



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Genética e Morfologia**

**Avaliação da expressão *post-mortem* das citocinas IL-1 β , TNF- α e
IL-6 em cérebro de *Mus musculus* submetidos à dor**

Carlos Eduardo Cardoso da Silva Cruz

Brasília 2019



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Genética e Morfologia

Avaliação da expressão *post-mortem* das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 em cérebro de *Mus musculus* submetidos à dor

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Biologia Animal como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Biologia Animal.

Brasília 2019

Título: Avaliação da expressão *post-mortem* das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 em cérebro de *Mus musculus* submetidos à dor

Trabalho apresentado em Brasília, 31 de outubro de 2019

Comissão examinadora:

Profa. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira
Orientadora

Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo
Membro não vinculado ao programa

Prof. Dr. Rolando André Rios Villacis
Membro vinculado ao programa

Patrícia Natália Silva Moretti
Membro suplente

Brasília 2019

“Sucesso não é o final, fracasso não é fatal: é a coragem para continuar que conta.”

(Winston Churchill)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora professora Dra. Silviene Fabiana de Oliveira, pela orientação, apoio e paciência. Obrigado por acreditar em mim e por ter me dado a oportunidade de ingressar junto ao grupo de pesquisa.

Às professoras Dra. Aline Pic-Taylor e Dra. Patrícia Natália Silva Moretti, pelos auxílios na orientação e por disponibilizar alguns dos equipamentos, treinamentos e reagentes para realização dos experimentos.

A todos os membros do Laboratório de Genética Humana que propiciaram um excelente espaço de convívio e aprendizado. Em especial aos colegas Raphael Severino Bonadio e Larissa Barbosa Nunes pela parceria nos experimentos e desafios passados.

Aos participantes dos experimentos de coleta e extração. Sua ajuda foi essencial para a realização desse mestrado.

À banca avaliadora dessa dissertação, pela disponibilidade e paciência nas correções e sugestões ao texto.

À professora Dra. Márcia Renata Mortari, ao seu grupo de pesquisa e em especial aos seus alunos de doutorado Gabriel e Priscila, pelos auxílios na orientação e por disponibilizar alguns dos equipamentos, treinamentos e reagentes para realização dos experimentos.

Ao Laboratório de Imunologia da Universidade de Brasília, pelo apoio com os experimentos de dosagem de citocina.

Ao Biotério da Universidade Católica de Brasília, pelo fornecimento dos animais.

Ao Dr. José Luiz Jivago de Paula Rôlo e toda a equipe do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Às agências de fomento CAPES, pela bolsa, CNPQ e FAP-DF, pelo financiamento do projeto.

Meus amigos são aqueles com quem tenho a certeza de que poderei contar. Agradeço aos meus amigos Enhancers: Gian, Luna, Isa, Paulo e Mari que sempre estiveram presentes desde o início de minha graduação e vida acadêmica. Sua amizade verdadeira foi e é muito importante na minha vida.

Minha namorada Rossany de Resende Mateus por ser tão amorosa, companheira e presente em todos os momentos de alegrias e dificuldades.

Minha família é a base de tudo o que eu sou. Agradeço minha irmã Maria Aline. Agradeço meu pai, Carlos Benedito e minha mãe Jacqueline por todo o cuidado, carinho, ensinamentos e amor. Ao meu cão Flóki Bob. Chegar em casa e ser recebido por eles foi reconfortante em todos os dias.

Agradeço ao meu Deus, força espiritual de fé e guia de minha vida.

Por fim agradeço a todos que de alguma forma compartilharam comigo suas experiências e puderam participar dessa fase da minha vida que foi o mestrado.

RESUMO

O estado de dor mediado pela nociceção está tipicamente associado a uma lesão tecidual que produz uma descarga eletrofisiológica aguda nos terminais nervosos e uma resposta nas fibras nervosas C-polimodais associadas à inflamação local do tecido danificado, levando a liberação de mediadores do processo inflamatório como as citocinas e a ativação de células da glia. As células da glia (microglia e astrócitos) desempenham papéis importantes na vigilância imunológica e equilíbrio da homeostase sináptica. Quando ativas, essas células produzem mudanças na expressão de genes relacionados à produção de citocinas pró-inflamatórias. Há claras evidências de que certas citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , estão envolvidas no processo de dor neuropática. Neste trabalho, utilizou-se modelo de indução de nociceção por injeção de formalina e se investigou o seu efeito na modificação da concentração de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) em tecido cerebral colhidos em dois tempos: 0 horas e 48 horas *post-mortem*. As citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel na modulação da dor, interferindo na transdução, condução e transmissão nociceptivas. A modulação pode resultar de alteração da taxa de transcrição e / ou alterações pós-traducionais nas proteínas envolvidas na via da dor. Neste trabalho foram utilizados 16 animais da linhagem C57Bl/6 (*Mus musculus*), machos e com idade de 12 semanas distribuídos em quatro grupos com N= 4 para avaliação. Os animais foram submetidos ao teste de formalina e depois tiveram o cérebro extraído para avaliação da concentração de citocinas. Observou um aumento significativo na concentração de citocinas IL-1 β e TNF- α em um momento 0 horas após a morte. A liberação dessas citocinas pode ser indicativo da ativação da microglia em cérebro de *Mus musculus* submetidos à injeção de formalina, um evento ainda não apresentado na literatura. O momento da morte de um organismo não promove uma parada imediata de todas as atividades celulares envolvidas em seu metabolismo, sendo possível observar um padrão e variação na expressão de genes mesmo no período *post-mortem*. Foi observado um aumento significativo dos níveis de IL-6 no período 48 horas *post-mortem* o que pode indicar eventos de transcrição e tradução *post-mortem*. Diante disso, abre-se precedente para estudos que busquem compreender os eventos de transcrição e tradução no intervalo *post-mortem*, uma vez que essa compreensão é essencial para o uso adequado da utilização de expressão gênica *post-mortem* como um parâmetro de comparação com os níveis de expressão gênica fisiológica que estejam relacionados à estímulos de dor prolongada *ante-mortem* em tecidos colhidos *post-mortem*.

Palavras Chave: Tradução *post-mortem*, Formalina, Neuroinflamação, Citocinas, Microglia.

ABSTRACT

The nociception-mediated pain status is typically associated with a tissue injury that produces an acute electrophysiological discharge at the nerve terminals and a response to C-polymodal nerve fibers associated with local inflammation of damaged tissue. It leads to the release of inflammatory process mediators such as cytokines. Glial cells (microglia and astrocytes) play important roles in the immune surveillance and balance of synaptic homeostasis. When active these cells produce changes in gene expression related to the production of proinflammatory cytokines. There is a clear evidence that certain pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α are involved in the neuropathic pain process. In this work, a formalin injection nociception induction model was used and its effect on modifying the concentration of proinflammatory cytokines such as IL-1 β , TNF- α and IL-6 in brain was investigated in tissue harvested during two periods: 0 hours and 48 hours *post-mortem*. Proinflammatory cytokines play a role in pain modulation by interfering with nociceptive transduction, conduction and transmission. This modulation may result from altered transcription rate and / or post-translational changes in proteins involved in the pain pathway. In this study, 16 male C57Bl / 6 (*Mus musculus*) animals, aged 12 weeks and divided into four groups with N = 4 were used for evaluation. The animals underwent the formalin test and then had their brain extracted for cytokine concentration assessment. There was a significant increase in the concentration of cytokines IL-1 β and TNF- α at a time 0 hours after death. The release of these cytokines may be indicative of microglia activation in *Mus musculus* brain submitted to formalin injection, something not yet presented in the literature. The moment of death of an organism does not promote an immediate stop of all cellular activities involved in its metabolism, being possible to observe a pattern and variation in the expression of genes even in the post-mortem period. A significant increase in IL-6 levels was observed within 48 hours post-mortem which may indicate post-mortem transcription and translation events. Given this, a precedent is set for studies that seek to understand transcription and translation events in the post-mortem interval, since this understanding is essential for the proper use of post-mortem gene expression as a parameter of comparison with physiological gene expression levels that are related to prolonged *ante-mortem* pain stimuli in post-mortem harvested tissues.

Keywords: *Post-mortem* Translation, Formalin, Neuroinflammation, Cytokines, Microglia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fisiologia da nocicepção. Processos de transdução, transmissão, percepção e modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo. Figura adaptada de: (Ellison, 2017)..... 24

Figura 2. Diagrama demonstrando os aspectos envolvidos a partir de uma lesão onde há o início de um quadro de neuroinflamação e, por consequência, dor neuropática. Uma lesão tecidual promove a sensibilização dos nociceptores locais, as fibras A β/δ e C. À sensibilização das fibras ocorre a liberação local de sinais de ativação para a microglia: ATP, Quimiocinas e a Substância P. A microglia, uma vez ativada, produz mudança na expressão de genes relacionados à produção de citocinas, quimiocinas e proteases. Células da microglia localizadas próximas ao local da lesão são ativadas e passam a interagir em nível molecular com o neurônio lesionado, liberando vários agentes neuroinflamatórios (IL-1 β , TNF- α , IL-6, ROS- NO, Quimiocinas e fatores de crescimento). A ativação da microglia em conjunto com a ativação de astrócitos proporciona a despolarização da membrana do neurônio afetado o que faz aumentar a sua sensibilidade e potencializa os estados de neuroinflamação e dor neuropática. Figura adaptada de: (Jha et al., 2012). 29

Figura 3. Ação da interleucina 1. Membros da família IL-1 incluindo ligantes (IL-1a, b), o antagonista (IL-1ra) e o receptor (tipo I). Abreviações: AcP, proteína acessória; MAP, proteína ativada por mitogênio; IRAK, quinase associada ao receptor de interleucina-1; TRAF, fatores associados ao receptor do fator de necrose tumoral; NF-kB, fator nuclear-kB; JNK, quinase c-jun n- terminal. Figura adaptada de: (Rothwell & Luheshi, 2000)..... 33

Figura 4. Diagrama que ilustra as vias de sinalização da IL-6. (A) Na via de sinalização trans, a IL-6 liga-se ao sIL-6R. O complexo IL-6 – sIL-6R permite a ativação

de células que expressam gp130. **(B)** A molécula antagonista sgp130 bloqueia seletivamente a sinalização trans. Figura adaptada de: (Lee et al., 2011)..... 36

Figura 5. Vias de sinalização da citocina TNF- α . TNF- α pode atuar por meio da ligação aos receptores transmembrana TNFR1 e 2 transmitindo sinais para: sobrevivência celular (inibidores de apoptose) e vias de inflamação. Figura adaptada de: (Urbano et al., 2014)..... 38

Figura 6. Câmara de Observação. Câmara para observação de comportamento de camundongo utilizada para observação de resposta nociceptiva após injeção de formalina. A câmara é feita de policarbonato transparente e lateralmente acompanhada por espelhos para facilitar a observação de todo o comportamento apresentado pelo animal. 46

Figura 7. Injeção de formalina em camundongo. Exemplo de imagem mostrando a injeção de formalina. **a-** Mostrando o local de injeção no camundongo; **b-** Mostrando a seringa usada para injeção bem como o posicionamento e ângulo da aplicação. 47

Figura 8. Comportamento nociceptivo de camundongo ao teste de formalina avaliado a partir da estimativa do tempo que os animais dos grupos 1 e 2 realizaram lambidas na pata injetada. Fase neurogênica: Fase 1; Fase inflamatória: Fase 2. Observou-se diferença significativa entre as duas fases do teste ($P < 0,001$). Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 8$ para cada Fase)..... 55

Figura 9. Dosagem de citocina TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-6 (C) em pg/mg de tecido cerebral extraído 0 horas (Grupo 1) e 48 horas (Grupo 2) *post-mortem* de *Mus musculus* submetidos à injeção subplantar de formalina e o controle naive. 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM17	Domínio 17 da metalopeptidase ADAM
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de Adenosina
°C	Grau Celsius
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal
Célula NK	Células Exterminadoras Naturais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EM	Esclerose múltipla
ELA	Esclerose lateral amiotrófica
g	Gramma
Gp80	Glicoproteína 80
Gp130	Glicoproteína 130
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HPA	Eixo Hipotálamo-Pituária- Adrenal
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IFN	Interferon
IL-1 β	Interleucina -1 β
IL-6	Interleucina – 6
IL-4	Interleucina- 4
IL- 10	Interleucina- 10
IL-13	Interleucina- 13
IL-Ra	Receptor Antagonista da Interleucina-1
kDa	Kilodaltons
MAPKs	Proteíno-quinases ativadas por mitógenos
mg	Miligramas
ml	Mililitros
mRNA	RNA mensageiro

MYD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NaCl	Cloreto de Sódio
Nº	Número
ncRNA	RNA não-codificante
NF KB	Fator nuclear kappa B
NO	Oxido Nítrico
NCBI	Nacional Center for Biotechnology Information
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Proteína C reativa
pg	Picogramas
pH	Potencial Hidrogeônico
PGE2	Prostaglandina E2
p38	Proteína-quinases ativadas por mitógenos 38
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de Oxigênio
sIL-6R	Receptor de interleucina-6 solúvel
SNC	Sistema Nervoso Central
SNS	Sistema Nervoso Simpático
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TRAF2	Fator 2 associado ao receptor de TNF
TRADD	Proteína do domínio de morte associada ao receptor do fator de necrose tumoral tipo 1
UV	Ultravioleta
μ l	Microlitro
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Morte e fenômenos <i>post-mortem</i>	16
1.2. Ácidos nucleicos – estabilidade e funcionamento <i>post-mortem</i>	19
1.3. Dor e nocicepção	22
1.4. Glia e neuroinflamação	27
1.5. Citocinas pró-inflamatórias	30
1.5.1. A Família das interleucinas-1	31
1.5.2. Interleucina-6.....	34
1.5.3 TNF- α	36
1.6. Avaliação nociceptiva: teste da formalina e ativação da microglia.....	39
2. JUSTIFICATIVA	41
3.OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1 Aspectos éticos	44
4.2 Animais.....	44
4.3 Desenho experimental	44
4.3.1 Teste da formalina	45
4.4 Homogeneização do tecido.....	48

