two 13 bp reverse complement on both sides (the recognition sequence of Cre recombinase) and an 8 bp spacer region (the position where recombination occurs) which gives it directionality (*Kim et. al., 2018*).

The bacteriophage site-specific DNA recombinase (*Guo et al., 1997*) performs homologous recombinations of DNA sequences located between two loxP ("*floxed*") DNA sequences. The loxP sequences are palindromes, inversely complementary that are recognized by the enzyme Cre-recombinase. This enzyme can perform insertions, inversions, and excisions on DNA molecules (for review see *Nagy, 2000*). The Cre/LoxP



system has been successfully used to delete endogenous genes or activate transgenes in mammalian cell cultures, as well as in transgenic mouse models, among them it is worth highlighting the "*BrainBow*" mouse project which, by recombination of different fluorescent proteins (red, yellow, and blue), has allowed the simultaneous visualization of dozens of individual neurons (*Livet et al. 2007; Miller, 2011; Weissman et al. 2011*).



Figure 1: Mechanism of *Cre-loxP* system. (A) An overview of Cre-loxP system. 38 kDa Cre recombinase recognizes the loxP sites of specific 34 bp DNA sequences. (B) General breeding strategy for conditional mutation using loxP and Cre driving mouse line. In principle, one mouse must have a tissue-specific driven cre gene and another mouse have loxP flanked (floxed) alleles of interest gene Y. Expression of Cre recombinase excises floxed loci and inactivates the gene Y. Image and text extracted from *Kim et. al., 2018*.

GMO Genotyping Protocol

First Step: DNA Extraction

- 1- Prepare the extraction solution in a 1.5 ml tube by adding 25 μ l of Tissue Preparation Solution + 100 μ l of extraction solution.
 - a. Homogenize with pipette in "up" and "down" movements.



b. The buffer can be prepared in a 4:1 ratio (Extraction Solution : Tissue Preparation Solution) up to 2 hours prior to use.

2- After preparing the solution, add 125 μ l to each eppendorf with a piece of the animal's tail. The tissue always needs to be in contact with the extraction solution.

a. Homogenize with pipette and vortex.

b. Incubate at room temperature for 10 minutes.

3- Incubate at 95°C for 3 minutes in a dry bath.

4- Add 100 μl in Neutralizer B solution.

a. Homogenize on vortex.

5- Transfer the volume to a new 600 μ l (0.6 ml) eppendorf tube and store the DNA in the refrigerator.

a. Extracted DNA can be used immediately after extraction.

Note: Tissue will not be fully digested at the end of the process. It's common.

Second Step: Conventional PCR

1- The concentrations of the genotyping primers must be reconstituted and diluted to 0.5 $\mu M.$

2- The reaction consists of 8 μl of the PCR mix (see reagents in the table) and + 2 μl of DNA.

3- Add the volumes into 0.2 ml eppendorf tubes.

4- Calculate the mix with the proportions below and according to the number of primers for reaction.



Reagent	Volume *
Water, PCR Grade	ΧμΙ
Extract-N-Amp PCR reaction mix	10 μl (5 μl)
Forward Primer	Υ μΙ (0,5 μΙ)
Reverse Primer	Υ μl (0,5 μl)
Tissue extract	4 μl (2 μl)
Total Volume	20 µl (10 µl)

*The volumes in parentheses are the optimized values used in LABDIME.

5- PCR parameters must be optimized for each primer used.

6- After pipetting the reaction into each tube, the samples will be placed in the thermal cycler.

7- Thermal Cycler Programming: Variable for each animal primer/strain used.

8- Here is a model for the reaction:

Common Cycling Parameters:							
Step	Temperature	Time	Cycles				
Inicial Denaturation	94°C	3 minutes	1				
Denaturation	94°C	0.5 – 1 minutes					
Annealing	45 to 68°C	0.5 – 1 minutes	30 - 35				
Extension	72°C	1 – 2 minutes (~ 1					
EXTENSION	72 C	kb/minute)					
Final Extension	72°C	10 minutes	1				
Hold	4°C	Indefinitely					

Third Step: Running samples in Agarose Gel

1- Prepare the agarose gel in the specific size for a certain number of samples:

- a. Small = 35 ml
- b. Medium = 70 ml



c. Large = 140 ml

2- In a glass beaker, add the Agarose and dissolve with 1x TAE Buffer (new).

3- Dissolve the agarose in the solution in the beaker by heating in microwave twice for 30 seconds. Check if it is bubbling, reduce the time to 1 time every 10 seconds so as not to overflow.

a. Repeat the procedure until verifying that the Agarose has been completely dissolved in the solution.

4- Add the SYBR Safe DNA marker to the still hot agarose solution and dissolve completely.

a. The amount of SYBR varies according to the size of the gel used.

5- Pour the Agarose into the gel tank and wait 30 minutes for polymerization.

a. Before the gel solidifies, assemble the bowl with the combs.

6- Pipette the Loading Buffer (LB) into the PCR reaction samples.

a. Check the LB concentration and the amount to be pipetted.

7- Fill the tank with TAE 1x until it covers the gel and the wells.