4.5 Dosagem de citocinas pelo método de ELISA	49
4.6 Estatística.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1 Controle experimental e comportamento nociceptivo por teste de formalina	51
5.2. Níveis de citocinas no cérebro.....	55
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS	65
8. ANEXOS	75
8.1. Anexo 1. Declaração de aprovação do projeto no CEUA (Comitê de Ética do Uso Animal) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília	75
8.2. Anexo 2. Termo de doação de camundongos do Biotério Central da Universidade Católica de Brasília	76
8.3. Anexo 3. Protocolo de Homogeneização de tecidos	77
8.4. Anexo 4. Protocolo de Dosagem de citocinas	82
8.5. Anexo 5. Kit comercial Invitrogen. Informação do produto	85

1. INTRODUÇÃO

A morte envolve um conjunto de processos que provocam mudanças graduais na atividade gênica celular (Pozhitkov *et al.*, 2017). O momento da morte de um organismo não promove a parada de todas as atividades celulares envolvidas em seu metabolismo, sendo possível observar um padrão e variação na expressão de genes (Pozhitkov *et al.*, 2017). Visto que existe transcrição *post-mortem*, é possível que essa expressão possa ser induzida por eventos que aconteceram no momento anterior à morte, como, por exemplo, o estímulo de dor provocado por tortura física aplicada a um indivíduo. Padrão diferenciado de expressão de genes e atividade celular influenciados por eventos que aconteceram no momento anterior à morte já foram descritos em casos de pacientes humanos que enfrentaram agonia *ante-mortem* (Li *et al.*, 2007, Pollanen, 2018). Foram observadas também modificações no padrão de expressão gênica e atividade celular como resposta a dor e stress em tecidos de organismos modelo (zebrafish e camundongo) colhidos *post-mortem* (Jardine *et al.*, 2011).

Considerando o estado da arte, neste trabalho propusemos buscar o produto de genes de citosinas, isto é, no caso as proteínas TNF- α , IL-6 e IL1- β . Estas citocinas estão envolvidas em processos inflamatórios, sendo que a produção de citocinas como resposta inflamatória ao teste da formalina já foi observada nos gânglios da raiz dorsal e na medula espinhal (Mika *et al.*, 2013), porém a produção no cérebro ainda não foi observada. A proposta aqui investigada é que o aumento de concentração das citocinas TNF- α , IL-6 e IL1- β no período *post-mortem* seria sugestivo de uma atividade celular, incluindo transcrição e tradução, após a morte declarada do organismo. A tradução *post-mortem* ainda não está descrita na literatura e, por ser um processo citoplasmático dependente de diversas moléculas e organelas, parece improvável em uma célula que esteja sofrendo autólise.

1.1. Morte e fenômenos *post-mortem*

O conceito e definição sobre o que é a morte e quais os seus efeitos sob o organismo é bastante variável a depender de qual perspectiva se observa, pois o conceito pode variar segundo diferentes culturas, religiões ou mesmo enfoques científicos (Condic, 2016, Bernat, 2009, Bowman & Richard, 2003). O tipo de morte também é um critério utilizado para a classificação da morte celular, biológica, jurídica, clínica, aparente, encefálica, molecular e morte cardiovascular são alguns dos vários termos encontrados na literatura para definição do evento morte (Condic, 2016, Gorman, 1985, Bernat, 2005). Há ainda a classificação quanto ao modo da morte: morte dita natural, , súbita ou violenta (Sanchez *et al.*, 2016, Reza *et al.*, 2001). Dessa forma, a afirmação de que um organismo está vivo ou morto depende da maneira de aplicação que se tenha do conceito de morte. Qualquer interpretação do conceito de morte é obtida a partir de critérios e provas diagnósticas. Tais critérios e provas precisam ser concisos e coesos a fim de evitar situações contraditórias, onde um organismo pode ser considerado vivo de acordo com determinados critérios ou morto de acordo com outros critérios (Sanchez *et al.*, 2016).

O termo "Tanatologia" advém do grego *thánatos*, morte, e *logia*, ciência, significando a ciência que estuda a morte e os fenômenos a ela relacionados (Sevilla-Godinez, 2009). A Tanatologia Forense é um ramo das ciências forenses responsável por estabelecer, a partir de um exame local, das informações colhidas acerca dos eventos precedidos da morte e através dos dados gerados por um exame necrópsico, uma possível identificação de cadáver, bem como os eventos que levaram ao ato da morte, a causa propriamente dita da morte e o laudo diagnóstico diferencial médico-legal, onde há a

definição do modo de morte (Fonseca & Testoni, 2011, Wittkowski *et al.*, 2015, Boyarsky *et al.*, 1992). É possível definir o conceito de morte como a parada total e permanente das funções vitais, sendo que esse não é um único momento e sim um processo gradual que acontece ao longo de um período de tempo (Condic, 2016, Pozhitkov *et al.*, 2017). A consequente ausência de oxigênio, gerando um ambiente de anóxia, promove o efeito fisiológico conhecido como autólise, onde há uma autodigestão de células e, por consequência, de tecidos e órgãos como coração e cérebro, considerados vitais para a permanência e estabelecimento da vida (Sheleg *et al.*, 2008). Cada tipo celular diferente vai reagir de forma diferente a essa privação de oxigênio e, considerando a morte vista do ponto molecular e biológico, tendo como referência o organismo como um todo, a morte não é um ato instantâneo (Sheleg *et al.*, 2008). Em uma abordagem médico-legal, este processo estende-se durante um período de tempo e evidencia o aparecimento de um conjunto de fenômenos que são objeto de estudo, análise e de interpretação. Estes parâmetros permitem revelar fatos para a conclusão de uma investigação criminal, os fenômenos *post-mortem* (Cocariu *et al.*, 2016, Donaldson & Lamont, 2013).

Os fenômenos *post-mortem*, também denominados fenômenos cadavéricos, são classificados em i. abióticos e ii. transformativos (Randall *et al.*, 1998). Os abióticos são aqueles em não se observa interferência de agentes biológicos e estão divididos em i. imediatos - perda de consciência, insensibilidade geral e dos sentidos, imobilidade e perda do tônus muscular, parada cardiorrespiratória, dilatação pupilar e ausência de circulação; e ii. tardios - desidratação, arrefecimento do corpo, livores cadavéricos, rigor mortis e flacidez cadavérica (Randall *et al.*, 1998, Lee Goff, 2009). Os fenômenos considerados transformativos são aqueles onde há uma intensa interferência de fatores biológicos e podem ser divididos em i. destrutivos - autólise e putrefação por organismos

anaeróbicos e aeróbicos; e ii. conservadores -saponificação, mumificação e corificação (Randall et al., 1998). Esses fenômenos são essenciais em abordagens e laudos médico-legal para constatação de tempo, tipo e causa de morte.

A autópsia médico-legal e necropsia fazem-se necessárias sempre que haja uma morte violenta (acidente, suicídio, homicídio), ou sempre que haja uma morte de causa indeterminada que, devido às circunstâncias em que ocorre, possa levantar suspeita de ter ocorrido a ação de um agente externo que possa ter provocado a morte, como maus tratos e tortura física (Nadesan, 1997, Ayoub & Chow, 2008, Costache *et al.*, 2014). Os médicos legistas e peritos enfrentam muitas dificuldades durante a realização de autópsias e laudos periciais, pois nem sempre é possível se estabelecer uma identificação do corpo ou identificar eventos *ante-mortem*, principalmente em casos onde os cadáveres são encontrados em estado avançado de decomposição (Pollanen, 2018). Há casos onde, apesar da experiência dos médicos que fazem a necropsia e perícia, da possibilidade e disponibilidade de recurso e dos meios auxiliares de diagnóstico adequados, a causa da morte permanece indeterminada (Costache *et al.*, 2014).

Os fenômenos *post-mortem* também podem potencialmente ser observados em nível molecular (Pozhitkov et al., 2017). O transcriptoma de tecido cerebral *post-mortem* pode oferecer novas perspectivas de abordagem na área forense de investigação, pois avaliando os genes expressos pelo tecido analisado, pode-se relacionar a resposta transcricional a resposta fisiológica (van der Linden *et al.*, 2014). Diante disso, a análise de RNA *post-mortem* tem sido usada como método de apuração de resposta a estímulos de dor e sofrimento sob a forma de expressão gênica em causas de morte em humanos (Chung *et al.*, 2012).

1.2. Ácidos nucleicos – estabilidade e funcionamento *post-mortem*

A molécula de DNA, principalmente por apresentar uma estrutura dupla fita, apresenta um nível de estabilidade maior do que outras moléculas. Demonstração desse fato é a recuperação desse ácido nucleico em tecidos tão antigos quanto 700.000 anos em permafrost (Millar & Lambert, 2013). Durante o processo de morte, o DNA está sujeito a ação de nucleases endógenas e exógenas, que quebram a molécula em fragmentos ainda menores. Devido aos dobramentos presentes e característicos da estrutura da cromatina, as histonas permanecem intactas nas primeiras horas *post-mortem*, sendo degradada as partes do DNA que se apresentam mais expostas, até que, por ação de proteases lisossomais, as proteínas da cromatina sejam degradadas (Alaeddini *et al.*, 2010). Sabe-se que no tecido cerebral *post-mortem* por exemplo, a estrutura da cromatina pode permanecer inalterada por até 30 horas (Huang *et al.*, 2006). Diferentemente do DNA, a quantidade de moléculas de RNA nas células teciduais muda mais rapidamente. Essa mudança é dependente das alterações fisiopatológicas no processo de morte e é visto que gradualmente a concentração dessas moléculas diminui após a morte. Essa diminuição dos RNAs é devida, principalmente, à degradação por ribonucleases após a morte. Os RNAs, especialmente o RNA mensageiro (mRNA), são fisiologicamente degradados nas células como controle da síntese proteica e têm tempo de vida variável (Guhaniyogi & Brewer, 2001). Os fatores e reguladores de degradação dos RNAs são um fator chave no controle da expressão gênica e uma característica aparentemente universal do metabolismo dos RNAs (Houseley & Tollervey, 2009) Após o processo de morte celular, a degradação dessas moléculas continua ocorrendo tanto por ação de ribonucleases endógenas presentes no citoplasma da célula, quanto por ribonucleases exógenas, como de bactérias ou por contaminação ambiental. Além da instabilidade devida à ação de ribonucleases, o RNA pode sofrer degradação por interferência de um conjunto de

variáveis como temperatura, umidade, pH, raios UV, entre outros (Houseley & Tollervey, 2009).

A morte de um organismo desencadeia uma cascata de eventos que, em um período de tempo relativamente curto, levam à morte celular e à autólise (Pozhitkov et al., 2017). Embora se saiba que o DNA é relativamente estável por longos períodos *post-mortem*, o RNA é muito mais variável e sensível à degradação de maneira específica para cada tipo de tecido. Existem relatos conflitantes sobre como o intervalo *post-mortem* afeta a integridade do RNA, mas vários estudos, em diferentes mamíferos, mostraram que o RNA pode permanecer praticamente intacto, mesmo por um tempo considerável, quando as amostras permanecem adequadamente armazenadas (Ferreira et al., 2018). Além disso, uma variedade de fatores *ante-mortem*, incluindo parâmetros ambientais e as circunstâncias da morte, também pode influenciar a qualidade dos tecidos coletados e das moléculas de RNA, sabe-se que a qualidade e integridade do RNA extraído afeta as medidas de expressão gênica (Ferreira et al., 2018).

Embora se saiba muito sobre os mecanismos e bases moleculares da expressão gênica dos organismos ainda vivos, há uma escassez de informações sobre o que acontece e quais os mecanismos após a morte. Diferente do esperado em decorrência do conhecimento de que as moléculas de RNA apresentam uma estabilidade muito menor do que o DNA, há um número de relatos na literatura, embora ainda reduzido, sobre a persistência de RNA *post mortem* e sua degradação ao longo do tempo *post mortem*, assim como a transcrição após a morte declarada. Tem sido relatado que centenas de transcritos aumentam em abundância nos órgãos e tecidos de vertebrados após a morte, o que pode, potencialmente ser uma resposta à morte do organismo, assim como,

potencialmente, a eventos anteriores a morte (Pozhitkov et al., 2017, Ferreira et al., 2018).

Exemplos de estudo dessa natureza podem ser vistos em Pozhitkov et al. (2017) que analisaram perfis de transcrição gênica *post-mortem* em peixes-zebra (*Danio rerio*) e camundongos (*Mus musculus*). Os autores observaram que aproximadamente 99% dos genes transcritos apresentaram um decréscimo significativo em até 30 minutos após a morte, após o qual continuou a diminuir de maneira mais vagarosa com passar do tempo *post-mortem*. A diminuição da abundância de transcritos reflete a degradação e / ou a regulação negativa dos genes. No entanto, cerca de 1% dos transcritos (548 no peixe-zebra e 515 no camundongo) aumentaram significativamente em relação a controles em até 48-96 horas *post-mortem* (Pozhitkov et al., 2017). O aumento de transcrito pode ser devido à transcrição ativa e / ou à regulação pós-transcricional dos transcritos que envolve proteínas de ligação a RNA (RBPs) e RNAs não codificantes (ncRNAs) que formam complexos e regiões de estrutura secundária nos RNAs (Ferreira et al., 2018).

Durante a morte de um organismo, aqui definida como a cessação do sistema homeostático altamente elaborado em vertebrados, acredita-se que há perdas graduais das redes reguladoras do sistema homeostático, bem como a ativação de genes reguladores envolvidos na sobrevivência e na compensação do estresse fisiológico causado pela morte. Dessa forma acredita-se que os níveis de RNA medidos em amostras de tecido *post-mortem* são afetados tanto pela degradação do RNA, que ocorre como consequência da morte celular, quanto pelas respostas biológicas à morte do organismo, como expressão gênica. Com o aumento na abundância de transcrições *post-mortem* que ocorreu em peixes-zebra e camundongos, é razoável sugerir que outros eucariotos multicelulares poderão também exibir um fenômeno semelhante (Pozhitkov et al., 2017).

Faz-se razoável também conjecturar a possibilidade de que em período *post-mortem* esses transcritos sejam traduzidos em produtos finais, como proteínas. Compreender como esses efeitos acontecem no intervalo *post-mortem* é essencial para o uso adequado da utilização de expressão gênica *post-mortem* como um parâmetro de comparação para os níveis de expressão gênica fisiológica *ante-mortem*.

1.3. Dor e nocicepção

Dor é um fenômeno complexo e multifatorial que é definido, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor - IASP, como: uma experiência sensorial e emocional desagradável que provoca desconforto e que está relacionada a lesões reais ou potenciais (Yaksh *et al.*, 2015, Loeser & Treede, 2008). O conceito de dor é de difícil definição devido à sua natureza subjetiva de autoavaliação, que engloba aspectos sensoriais, emocionais, cognitivos e, até mesmo, componentes sociais (Williams & Craig, 2016, Craig, 2015, Hadjistavropoulos *et al.*, 2011). Existem muitos fatores que podem influenciar na forma como a dor é percebida, podendo variar na sua intensidade, duração, frequência e local (Yaksh *et al.*, 2015).

Quando se questiona qual a vantagem evolutiva do fenômeno da dor, postula-se que os organismos vivos ao longo do processo de evolução mantiveram mecanismos de sentir o meio onde se localizavam. Esses mecanismos de percepção de dor possibilitaram uma demarcação para os limites suportados pelo organismo, evitando estímulos lesivos originários do meio externo (Bonavita & De Simone, 2011, Crook *et al.*, 2014). Dessa forma, a dor é um alerta sensorial sob uma lesão tecidual levando a mecanismos de defesa ou fuga (Costigan *et al.*, 2009), constitui um sistema de defesa do organismo e é condição fundamental para a sobrevivência (Price & Dussor, 2014).

Por outro lado, nocicepção é o termo usado para descrever como a dor se torna uma experiência consciente através da percepção dos sinais dolorosos reconhecidos pelo sistema nervoso (Dubin & Patapoutian, 2010). Um nociceptor é uma terminação nervosa livre que é preferencialmente sensível a um estímulo nocivo ou a um estímulo que pode se tornar nocivo quando em longa exposição (Gold & Gebhart, 2010). Os nociceptores são um conjunto altamente especializado de neurônios sensoriais primários que são capazes de converter os estímulos em impulsos nervosos, que o cérebro interpreta para produzir a sensação de dor (Gold & Gebhart, 2010, Pinho-Ribeiro *et al.*, 2017).

A nocicepção está diretamente associada ao componente fisiológico da dor, que engloba os processos de transdução, transmissão, percepção e modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo (Ellison, 2017, Gold & Gebhart, 2010). **(Figura 1)** A transdução é o primeiro dos quatro processos que ocorrem na nocicepção. Ocorre quando um estímulo nocivo, seja ele térmico, mecânico ou químico, ultrapassa o limiar de estímulo mínimo necessário sendo, então, convertido em uma atividade elétrica nas terminações nervosas das fibras sensoriais dos nociceptores (Ellison, 2017). Isso é decorrente da despolarização de membrana da célula que gera assim um diferencial de potencial capaz de resultar em um potencial de ação (Gold & Gebhart, 2010). O potencial de ação produz a transdução do sinal que percorre os nociceptores primários e então é transmitido sequencialmente para a medula espinal, tronco cerebral, tálamo e por fim o córtex cerebral (Ellison, 2017).

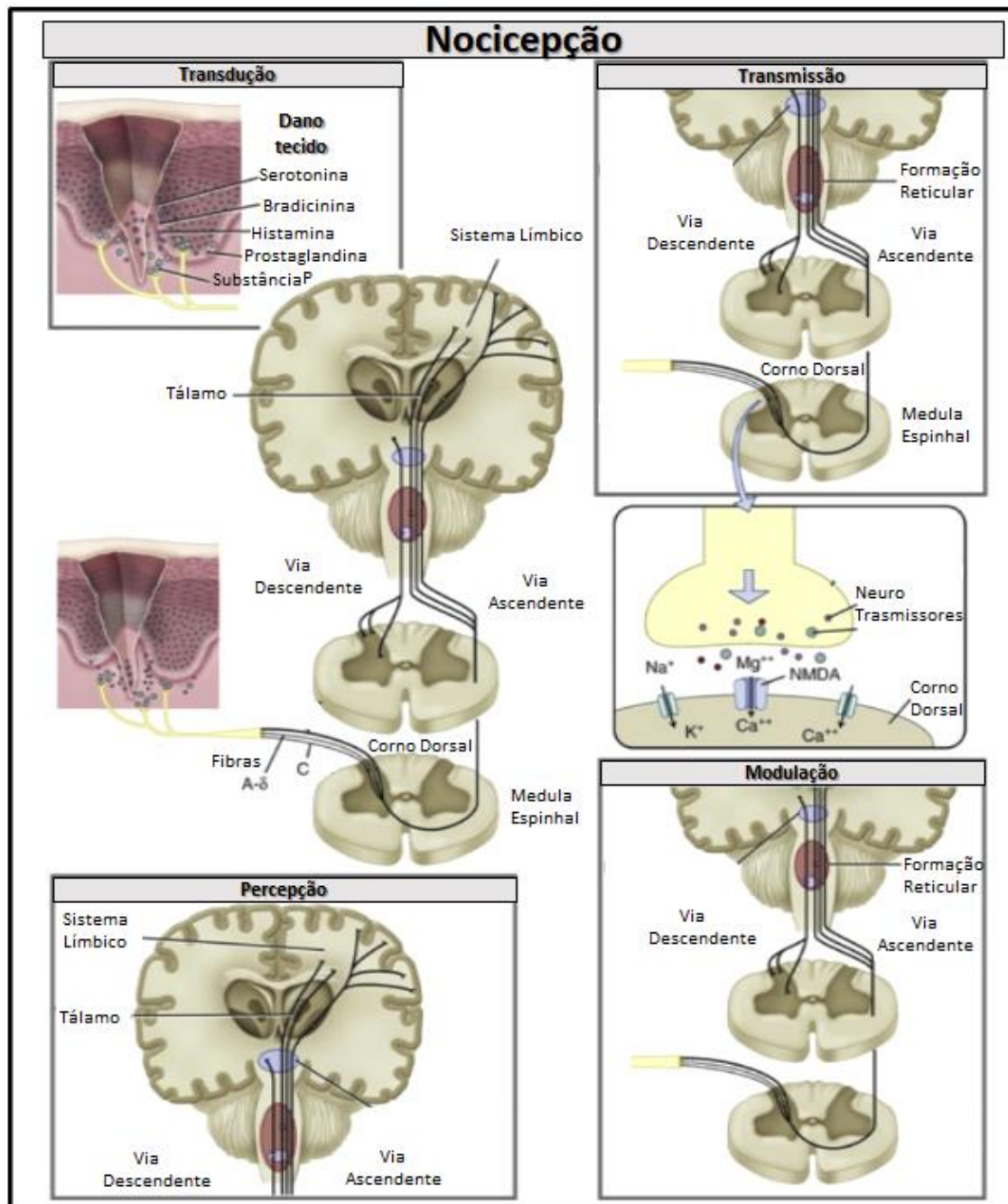


Figura 1. Fisiologia da nociceção. Processos de transdução, transmissão, percepção e modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo. Figura adaptada de: (Ellison, 2017).

Dentre os nociceptores estão as fibras aferentes A δ e C (Vanderah, 2007). As fibras A δ diferentemente das fibras C são mielinizadas e, portanto, permitem uma condução de sinal mais rápida (Dubin & Patapoutian, 2010). Elas possuem um diâmetro maior e estão relacionadas com resposta a estímulos térmicos e mecânicos (Fruhstorfer *et*

al., 2003, Woolf & Ma, 2007). Transmitem a sensação de dor bem localizada e de intensidade aguda rápida (Ellison, 2017). As fibras C são polimodais, respondendo a estímulos químicos, mecânicos e térmicos (Woolf & Ma, 2007). As fibras C transmitem sensação de dor mais prolongada e ligeiramente menos intensa como resultado do dano agudo (Ellison, 2017). Os nociceptores polimodais respondem a uma variedade de mediadores inflamatórios como: 5-hidroxitriptamina, citocinas, bradicinina, histamina, prostaglandinas e leucotrienos (Dubin & Patapoutian, 2010).

Em sequência a transdução, a transmissão é o processo onde os potenciais de ação gerados nos nociceptores são transmitidos através da liberação de neurotransmissores nas fendas sinápticas interligadas à neurônios de segunda ordem presentes na substância gelatinosa do corpo dorsal da medula espinhal no sistema nervoso central (Vanderah, 2007). Uma vez que o estímulo doloroso atinge a medula espinhal, este pode ser transmitido aos neurônios de terceira ordem, também chamados de neurônios de projeção, ou suprimido na região do corno dorsal da medula (Vanderah, 2007). A esse fenômeno denomina-se modulação. Dessa forma, a transmissão de estímulos nociceptivos através do corno dorsal da medula será o resultado dos neurotransmissores excitatórios e inibitórios liberados e dos respectivos receptores ocupados nos neurônios de segunda ordem e de projeção bem como pela ativação de células da glia, principalmente a microglia e astrocitos (Fields *et al.*, 1991). O estímulo doloroso é então projetado através de uma rota ascendente para o córtex somatossensorial e para outras áreas do encéfalo como o tálamo, sistema límbico, formação reticular e mesencéfalo, onde uma resposta integrada aos estímulos da dor será percebida e por fim interpretada (Ellison, 2017).

A dor pode surgir de uma lesão em diferentes tecidos, atingindo o SNC ou periférico e pode ser classificada como dor nociceptiva ou neuropática e dependendo do

fator temporal ser classificada entre dor aguda ou dor crônica (Woolf, 2010). Dor nociceptiva compreende o processamento neural típico da dor que ocorre na ativação das terminações nervosas livres mediante dano tecidual ou inflamação. A dor aguda é uma resposta de dor nociceptiva imediata do organismo e está relacionada ao processo adaptativo biológico de alerta sobre lesões e doenças (Woolf, 2010). Dor neuropática desenvolve-se quando há lesões ou disfunções em neurônios, nas vias descendentes e modulatórias do sistema nervoso central ou periférico, podendo ocorrer devido à: infecções virais, traumas, agressões, ingestão de certos medicamentos ou metabólitos estranhos ao corpo, doenças neurodegenerativas e convulsões (Cohen & Mao, 2014). A dor crônica age como uma dor neuropática que persiste mesmo após o tempo normal de melhora e recuperação e, portanto, destoa da dor aguda por não possuir a função de alerta de nocicepção fisiológica (Treede *et al.*, 2015). A persistência da dor aguda pode ser um fator no desenvolvimento da dor crônica, uma vez que o estágio crônico da dor pode se manifestar devido a uma falta de tratamento adequado a uma lesão tecidual favorecendo a persistência de ativação de vias não relacionadas à mediação de dor em condições normais. Estas vias passam a participar da nocicepção acarretando hiperalgesia, ou seja um aumento da sensibilidade aos estímulos dolorosos, bem como sofrimentos permanentes (Crofford, 2015).

Apesar de numerosos estudos, o mecanismo molecular relacionado ao desenvolvimento e a persistência da dor crônica neuropática permanecem ainda bastante desconhecidos. Estudos envolvendo a análise da expressão de genes e espectrometria de massa sugerem que a dor crônica está associada à uma forte ativação de certos genes neuronais, bem como genes associados às respostas das células imunes, incluindo células da neuroglia (Mika *et al.*, 2013). Sabe-se que as células da neuroglia contribuem para os mecanismos da dor neuropática e são hoje um alvo de estudo e desenvolvimento de

imuno moduladores capazes de amenizarem os efeitos da dor neuropática crônica (Costigan et al., 2009).

1.4. Glia e neuroinflamação

Neurônios e células da glia são os dois tipos celulares do sistema nervoso. A glia corresponde a um conjunto de células especializadas encontradas tanto no sistema nervoso periférico quanto no sistema nervoso central (SNC). As células da glia presentes no sistema nervoso periférico são células de Schwann, satélite e perineural, enquanto que as células encontradas no SNC são astrócitos, oligodendrócitos, microglia e células perivasculares (Jha *et al.*, 2012). As células da glia, que também são conhecidas na literatura como neuroglia, são subdivididas em duas principais categorias: a microglia, que corresponde de 5% a 10% da população de células da glia, e a macroglia; juntas correspondem a 70% da população total de células do cérebro e da medula espinhal (Vallejo *et al.*, 2010).