8- After pipetting the samples, the marker (DNA Ladder in the first well), turn on the power supply and start the run at 100 V for 30 minutes and then increase the voltage to 150 V for another 30 minutes.

9- After completing the run, take a photo of the gel in a photodocumenter with UV light.

References



Abremski K, Hoess R. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. J Biol Chem 1984, 259: 1509-1514.

Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. Science 1989, 244: 1288-1292.

Greenberg NM, DeMayo FJ, Sheppard PC *et al.*, The rat probasin gene promoter directs hormonally and developmentally regulated expression of a heterologous gene specifically to the prostate in transgenic mice. Mol Endocrinol 1994, 8: 230–239.

Gu H, Marth JD, Orban PC, *et al.* Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specifc gene targeting. Science 1994, 265: 103-106.

Guo F, Gopaul DN, van Duyne GD. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. Nature 1997, 389: 40-46.

Kim H, Kim M, Im SK, Fang S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. Lab Anim Res. 2018 Dec;34(4):147-159. doi: <u>10.5625/lar.2018.34.4.147</u>.

Livet J, Weissman TA, Kang H, *et al.* Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. Nature 2007, 450: 56-62.

Miller RL. Transgenic mice: beyond the knockout. Am J Physiol Renal Physiol 2011, 300:F291-300.

Nagy A. Cre Recombinase: The Universal Reagent for Genome Tailoring. Genesis 2000, 26: 99-109.

Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. Proc Natl Acad Sci (USA) 1988, 85: 5166-5170.

Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. J Mol Biol 1981, 150: 467-486.

Weissman TA, Sanes JR, Lichtman JW, Livet J. Generating and imaging multicolor Brainbow mice. Cold Spring Harb Protoc 2011, 2011: 763-769.



5. Stereotaxic surgery

Beatriz Piatezzi Siqueira Nilton José dos Santos

Introduction

Stereotaxic (or stereotactic) surgery is a powerful technique utilized to manipulate the brain in living animals. This technique allows researchers to accurately target deep structures within the brain using a stereotaxic atlas, which provides the 3D coordinates of each area with respect to anatomical landmarks on the skull. Stereotaxic surgery is a versatile approach that can be used to generate lesions, manipulate gene expression, or deliver experimental agents to the brain.

To start, stereotaxic depends on locating the targeted region of the brain on a three-dimensional axis. Spatial relationships are expressed using a set of 3 axes: Anterior-posterior, medial-lateral and dorsal-ventral. To determine the location of a region of interest, find the appropriate brain region in the atlas and use the grid to calculate the corresponding mediolateral and dorsoventral coordinates.

Aims: Understand and learn the stereotaxic surgical procedure for guide cannula implantation in young mice and rat brains. This procedure aims at the manipulation and delivery of drugs by microinjections in previously determined regions of the brain.

Stereotactic surgery protocol

- 1. Anesthetize the animal
- 2. Leave the screws and cannulas submerged in iodized alcohol

3. Place the animal in the apparatus and drip the eye drops into the animals' eyes

4. Clean the animal's head with iodized alcohol, make an incision and shave the hair



- 5. Clean with gauze and drip hydrogen peroxide.
- 6. Identify the bregma (first meeting of the sutures, closer to the eye line).
- 7. Find the position of the cannula and note the coordinates.
- 8. Raise the cannula (do not change the other positions).
- 9. Insert the screw.
- 10. Discount the coordinates:

Mouse (Lateral ventricle)

- X: Anteroposterior: -0.34
- Y: Lateral: -1.0
- Z: Depth: -2.2
- 11. Mark the tip of the cannula with iodized alcohol and drill.
- 12. Get lower the cannula
- 13. Glue it with powder and polymerizing liquid
- 14. Finish it with superglue

15. Attention: Inject subcutaneously (Sub-Q) anti-inflammatory medicine (*Carprofeno* - 5 mg/kg) (1x) immediatly after the surgery.





Figure 1: Portable Stereotaxic Instrument for Mice

Instrument by RWD Life Science



Figure 2: Representative scheme of animal positioning



Video from: JoVE Science Education Database. Neuroscience. Rodent Stereotaxic Surgery. JoVE, Cambridge, MA, (2023).

References

JoVE Science Education Database. Neuroscience. Rodent Stereotaxic Surgery. JoVE, Cambridge, MA, (2023).

Poole, E. I.; McGavin, J. J.; Cochkanoff, N. L.; Crosby, K. M. Stereotaxic surgery for implantation of guide cannulas for microinjection into the dorsomedial hypothalamus in young rats. *MethodsX*, Vol. 6, 2019, p.1652-1659. https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.07.005.

Diao, Y., Cui, L., Chen, Y., Burbridge, TJ, Han, W., Wirth, B., ... & Zhang, J. (2018). As conexões recíprocas entre o córtex e o tálamo contribuem para o direcionamento do axônio da retina para o núcleo geniculado lateral dorsal. Cerebral Cortex, 28(4), 1168-1182.

Fan, XC, Fu, S., Liu, FY, Cui, S., Yi, M., & Wan, Y. (2018). A hipersensibilidade dos neurônios do córtex pré-límbico contribui para respostas nociceptivas agravadas em ratos com experiência de dor inflamatória crônica. Fronteiras em neurociência molecular, 11, 85.