As células da glia tem como principais funções fornecer suporte estrutural para o cérebro, contribuindo para o desenvolvimento, reparo e manutenção do sistema nervoso, pelo fornecimento de nutrientes e metabólitos para os neurônios. Estas células proporcionam aos neurônios a manutenção de sua correta atividade metabólica, destruindo e removendo células mortas e com mal funcionamento. Diferentemente dos neurônios, as células da glia não conduzem impulsos eletroquímicos e, talvez por isso, passaram por muito tempo despercebidas por esquecimento ou negligência nos estudos relacionados à neurociência (Jha et al., 2012). A glia regula a vascularização no cérebro atuando na barreira hematoencefálica e tem papel fundamental em processos de isquemia e enxaquecas (Weir & Cader, 2011). Sua função no reparo dos neurônios após uma lesão

tem relação primordial em neuropatologias e doenças neurodegenerativas (Sloan & Barres, 2013). As células da microglia assumem papel de macrófagos quando ativadas e desempenham função de proteção. Porém, em situação de desequilíbrio da sua atividade, a microglia pode também gerar dano aos neurônios (Jha et al., 2012).

Além das funções de suporte e manutenção, determinadas células da glia também estão envolvidas com a modulação de neurotransmissores em nível sináptico (Rial *et al.*, 2015). A microglia, bem como os oligodendrócitos e astrócitos, tem função substancial nos processos de desenvolvimento, propagação e potencialização de neuroinflamação e da dor neuropática, bem como desempenham um papel crucial na manutenção da homeostase neuronal no sistema nervoso central (Vallejo et al., 2010). Regular a atividade da glia pode ser uma alternativa para controlar a dor neuropática (Costigan et al., 2009).

A neuroinflamação é um processo normal que ao ocorrer na fase aguda de dor tende a permanecer controlada. Porém, durante uma fase crônica de dor, a neuroinflamação é prejudicial quando se manifesta de forma conjunta com doenças como por exemplo esclerose múltipla (EM), esclerose lateral amiotrófica (ELA), diferentes tipos de demência e doença de Huntington (Lois *et al.*, 2018). Várias doenças neurodegenerativas estão associadas a um processo crônico de neuroinflamação como Alzheimer, Parkinson, EM e ELA (Jha et al., 2012). E embora não sejam o princípio de geração nessas doenças, alguns estudos indicam que a constante resposta de inflamação pela microglia e astrócitos contribui para a progressão das mesmas (Reemst *et al.*, 2016). A microglia e astrócitos quando ativados estão relacionados a liberação de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) para induzir a síntese e liberação de mediadores pró inflamatórios como citocinas nas suas formas IL-1 β , TNF- α e IL-6,

contribuindo para um processo de cascada imunológica no SNC (Hanisch, 2002) (**Figura 2**). Há um mecanismo para neuroproteção, onde por meio da ativação neuroimunológica, leucócitos são encaminhados para a área de lesão. É possível definir neuroinflamação como esse processo da presença e ativação de células imunes de regiões periféricas no local da lesão em resposta a um dano causado ao SNC ou periférico (Jha et al., 2012). É possível ainda definir a dor, levando em consideração esse aspecto, como um distúrbio neuro-imune, uma vez que se sabe que a ativação do sistema imunológico e das células gliais nos gânglios da raiz dorsal e na medula espinhal resultam na liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias, bem como mediadores algésicos e analgésicos (Mika et al., 2013).

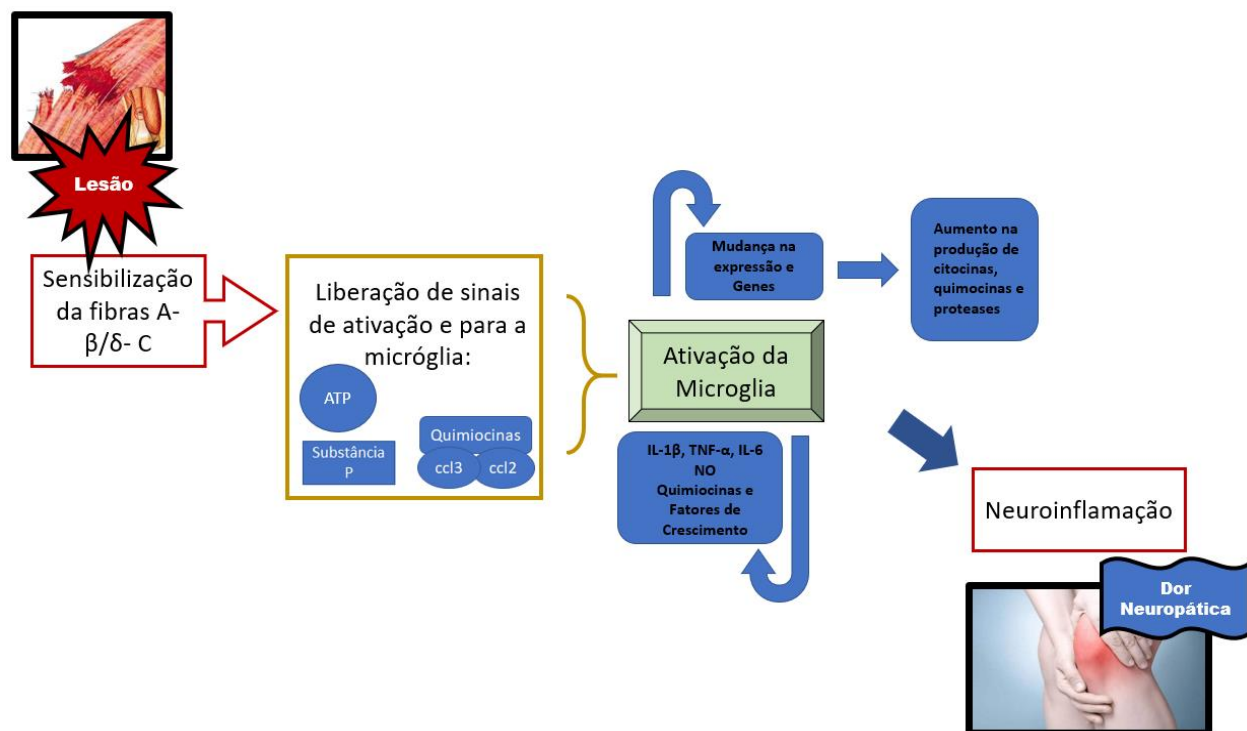


Figura 2. Diagrama demonstrando os aspectos envolvidos a partir de uma lesão onde há o início de um quadro de neuroinflamação e, por consequência, dor neuropática. Uma lesão tecidual promove a sensibilização dos nociceptores locais, as fibras A β/δ e C. À sensibilização das fibras ocorre a liberação local de sinais de ativação para a microglia: ATP, Quimiocinas e a Substância P. A microglia, uma vez ativada, produz mudança na expressão de genes relacionados à produção de citocinas, quimiocinas e proteases. Células da microglia localizadas próximas ao local

da lesão são ativadas e passam a interagir em nível molecular com o neurônio lesionado, liberando vários agentes neuroinflamatórios (IL-1 β , TNF- α , IL-6, ROS- NO, Quimiocinas e fatores de crescimento). A ativação da microglia em conjunto com a ativação de astrócitos proporciona a despolarização da membrana do neurônio afetado o que faz aumentar a sua sensibilidade e potencializa os estados de neuroinflamação e dor neuropática. Figura adaptada de: (Jha et al., 2012).

1.5. Citocinas pró-inflamatórias

As citocinas (grego “*cyto*” (célula) e “*kinos*” (movimento)) são polipeptídeos extracelulares hidrossolúveis ou glicoproteínas (5–140 kDa) que são produzidas por diversos tipos celulares no local de uma lesão. São produzidas predominantemente por macrófagos ativos e estão envolvidas na regulação das reações inflamatórias, sendo assim fundamentais na resposta de vários processos que o organismo dispõe para combater agentes externos, conduzindo a resposta imune inata e sendo fundamentais para a sobrevivência do organismo (Clark *et al.*, 2013). Tipos diferentes de células secretam a mesma citocina, e uma única citocina pode afetar vários tipos de células, isto é, as citocinas apresentam um carácter pleiotrópico. As citocinas são redundantes em suas atividades, ou seja, ações e funções semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes tipos de citocinas (Zhang & An, 2007). As citocinas são organizadas em várias classes sendo elas: interleucinas (IL), fatores de necrose tumoral (TNF), interferons (IFN), fatores transformadores de crescimento e quimiocinas (Holdsworth & Gan, 2015). Elas também são classificadas de acordo com a homologia estrutural de seus receptores como citocinas classe I ou classe II (Liongue *et al.*, 2016). As famílias de citocinas podem ter nomes diferentes de acordo com outros aspectos como o compartilhamento de uma subunidade receptora, por exemplo a família gp130, ou seus papéis fisiológicos como por exemplo, a família neuropoiética, por seus efeitos no sistema hematopoiético e nervoso (Erta *et al.*, 2012).

As citocinas influenciam os mecanismos intracelulares dos processos de modulação uma vez que elas se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam transcrição de genes (Bezradica & Medzhitov, 2009). Após uma citocina se ligar ao seu receptor específico ligado à membrana, uma cascata de fosforilação de proteínas de sinal expressas constitutivamente ocorre dentro da célula. Estas proteínas migram pelo citoplasma, e caso elas possuam uma sequência de localização nuclear ou se liguem a uma proteína com essa sequência, podem alcançar o núcleo celular. No núcleo ou citoplasma, podem influenciar a taxa de transcrição ou induzir alterações pós-traducionais (O'Shea & Murray, 2008). MAPK, c-jun e c-fos são exemplos de proteínas de sinal intracelular envolvidas na nocicepção e dor (Liu *et al.*, 2018). As proteínas de sinal também estão envolvidas nas vias de sinalização intracelular de várias citocinas, assim as citocinas atuam frequentemente em cascata, ou seja, uma citocina estimula suas células-alvo para produzir mais citocinas. Portanto, citocinas influenciam a atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência de células imunes, bem como regulam a produção e atividade de outras citocinas podendo aumentar (pró-inflamatório) ou diminuir (anti-inflamatório) a resposta inflamatória (de Oliveira *et al.*, 2011). Ainda, as citocinas podem ser pró- ou anti-inflamatórias, sendo que, isso varia de acordo com sua especificidade e o microambiente ao qual estão localizadas. Entre as citocinas ditas pró-inflamatórias estão IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Entre as citocinas que apresentam carácter anti-inflamatório estão a IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β (Zhang & An, 2007).

1.5.1. A Família das interleucinas-1

A superfamília da citocina IL-1 consiste em 11 membros, incluindo sete ligantes com atividade agonista (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β e IL-36 γ), três antagonistas de receptores (IL-1Ra, IL-36Ra e IL-38) e uma citocina anti-inflamatória

(IL-37). Todos os membros agonistas desta família, ou seja, todos os membros que são capazes de se ligar a um receptor celular específico e ativá-lo para provocar uma resposta biológica, mostram atividade pró-inflamatória (Dinarello, 2018). Essas citocinas compartilham uma estrutura tridimensional C-terminal comum, com uma dobra típica de β -trefoil, consistindo em 12- β -strands conectadas por 11 loops e com posicionamento idêntico de certos íntrons. Por isso é plausível pensar que elas provavelmente surgiram da duplicação de um gene ancestral comum (Dinarello, 2018).

A IL-1 β é sintetizada primeiramente como um precursor biologicamente inativo de 31 kDa, o pro-IL-1 β . A maturação e liberação da IL-1 β é um processo fortemente regulado, exigindo a clivagem de pro-IL-1 β na citocina biologicamente ativa por intermédio de caspase 1 (Lopez-Castejon & Brough, 2011). Uma vez em sua forma ativa, a interleucina-1 β é uma citocina agonista pró-inflamatória pequena (17,5 kDa) que é sintetizada principalmente por linfócitos CD4 + T auxiliares, monocitos e macrófagos, bem como por células não imunes, como fibroblastos, células endoteliais, microglia e astrócitos no sistema nervoso central, durante lesão celular, infecção e inflamação (Lopez-Castejon & Brough, 2011). A IL-1 β está associada a uma série de efeitos biológicos nos alvos celulares quando formado o complexo de sua interação com IL-1 α e com o receptor 1 da IL-1 (IL-1R1). Esse receptor é expresso em neurônios de muitas áreas do sistema nervoso central, incluindo a amígdala, que é um importante centro de processamento da dor e do estresse (Yu & Shinnick-Gallagher, 1994). O complexo de IL-1 β e IL-1 α ligados ao receptor IL-1R1 recruta um co-receptor, denominado proteína acessória (IL-1RAcP) e juntos eles formam um complexo heterodimérico (**Figura 3**). A sinalização que viabilizará uma variedade de atividades inflamatórias é iniciada pelo recrutamento da proteína adaptadora MYD88 no receptor toll-IL-1 (TIR), que é seguido pela fosforilação de quinases, pela translocação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) ao

núcleo e pela expressão de genes ligados à inflamação (Garlanda *et al.*, 2013). A IL-1Ra é um antagonista à ação desse complexo ligando-se ao mesmo receptor. É sintetizada pelas mesmas células que produzem IL-1 α e IL-1 β . A ligação da IL-1Ra ao receptor não envolve alteração conformacional e, portanto, o co-receptor IL-1RAcP não precisa ser recrutado. Dessa forma IL-1Ra regula a atividade da IL-1, porém para bloquear de forma eficiente a resposta da IL-1, ela deve estar presente em uma quantidade aproximadamente 100 vezes maior que as citocinas agonistas (Garlanda *et al.*, 2013).

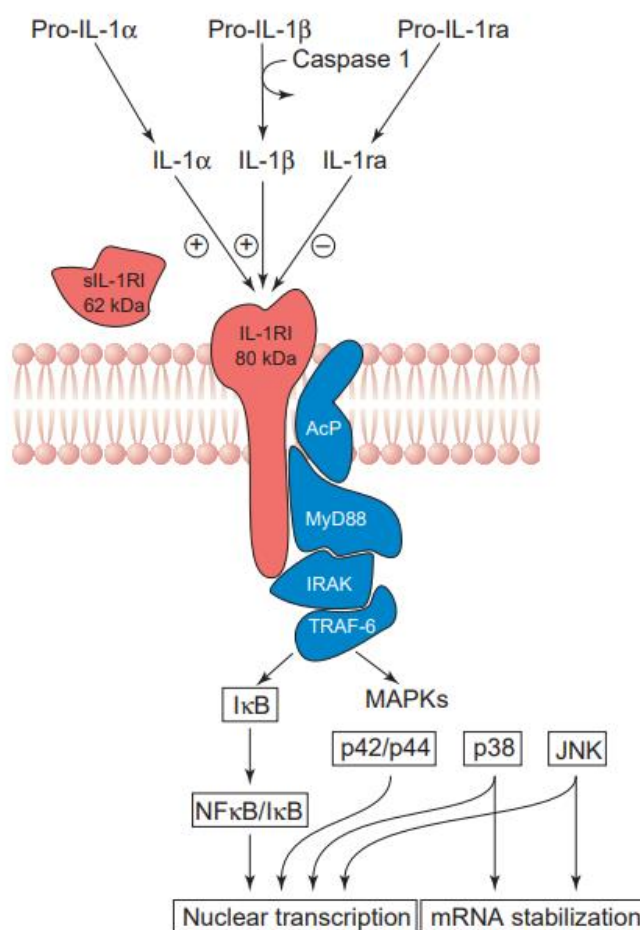


Figura 3. Ação da interleucina 1. Membros da família IL-1 incluindo ligantes (IL-1a, b), o antagonista (IL-1ra) e o receptor (tipo I). Abreviações: AcP, proteína acessória; MAP, proteína ativada por mitogênio; IRAK, quinase associada ao receptor de interleucina-1; TRAF, fatores associados ao receptor do fator de necrose tumoral; NF- κ B, fator nuclear- κ B; JNK, quinase c-jun n- terminal. Figura adaptada de: (Rothwell & Luheshi, 2000).

O envolvimento da IL-1 β na sinalização da dor neuropática é evidenciado por diversos estudos, sendo que IL-1 β pode produzir hiperalgesia após sua injeção direta de forma intraperitoneal, intracerebroventricular ou intraplantar (Binshtok *et al.*, 2008). Foi uma das primeiras citocinas a ser relacionada aos mecanismos de dor neuropática induzida por lesão de nervo periférico em roedores. Camundongos sem IL-1 β e IL-1 α mostram uma redução significativa na hipersensibilidade mecânica em dois modelos de lesão nervosa periférica: ligação do nervo espinhal e constrição crônica do nervo ciático (Honore *et al.*, 2006). Em muitos modelos animais para dor neuropática, a expressão de IL-1 β é aumentada no nervo ciático lesionado, nos gânglios da raiz dorsal e na medula espinhal, sendo isso relacionado com a ativação da microglia e dos astrócitos no sistema nervoso central (Stemkowski *et al.*, 2017). Em um estudo observou-se que uma lesão nervosa promoveu a ativação de células da microglia e astrócitos na medula espinhal e essa ativação resultou em um aumento de 15 vezes nos níveis de IL-1 β (Whitehead *et al.*, 2010). Sob condições normais, os níveis de expressão de IL-1 β são muito baixos e não tem efeito neurotóxico no tecido cerebral (Whitehead *et al.*, 2010).

1.5.2. Interleucina-6

A interleucina-6 (IL-6) é uma glicoproteína que possui entre 22-27 kDa, que é o membro fundador das neuropoietinas, um grupo de citocinas estruturalmente relacionadas, que incluem IL-6, IL-11, IL-27, IL-31, fator inibidor da leucemia, oncostatina M, cardiotrofina -1, neuropoietina e citocina tipo cardiotrofina (Erta *et al.*, 2012). Essas citocinas neuropoietinas se ligam a receptores de citocina classe I que são proteínas de membrana com uma arquitetura caracterizada por não possuir atividade enzimática intrínseca e assim, para sinalização, geralmente precisam recrutar proteínas receptoras adicionais compartilhadas por diferentes citocinas: gp130, βc ou γc (Erta *et al.*, 2012).

IL-6 é uma citocina pró-inflamatória com amplos efeitos biológicos. Essa interleucina é um dos primeiros e importantes mediadores da indução e controle da síntese e liberação de proteínas em fase aguda pelos hepatócitos durante estímulos dolorosos, como trauma, infecção, cirurgia e queimaduras. Após uma lesão, o plasma apresenta concentrações de IL-6 que são detectáveis em 60 minutos, com um pico entre 4 e 6 horas e pode persistir por até 10 dias após a lesão. Quando a IL-6 atinge uma célula-alvo, ela se liga ao seu receptor específico sIL-6R (gp80) (Lee *et al.*, 2011). O complexo IL-6 / sIL-6R(gp80) é responsável pela homodimerização do transdutor de sinal transmembranar gp130. Como resultado, há uma cascata intracelular de fosforilação de várias proteínas de sinal induzindo a dimerização e sinalização. O fator gp130 solúvel (sgp130) é um inibidor natural da IL-6 em sinalização trans, impedindo que o complexo agonístico de IL-6 – sIL-6R interaja com gp130 ligada à membrana (**Figura 4**). Ao contrário da gp130, a IL-6R é restrita a alguns tipos de células, como hepatócitos, megacariócitos, neutrófilos, macrófagos, leucócitos e os trofoblastos. Também é encontrado em um subconjunto de células T, mas há evidências de que as células T respondem à IL-6 predominantemente através do processo de sinalização trans. As células endoteliais e os fibroblastos não expressam a IL-6R e acredita-se também que respondem à IL-6 através da sinalização trans (Barnes *et al.*, 2011). A interleucina-6 promove maturação e ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos, e diferenciação /manutenção de linfócitos T citotóxicos e células NK (Lee *et al.*, 2011). Além disso, ativa astrócitos e a microglia, e regula a expressão de neuropeptídeos após uma lesão neuronal, contribuindo para sua regeneração (Zhou *et al.*, 2016).

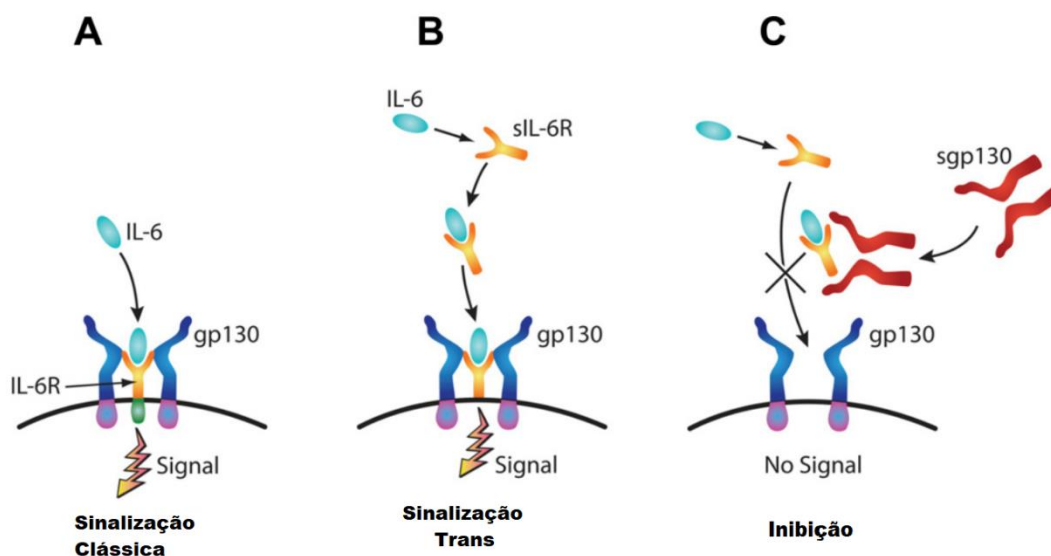


Figura 4. Diagrama que ilustra as vias de sinalização da IL-6. (A) Na via de sinalização trans, a IL-6 liga-se ao sIL-6R. O complexo IL-6 – sIL-6R permite a ativação de células que expressam gp130. (B) A molécula antagonista sgp130 bloqueia seletivamente a sinalização trans. Figura adaptada de: (Lee et al., 2011)

1.5.3 TNF- α

O TNF- α é sintetizado como uma proteína transmembrana do tipo II de 26 kDa e forma uma molécula homotrimérica estável (mTNF- α) para exercer suas atividades biológicas. A molécula pode ser processada por clivagem proteolítica pela enzima de conversão de TNF- α (TACE / ADAM17) em uma proteína monomérica de 17 kDa, que também é biologicamente ativa como uma molécula homotrimérica solúvel de 51 kDa (sTNF- α) (Leung & Cahill, 2010). É produzida por macrófagos ativados e outras células como linfócitos T e B, células NK, células ativadas por linfocinas, células endoteliais ou células musculares lisas. O TNF- α induz várias respostas celulares por meio de sua interação com dois receptores transmembranares distintos, o receptor TNF de 55 kDa tipo I (TNFR1) e o receptor TNF de 75 kDa tipo II (TNFR2). Sob condições fisiológicas normais, o TNFR1 é constitutivamente expresso em vários tipos de células e tecidos,

enquanto o TNFR2 é predominantemente expresso em baixos níveis nas células imunes e nas células endoteliais. Os níveis de TNF- α são elevados em condições inflamatórias e a sua presença, portanto, pode indicar um processo inflamatório contínuo. TNF- α desempenha um papel importante na etiologia de distúrbios neurodegenerativos, como isquemia / acidente vascular cerebral isquêmico, EM e DA (Urbano *et al.*, 2014). Durante a resposta inflamatória, essa citocina pode atuar por meio da ligação aos receptores transmembrana TNFR1 e 2 em algumas células do sistema imunológico, transmitindo sinais para: sobrevivência celular (inibidores de apoptose) e vias de inflamação. A TNF- α solúvel se liga aos receptores TNFR1 e 2, resultando na captação das proteínas TRADD, RIP1 e TRAF2, formando o Complexo I. Quando esse complexo se dissocia, os domínios de morte celular (DD) de TRADD e RIP1 são liberados e se ligam ao FADD. O FADD, por sua vez, recruta as caspases 8 e 10, formando o Complexo II e culminando em apoptose. Se o NF- κ B for ativado, promovido pelo Complexo I, haverá uma produção acentuada de FLIPL, inibidor que bloqueia a caspase 8, impedindo a apoptose, promovendo a sobrevivência e a produção de citocinas inflamatórias (Urbano *et al.*, 2014) (**Figura 5**).

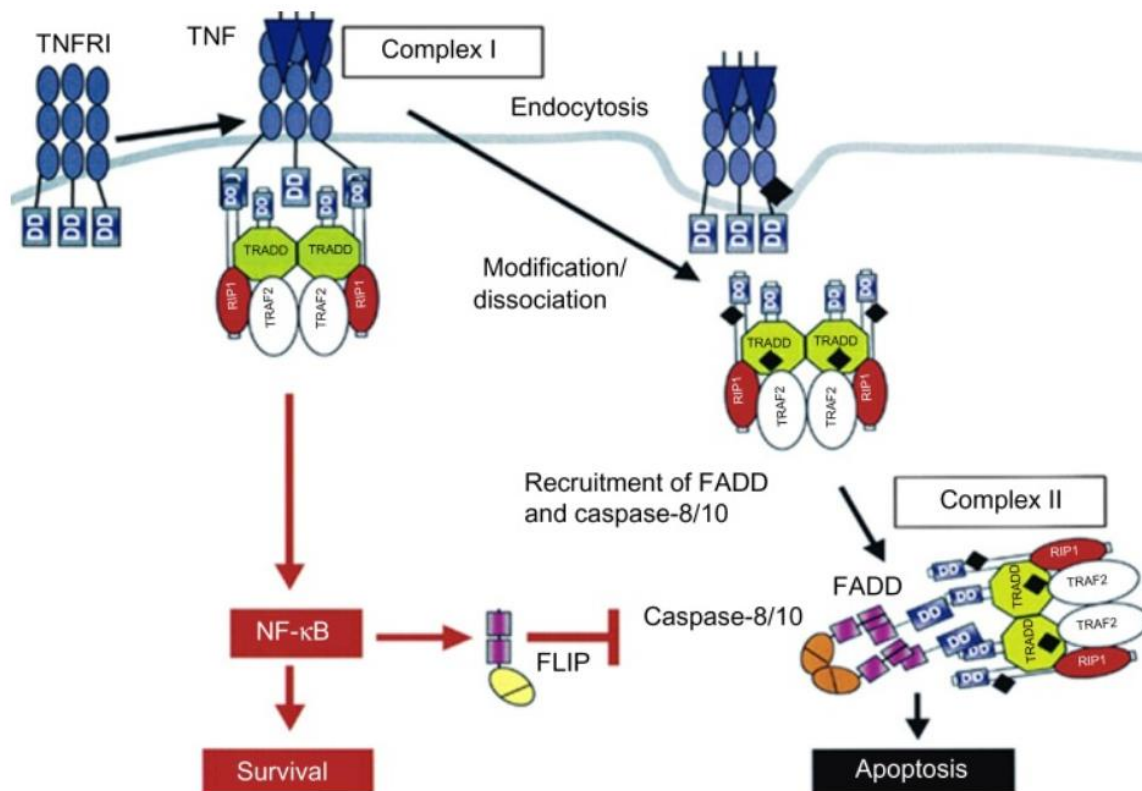


Figura 5. Vias de sinalização da citocina TNF- α . TNF- α pode atuar por meio da ligação aos receptores transmembrana TNFR1 e 2 transmitindo sinais para: sobrevivência celular (inibidores de apoptose) e vias de inflamação. Figura adaptada de: (Urbano et al., 2014)

TNF- α inicia várias vias de sinalização por meio da ativação do fator nuclear (NF) - κ B, que induz a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias, desencadeando uma cascata inflamatória (Granados-Soto *et al.*, 2001). Outras ações do TNF- α incluem ativar a coagulação, estimular a expressão ou liberação de moléculas de adesão, PGE₂, fator de ativação plaquetária, glicocorticóides e influenciar a apoptose (Leung & Cahill, 2010).

1.6. Avaliação nociceptiva: teste da formalina e ativação da microglia

A avaliação de dor em animais é complexa, influenciada pelo meio ambiente e pela atividade psíquica do animal. Apesar de existir grandes diferenças entre as espécies, analogias servem como um guia para reconhecer a dor entre as várias espécies animais. Isso é possível porque a dor e o limiar de nocicepção para estímulos mecânicos, térmicos ou químicos nas diferentes espécies são similares (Smith & Lewin, 2009).

O teste da formalina foi inicialmente desenvolvido pelos pesquisadores Dubuisson e Dennis (1977) e desde então diversos estudos vêm utilizando o teste para avaliar respostas relacionadas à nocicepção (Hunskar & Hole, 1987, Dubuisson & Dennis, 1977, Salinas-Abarca *et al.*, 2017, Hassani *et al.*, 2015). Dentre as metodologias mais utilizados para avaliar nocicepção, o teste de formalina se destaca. Diferentemente dos outros testes, como os testes de retirada de cauda (Tail-Flick) e placa quente (Hot-Plate), o teste de formalina proporciona a possibilidade de observar a resposta comportamental do animal a uma nocicepção de caráter bifásico, contínua e de característica aguda inflamatória gerada por um tecido lesionado (Tjolsen *et al.*, 1992, Erami *et al.*, 2017). Devido a estas características, acredita-se que este teste produza um modelo mais válido de dor clínica do que os testes de caráter fásico ou de estímulo térmico (Coderre & Melzack, 1992). Muitos estudos já usaram o teste da formalina como modelo de dor inflamatória aguda e tônica, incluindo estados de dor inflamatória e crônica (Coderre & Melzack, 1992, Coderre *et al.*, 1990, Erami *et al.*, 2017, Salinas-Abarca *et al.*, 2017).

Neste modelo, uma solução de até 5% de formaldeído é injetada subcutaneamente na pata traseira do camundongo para produzir uma resposta de nocicepção bifásica durante um período de teste de 40 minutos (Rosland *et al.*, 1990). A primeira fase, de 0

a 5 minutos após a injeção de formalina, é chamada de fase neurogênica, na qual ocorre ativação direta dos nociceptores pela formalina e corresponde a uma dor aguda (Hunskar & Hole, 1987, Coderre et al., 1990). Há então um interfase, onde não se observam comportamentos de nocicepção, e que é logo precedida por uma segunda fase, a nocicepção inflamatória, que envolve transmissão sináptica reforçada pela medula espinhal, bem como pela liberação dos mediadores inflamatórios locais, como prostaglandinas, serotonina, histamina, bradicinina e citocinas (de Mesquita Padilha *et al.*, 2009, Coderre et al., 1990). A determinação e quantificação da resposta à nocicepção inclui contagens por unidade de tempo de reações ao estímulo por lambidas, contrações, elevação ou agitação da pata injetada do animal (Sufka *et al.*, 1998).

Sabe-se que a aplicação subplantar de formalina em animais induz a ativação da microglia nos gânglios da raiz dorsal e na medula espinhal e isso acontece por meio da ativação de p38 que desempenha um papel fundamental na modulação presente no processo nociceptivo da dor (Li *et al.*, 2010). Não há estudos correlacionando a aplicação de formalina subplantar com um possível processo de ativação da microglia em cérebro de *Mus musculus*. Observar isso ajudaria a entender ainda mais as suas contribuições da ativação da microglia para os estágios agudos e crônicos da dor.

2. JUSTIFICATIVA

Aparentemente, células de um organismo declarado morto continuam a exercer atividades mesmo após o início da autólise celular. Considerando que essa atividade inclui nova produção genica, pergunta-se se o próprio corpo poderia nos informar sobre o que passou antes de morrer pela avaliação molecular, o que poderia complementar análises de antropologia física.

Um dos últimos tecidos animais a ser degradado é o cérebro, especialmente porque está inserido na caixa craniana. Dessa forma, espera-se que as atividades celulares no cérebro possam se manter por mais tempo do que em outros tecidos. Sabe-se que há ativação da microglia espinhal de *Mus musculus* submetido ao teste da injeção subplantar de formalina, utilizado como forma de indução de nocicepção e, por consequência, de dor. Uma estratégia de avaliação da ativação da microglia é avaliar se houve liberação de citocinas pró- inflamatória logo após a constatação da morte. Partindo desse conhecimento, duas perguntas surgem: i. há ativação da microglia cerebral como resposta a dor? ii. e se for observado aumento na concentração de citocinas dias após a morte, como explicar?

Dentre as atividades celulares *post-mortem*, já foi observada transcrição, confirmada pelo aumento na concentração de determinados transcritos. A concentração de RNA medida em amostras de tecido *post-mortem* coletados e analisados ao longo do tempo é afetada tanto pela degradação do RNA, que ocorre como consequência da morte celular quanto pelas respostas biológicas à morte do organismo, como uma ativação de expressão gênica. Há poucos trabalhos na literatura sobre o que acontece e quais os mecanismos e bases moleculares da expressão gênica de transcritos após a morte do

organismo. Pergunta-se se o produto dessa transcrição poderia sinalizar eventos anteriores a morte, como dor, sofrimento, dentre outros.

A partir do estabelecimento de que há transcrição *post-mortem*, pergunta-se se a maquinaria celular estaria ativa o suficiente para que ocorra também tradução *post-mortem*. Esses poucos trabalhos sobre transcrição *post-mortem* não apresentam qualquer indicativo de tradução, ainda mais considerando que as técnicas utilizadas avaliaram transcriptoma e não produto proteico.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Neste trabalho buscou-se avaliar se há ativação da microglia cerebral após indução de dor aguda e crônica em *Mus musculus* promovida pela aplicação de formalina subplantar e se essa ativação leva a uma expressão de citocinas mesmo após o estabelecimento da morte do organismo.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a concentração de três citocinas pró-inflamatórias - TNF- α , IL-6 e IL -1 β - em cérebro de *Mus musculus* expostos a modelo de indução de dor aguda e crônica (teste da formalina) em tempo zero após a confirmação da morte.
2. Avaliar a expressão de três citosinas - TNF- α , IL-6 e IL-1 β – a partir da ativação da microglia cerebral de *Mus musculus* expostos ao modelo de indução de dor aguda e crônica (teste da formalina) considerando um período de 48 horas após a morte.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (Protocolo n.º 10/2018). Declaração de aprovação do projeto em ANEXOS (**Anexo 1**).

4.2 Animais

Foram utilizados 16 animais da linhagem C57Bl/6 (*Mus musculus*), machos e com idade de 12 semanas e peso médio de $25 \pm 1,3$ g, fornecidos pelo biotério da Universidade Católica de Brasília (UCB) (**Anexo 2**). Foi escolhido o modelo animal *Mus musculus*, pois é de fácil aquisição e manejo, possibilitando a reprodutibilidade da técnica utilizada e sua devida validação, além de serem os vertebrados mais utilizados em pesquisas científicas (Chorilli, et al. 2007).

Os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília com temperatura controlada ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com fornecimento de água e ração à vontade. Os animais passaram por um período de quarentena para avaliação sanitária quando chegaram ao biotério do Instituto de Ciências Biológicas (IB-UnB) e somente após a liberação do veterinário responsável pelo biotério do IB os estudos foram iniciados.

4.3 Desenho experimental

No presente estudo, os experimentos foram realizados em quadruplicata. As réplicas biológicas são necessárias para satisfazer o princípio científico da

reprodutibilidade e para permitir testes com poder estatísticos, como análises de variância (ANOVA).

Para o experimento, os animais foram divididos em quatro grupos:

- **GRUPO 1** – injeção de formalina e eutanásia ao fim da Fase 2 (fase inflamatória) / extração do cérebro 0 horas após a morte;
- **GRUPO 2** – injeção de formalina e eutanásia ao fim da Fase 2 (fase inflamatória) / extração do cérebro 48 horas após a morte;
- **CONTROLE 1** – injeção de salina (sem indução de dor) e eutanásia ao fim do tempo da Fase 2 / extração do cérebro 0 horas após a morte;
- **CONTROLE NAIVE** – sem indução de dor e extração do cérebro 0 horas após a morte.

4.3.1 Teste da formalina

Os animais foram retirados um a um de suas jaulas de quarentena, tiveram seu peso mensurado e sua pata traseira esquerda marcada com caneta permanente, a fim de identificar qual pata receberia a injeção de formalina, com exceção do grupo controle naive que não foram marcados. Os animais marcados dos demais grupos foram colocados em uma câmara de policarbonato transparente e lateralmente acompanhada por espelhos para facilitar a observação de todo o comportamento apresentado (**Figura 6**). Os animais permaneceram na câmara por 10 minutos antes de receber a injeção de formalina, para uma aclimação e ambientação do animal e com o objetivo de evitar um estresse maior.



Figura 6. Câmara de Observação. Câmara para observação de comportamento de camundongo utilizada para observação de resposta nociceptiva após injeção de formalina. A câmara é feita de policarbonato transparente e lateralmente acompanhada por espelhos para facilitar a observação de todo o comportamento apresentado pelo animal.

Os grupos 1 e 2 receberam aplicação de 20 μ l de formalina 2,5%, utilizando seringa Hamilton de 50 μ l equipada com agulha 30-G. Uma solução estoque de formalina 2,5% foi previamente preparada a partir da diluição de solução de formaldeído 37% em salina estéril normal (solução de NaCl a 0,9%). A aplicação foi sub cutânea, na superfície dorsal da pata traseira esquerda dos animais, colocando a agulha acima dos dedos e abaixo do tornozelo (**Figura 7**). Os animais do grupo controle, que simula a lesão gerada pela agulha da injeção, foram injetados com salina.

Imediatamente após a injeção, os animais foram colocados, individualmente na câmara, para avaliação do seu comportamento. Durante os cinco minutos iniciais, correspondentes a fase 1 do teste de formalina, um cronômetro foi acionado toda vez que o animal manifestou algum comportamento de nocicepção como: lambidas, contrações, elevação ou agitação da pata. O tempo registrado foi anotado. Após esse tempo inicial, ocorreu a interfase, onde não há manifestação dos comportamentos. Com 10 minutos

decorridos da injeção iniciou-se a fase 2 e novamente todo comportamento foi cronometrado por mais 20 minutos, totalizando 30 minutos de observação. Ao final da fase 2, os animais dos grupos 1 e 2 e controle 1 foram eutanasiados por deslocamento cervical onde há um completo rompimento das relações do cérebro com o restante do corpo do animal. Os animais do grupo controle naive foram observados por 30 minutos e logo depois eutanasiados por deslocamento cervical. Foram dois avaliadores (duplo-cego) cronometrando o comportamento de cada animal, ao final uma média simples dos tempos foi considerada.

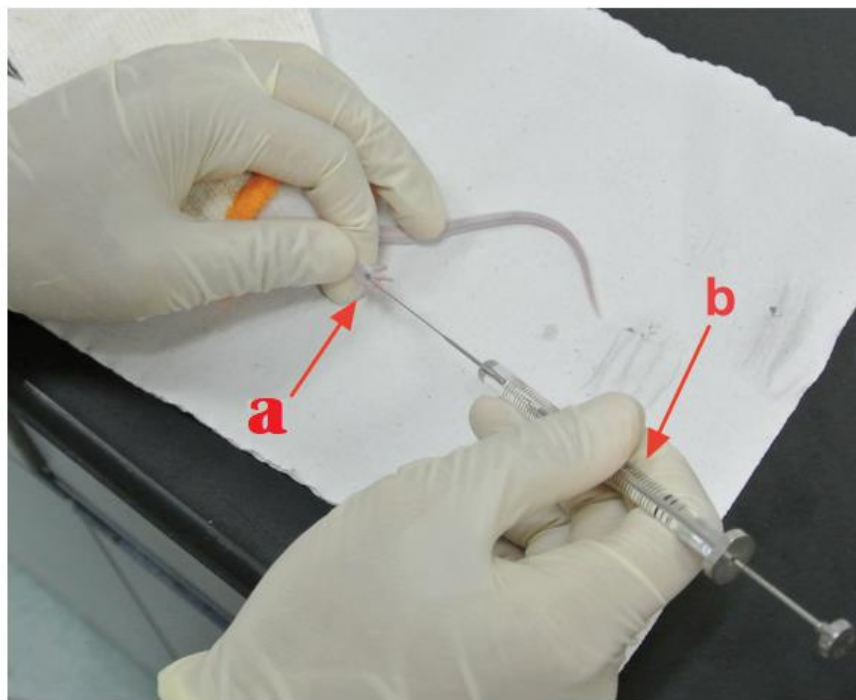


Figura 7. Injeção de formalina em camundongo. Exemplo de imagem mostrando a injeção de formalina. **a-** Mostrando o local de injeção no camundongo; **b-** Mostrando a seringa usada para injeção bem como o posicionamento e ângulo da aplicação.

Os animais do grupo 1 e controle naive foram dissecados e tiveram seus cérebros extraídos logo após o término do teste de formalina. Os animais do grupo 2 foram colocados individualmente em sacos plásticos devidamente vedados e ali permaneceram

por 48h até que também tiveram seus cérebros extraídos. O cérebro extraído de cada animal foi individualmente macerado em nitrogênio líquido e permaneceu armazenado em freezer a -80°C. Os animais do controle 1 não foram dissecados e não tiveram seus cérebros extraídos, pois esses grupos apresentam resultado apenas da avaliação comportamental. Os animais do controle 1 serviram como controle para a provável nocicepção gerada a partir da injeção e lesão criada pela agulha, uma vez que apenas receberam salina.

4.4 Homogeneização do tecido

Para a homogeneização dos tecidos de cérebro foi utilizado o equipamento *Precellys*, sendo que os tubos com a massa de tecido foram pesados individualmente. Para a análise de dosagem de citocinas utilizou-se alíquota de 50 mg de massa de tecido onde os dados sobre dosagem de citocinas são estimados em relação à massa de tecido, isto é, por exemplo, pg de TNF- α presente em um miligrama de tecido – TNF- α (pg)/mg). Aos tubos foi adicionado esferas de aço (2-3/tubo) e 1 mL de PBS gelado. As amostras foram encaminhadas ao equipamento *Precellys* e passaram pelo programa do equipamento destinado a homogeneização de tecidos de cérebro. As amostras permaneceram à uma rotação de 4000 rpm, três ciclos de 15 segundos cada, com cinco segundos de intervalo entre os ciclos. As esferas de aço foram retiradas e os tubos foram centrifugados a 1200rpm em 4°C, durante 1 minuto, para separar os fragmentos teciduais remanescentes da fase líquida que contém as citocinas (**Anexo 3**). O sobrenadante de cada amostra foi coletado e armazenado em tubos novos colocados novamente em freezer a -80°C.

4.5 Dosagem de citocinas pelo método de ELISA

As concentrações das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 foram mensuradas por ensaios enzimáticos (ELISA), utilizando-se kits comerciais (eBioscience- invitrogen) e seguindo as recomendações do fabricante (**Anexo 4 e 5**). Foram analisadas as amostras dos grupos 1 e 2 e do controle naive.

Para o primeiro dia do experimento de dosagem foi utilizada uma microplaca de 96 poços para cada tipo de citocina, adicionando 25ul da solução de anticorpo de captura diluído em Coating Buffer 1X em cada poço. As placas foram cobertas cuidadosamente com parafilme, colocadas na geladeira e incubadas a 4°C durante uma noite para adesão do anticorpo.

No segundo dia cada poço das placas foi lavado três vezes com Wash Buffer (PBS 1X + 0.05% Tween 20), esperando um minuto de descanso entre as lavagens. A lavagem foi feita vertendo-se a placa diretamente sobre um recipiente de descarte, e depois batendo a placa sobre papel toalha. As placas foram então bloqueadas com 30ul do Diluente 1X (Elisa/Elispot Diluent) em cada poço e incubadas em temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida foi colocado 25ul de amostra em cada poço de acordo com o desenho da placa. Cada amostra foi descongelada e vortexada antes de ser colocada nas placas, que foram fechadas e incubadas a 4°C durante uma noite inteira para maior sensibilidade. As concentrações das citocinas nas amostras do tecido de cérebro foram estimadas a partir de valores obtidos com a montagem de curva padrão realizada com diferentes diluições da proteína recombinante padrão dos kits.

No terceiro dia, lavou-se os poços com 250ul de Wash Buffer (PBS 1X + 0.05% Tween 20) por 3x lavagens e adicionou-se o anticorpo de detecção, estreptavidina, em cada poço. Incubou-se por uma hora a temperatura ambiente permitindo que o anticorpo

reconhecesse o complexo antígeno-anticorpo. Após a espera, lavou-se novamente as placas três vezes com 60ul de Wash Buffer para então adicionar 25ul em cada poço da solução Avidina-HRP, que é a enzima responsável pela reação colorimétrica. Ainda, foi adicionada a solução-substrato da enzima em cada poço e incubada por 15 minutos no escuro e em temperatura ambiente. A reação foi encerrada pela adição de solução de parada (H₃PO₄). As leituras das resultantes reações colorimétricas foram realizadas em leitor de microplacas (*EMAX, Molecular Devices Corporation*) à 450nm.

4.6 Estatística

A estatística dos parâmetros observados foi realizada utilizando o teste ANOVA, pós-teste Tukey e $p < 0.05$. Utilizou-se o software GraphPad Prism 6 (*GraphPad Software, La Jolla California USA*) para realização dos testes estatísticos e para produção dos gráficos de dados resultantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho aqui apresentado teve como objetivo geral a avaliação de se há ativação da microglia cerebral quando um animal passa por uma experiência dolorosa promovido pela injeção de formalina e se, em decorrência dessa ativação, ocorre a produção de citocinas mesmo após o estabelecimento da morte do organismo. A aplicação subcutânea de formalina em *Mus musculus* induz a ativação progressiva e seletiva da microglia no SNC, ao menos na medula espinhal (Li et al., 2010). A ativação da microglia leva a uma liberação pospositiva de mediadores pró- inflamatórios, principalmente citocinas nas suas formas IL-1 β , TNF- α e IL-6 (Hanisch, 2002). Não há estudos que avaliem a possibilidade de que em um momento *post-mortem* exista a produção desses mediadores em resposta a exposição à dor no período *ante-mortem*. Dessa forma, a presença de mediadores que sinalizem a essa exposição à dor pode também ser um indicador de situações de dor prolongada no momento anterior à morte.

5.1 Controle experimental e comportamento nociceptivo por teste de formalina

Para as perguntas aqui postuladas, o controle está diretamente relacionado ao uso de linhagens isogênica e a minimização do estresse ao qual os animais são submetidos. Esse controle é necessário pois a variabilidade genética pode impactar sobremaneira nos dados obtidos, assim como o estresse que os animais passam durante a experimentação pode levar a variação nos dados que camuflariam os resultados.

Linhagens isogênicas de camundongos consanguíneos são essenciais para a pesquisa, pois podem melhorar a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados do estudo. O estabelecimento de linhagens isogênicas é constante e continua sendo usado

em muitos campos de pesquisa. Os animais experimentados neste trabalho foram todos machos de 16 semanas de idade e peso médio de $25 \pm 1,3$ g, pertencentes a sublinhagem isogênica C57Bl/6, reproduzidos em cativeiro na Universidade Católica de Brasília. O C57Bl/6 é um animal de laboratório que foi inicialmente desenvolvido pelo Jackson Laboratory. Nos anos 50, o C57Bl/6 foi separado em sub linhagens pelo Jackson Laboratory (C57Bl/6J) e pelo Institutos Nacionais de Saúde (C57Bl/6N) (Mekada *et al.*, 2009). Camundongos C57Bl/6 têm sido utilizados em estudos de imunologia e atividade antitumoral desde o estágio inicial de desenvolvimento (Song & Hwang, 2017). Após a descrição completa do genoma do camundongo, o uso de camundongos C57Bl/6 em muitas áreas de pesquisa se expandiu. Em particular, características imunológicas tais como aquelas relacionadas à imunidade mediada por células e à atividade das células NK são relativamente mais altas em camundongos C57Bl/6 do que em outros camundongos (Song & Hwang, 2017). Dessa forma, nesse experimento foram camundongos de linhagem isogênica no sentido de controlar variáveis possíveis em relação ao metabolismo e individualidade de cada animal.

Além disso, o estresse desencadeia uma série de alterações no cérebro e no corpo. No estágio inicial do estresse, a atuação de estressores agudos ou psicológicos resulta na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e do sistema nervoso simpático (SNS), incluindo o eixo simpático-adrenal (Golovatscka *et al.*, 2012, Chowdhury *et al.*, 2018). Uma vez ativados, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e o eixo do sistema nervoso simpático podem regular positivamente os níveis de glicocorticóides (GCs) e catecolaminas (CAs), respectivamente. O aumento desses hormônios pode influenciar respostas imunes periféricas, pois dependendo da natureza e duração do estressor, os hormônios do estresse podem inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias ou aumentar as respostas imunes através da produção periférica de citocinas pró-

inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β ou IL-6 (Elenkov & Chrousos, 2002). A ativação persistente do eixo HPA, em associação com a inibição alterada da resposta no eixo HPA durante o estresse crônico, pode levar a distúrbios no equilíbrio das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, estimulando a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, IL-4 (Elenkov & Chrousos, 2002).

Sabendo que o estresse pode alterar os níveis de citocinas expressas no cérebro, a fim de tentar controlar essa variável, os animais deste experimento tiveram fornecimento de água e ração à vontade e todas as condições básicas de temperatura, fotoperíodo, ambientação e socialização para minimizar possíveis situações variáveis de estresse. Todos os animais, inclusive os que não foram injetados (controle naive), foram manipulados e contidos igualmente, assim procurou-se controlar o estresse causado pela contenção e manipulação necessários para a aplicação das injeções.

Para induzir e avaliar o comportamento nociceptivo utilizou-se o modelo de aplicação subcutânea de formalina. Esse modelo é comumente utilizado e é considerado o teste químico mais aceito para avaliação de nocicepção, sendo também avaliado como uma técnica de padrão ouro (Salinas-Abarca et al., 2017). Quando comparado a outros estímulos nociceptivos (por exemplo, estimulação elétrica, térmica ou mecânica), acredita-se que as características do teste de formalina, isto é, uma resposta progressiva à dor que tenha uma duração relativamente longa e constante, aproxima-se do que seria a dor clínica (Erami et al., 2017).

O primeiro passo do presente estudo foi a avaliação do comportamento nociceptivo dos animais em experimentação para validação da técnica aqui aplicada e confirmação de que as distintas fases estão sendo corretamente assinaladas. Para tanto, o comportamento nociceptivo foi quantificado pela contagem do tempo total em que os animais dos Grupos 1 (injeção de formalina e eutanásia ao fim da Fase 2 (fase

inflamatória) / extração do cérebro 0 horas após a morte) e 2 (mesmo que fase 1, mas extração do cérebro 48 horas após a morte) apresentaram comportamento como lambidas, contrações, elevação ou agitação da pata. A injeção subcutânea de formalina em camundongos produziu uma resposta característica do modelo, que é bifásica. Observou-se uma primeira fase aguda inicial mais rápida, com um período estimado em $77,3 \pm 5,2$ segundos, a fase neurogênica, na qual ocorre ativação direta dos nociceptores pela formalina e corresponde a uma dor aguda (Hunskar & Hole, 1987, Coderre et al., 1990). A segunda fase também foi observada, com um período estimado em $197,1 \pm 10,3$ segundos, e refere-se a nocicepção inflamatória, que envolve transmissão sináptica reforçada pela medula espinhal, bem como pela liberação dos mediadores inflamatórios locais, como as citocinas. Há diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$) entre as duas fases do teste. A **Figura 8** mostra a resposta a injeção de formalina desses dois grupos, mostrando os resultados aqui observados para os animais dos grupos 1 e 2 com. Os animais do grupo controle 1 (injeção de salina e eutanásia ao fim do tempo da Fase 2 / extração do cérebro 0 horas após a morte) não apresentaram comportamento nociceptivo característico da injeção de formalina durante os 30 minutos de observação do teste, o que era esperado e foi utilizado como parâmetro confirmatório da efetividade do teste. Dessa forma, os resultados demonstram que o teste foi realizado de acordo com o descrito na literatura (Hassani et al., 2015).

Em resumo, neste trabalho foi utilizado o teste de formalina como indutor de nocicepção visando avaliar se há ou não aumento na concentração de citocinas no cérebro de camundongo mesmo após a morte. Pelo resultado do teste pode-se inferir que os animais alocados nos grupos 1 e 2 deste trabalho apresentaram comportamento característico da fase de nocicepção inflamatória, que envolve a transmissão sináptica

reforçada pela medula espinhal, bem como pela liberação dos mediadores inflamatórios locais, como as citocinas pró-inflamatórias.

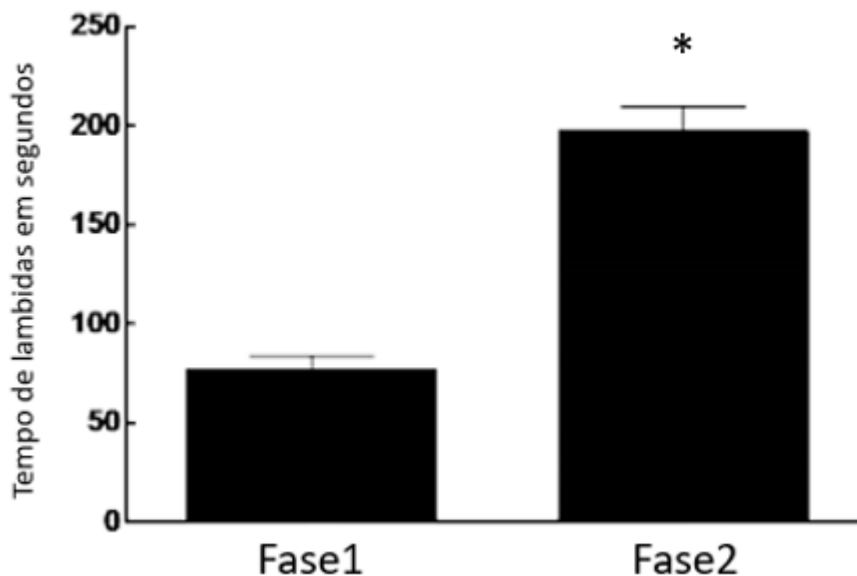


Figura 8. Comportamento nociceptivo de camundongo ao teste de formalina avaliado a partir da estimativa do tempo que os animais dos grupos 1 e 2 realizaram lambidas na pata injetada. Fase neurogênica: Fase 1; Fase inflamatória: Fase 2. Observou-se diferença significativa entre as duas fases do teste ($P < 0,001$). Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 8$ para cada Fase).

5.2. Níveis de citocinas no cérebro

As citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 são indicadores de inflamação cuja presença já foi observada após a indução de dor. Por isso, essas citocinas foram selecionadas para buscar a expressão das mesmas em decorrência de indução de dor *ante-mortem*. Essa avaliação foi realizada tanto em tecido cerebral coletado no momento da eutanásia, como no cérebro de camundongo em um momento 48 horas posterior à morte, isso é, mesmo após a morte biológica atestada por veterinário. Como já explicitado anteriormente neste

trabalho, foram testados três grupos de animais: Grupo 1, Grupo 2 e o grupo naive, que foi composto por animais que não participaram do teste de formalina, mas sim da manipulação para a eutanásia e que é o grupo controle dos experimentos de expressão de citocinas no cérebro. A **Figura 9** mostra o observado para as três citocinas, TNF- α (Fig 9A), IL-1 β (Fig 9B) e IL-6 (Fig 9C), nos três grupos. Observa-se que os animais que não experimentaram dor *ante-mortem*, o grupo naive, apresentam baixa concentração das três citocinas logo após a morte.

Para a citocina TNF- α e IL-1 β , observou-se um comportamento similar, isto é, aumento das citocinas no momento imediatamente pós eutanásia no grupo que passou pelo teste da formalina e diminuição após 48 horas de morte. Para a TNF- α , observou-se uma diferença significativa entre o grupo 1 ($136,4 \pm 37,3$ pg/mg) e o controle naive ($60,2 \pm 5,9$ pg/mg) com valor de $p < 0,01$, indicando que há uma maior concentração de TNF- α no cérebro nos animais que receberam injeção de formalina. Não se observou diferença significativa na concentração desta citocina quando se considerou o fator tempo, na comparação entre grupo 1 e grupo 2 ($96,84 \pm 15,2$ pg/mg), apesar de se observar claramente uma concentração intermediária entre o Grupo Naive e o Grupo 2 no Grupo 1.

Por outro lado, observou-se que há aumento na concentração da citocina IL-6 com o passar do tempo após a morte (Figura 9C). Observou-se que o grupo 2 de animais apresentou diferença significativa na concentração em pg/mg de tecido ($p < 0,01$). Enquanto o controle naive apresentou $7,74 \pm 3,2$ pg/mg, o grupo 2 mostrou elevado aumento em $335,9 \pm 118,1$ pg/mg. O grupo 1 apresentou $50,55 \pm 13,3$ pg/mg de tecido. Não foi observada diferença significativa entre o grupo 1 e o controle naive.

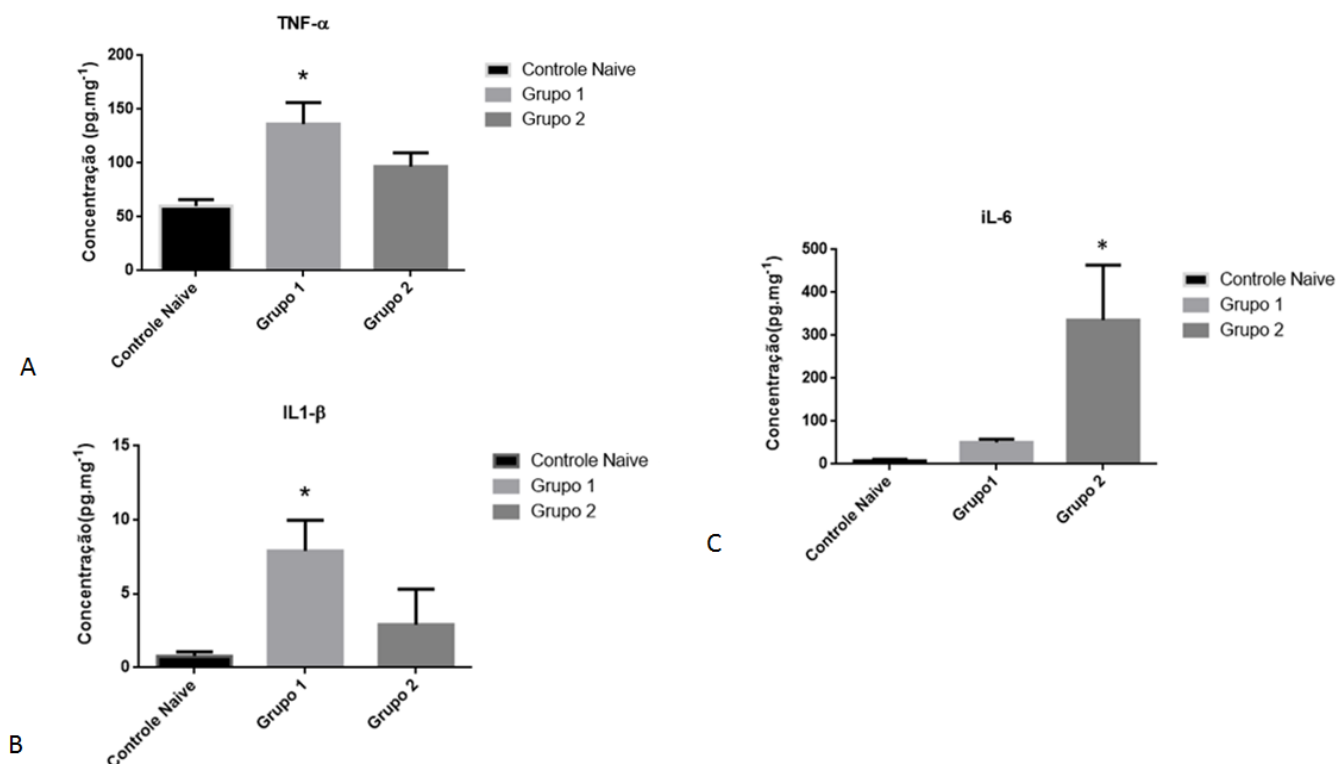


Figura 9. Dosagem de citocina TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-6 (C) em pg/mg de tecido cerebral extraído 0 horas (Grupo 1) e 48 horas (Grupo 2) *post-mortem* de *Mus musculus* submetidos à injeção subplantar de formalina e o controle naive.

Em um estudo realizado com camundongos neonatos submetidos a três dias seguidos de injeção subcutânea de formalina, observou-se, após 24 horas da última injeção, respostas inflamatórias agudas e crônicas, incluindo edema local transitório e aumento dos níveis de citocinas inflamatórias, TNF- α e IL-1 β no sangue. TNF- α apresentou aumento de níveis no cérebro, sendo que, mesmo após 16 dias da última injeção, TNF- α e IL-1 β persistiram em níveis aumentados no córtex cerebral de neonatos machos (Lee *et al.*, 2016). Essa regulação positiva dos fatores inflamatórios persistiu mesmo após o desaparecimento do dano tecidual local (Lee *et al.*, 2016). Diferentemente daquele estudo, neste presente experimento os animais utilizados foram adultos de 12

semanas e ocorreu apenas uma injeção de formalina 30 minutos antes da eutanásia dos animais, sendo os dados apresentados para um momento *post-mortem*. Observou-se aumento da concentração de TNF- α e IL-1 β no grupo 1 em comparação ao controle naive. Porém, apesar de se observar uma tendência de diminuição nos níveis das citocinas com o tempo 48 horas, não se pode afirmar que os níveis diminuíram ou mesmo persistiram devido a uma falta de significância estatística na diferença entre os grupos 2 e 1. Se faz necessário ressaltar que os níveis para IL-1 β , apesar de terem sido observados dentro dos parâmetros de detecção do kit de dosagem para essa citocina, são consideravelmente baixos e podem não refletir um significado biológico relacionado à inflamação.

Sob condições basais normais, as citocinas são expressas em níveis muito baixos no córtex cerebral, geralmente difíceis de quantificar (Murray *et al.*, 2015). Os membros da família IL-1 e TNF são expressos constitutivamente em baixos níveis no cérebro saudável e, quando liberados em concentrações modestas localmente, não são neurotóxicos *in vitro* ou *in vivo* (Rothwell & Luheshi, 2000, Vitkovic *et al.*, 2000). Vitkovic *et al.* (2000) sugere que as citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF α desempenham também a função de neuromoduladores no cérebro adulto normal, atuando em vários processos autônomos e comportamentais mediados por neurônios centrais, como por exemplo, sono e alimentação.

Citocinas anti-inflamatórias são moléculas imunorreguladoras que controlam a resposta pró-inflamatória das citocinas (Zhang & An, 2007). As citocinas anti-inflamatórias agem em conjunto com inibidores específicos de citocinas e receptores solúveis para regular a resposta imune humana. As principais citocinas anti-inflamatórias incluem antagonista do receptor de interleucina IL -1, IL-4, IL-10, IL-11 e IL-13 (Zhang & An, 2007). Uma regulação positiva do TNF- α também leva a aumentos compensatórios

nas citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10, que regulam negativamente a produção de TNF- α .

Foi proposto que IL-10 possa ter um potencial terapêutico anti hiperalgesia. Foi observada uma redução na hiperalgesia a partir da injeção de IL-10 diretamente no nervo ciático do rato após trauma (Wagner *et al.*, 1998). Assim, poderia haver uma correlação da produção de citocinas anti-inflamatórias e o não aumento dos níveis de TNF- α ou IL-1 β em um período 48 horas, uma vez que citocinas anti-inflamatórias podem contra regular a produção e a função de citocinas pró-inflamatórias em múltiplos níveis. Também é possível que as moléculas de citocina estejam sofrendo degradação proteica ao longo do tempo *post-mortem*.

Um estudo mostra que genes relacionados à expressão de TNF- α são transcritos até mesmo 24 horas *post-mortem* e a maioria dos transcritos de genes associados a inflamação aumenta em abundância dentro de 1 hora após a morte e continua a ser abundante por 12-48 horas (Pozhitkov *et al.*, 2017). É possível que, de fato, esses genes sejam expressos no momento *post-mortem*, mas a tradução dos transcritos de TNF- α e IL-1 β pode não ter sido viável e não ter ocorrido, pois é observado que os níveis dessas citocinas no cérebro 48 horas após a morte ou se mantêm ou diminuem.

Quando se inicia a formação de um processo de inflamação, como o que ocorre devido a aplicação de formalina na região subplantar da pata de um animal, IL-6 é liberado na circulação sanguínea pela ação de neutrófilos e macrófagos na região de infecção ou dano, e por astrócitos e células da glia no SNC (Erta *et al.*, 2012). O papel de IL-6 na resposta inflamatória é variado e muitas células da resposta imune inata e estromais respondem à IL-6, o que aumenta a interação entre essas células. Um feedback autócrino pode amplificar o processo de inflamação, e acredita-se que a IL-6 possa estar

envolvida com a transição da inflamação aguda para a crônica (Del Giudice & Gangestad, 2018). Durante a inflamação aguda, monócitos, macrófagos e células endoteliais produzem IL-6, levando ao recrutamento de neutrófilos por meio da ativação de um subconjunto de quimiocinas e moléculas de adesão por células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos (Mauer *et al.*, 2014). Também já foi demonstrado que o IL-6 tem capacidade de prolongar a sobrevivência de neutrófilos por meio de efeitos reguladores na apoptose de neutrófilos (Asensi *et al.*, 2004). A liberação de IL-6R solúvel pelos neutrófilos durante a inflamação crônica permite que as células do estroma que não expressam IL-6R respondam à IL-6, levando à produção de quimio- atraentes específicos aumentando o número de monócitos no local (Del Giudice & Gangestad, 2018).

A expressão de IL-6 é fortemente regulada em vários níveis, incluindo a transcrição de genes, tradução e os níveis de degradação do mRNA (Nyati *et al.*, 2017). Várias vias de sinalização biológica controlam rigidamente os mecanismos de regulação de IL-6. Os mecanismos reguladores pós-transcricionais agem por meio da ligação de proteínas ao RNA (RBPs) e são necessários para modular os níveis de mRNA e, portanto, podem regular a expressão da citocina. a expressão e degradação do mRNA de IL-6 é regulada transcricionalmente e pós-transcricionalmente por várias proteínas e microRNAs (Nyati *et al.*, 2017). Entre as proteínas que regulam positivamente é possível citar: o NF KB; NF-IL-6, fator nuclear da IL-6; TAX, proteína transativadora; TAT, transativador de transcrição e o HBVX, proteína X do vírus da hepatite B. Entre as proteínas que regulam negativamente a expressão de IL-6 é possível apontar: Ahr, receptor aril-hidrocarboneto; GR, receptor de glicocorticóide; ER, receptor de estrogênio; Rb, retinoblastoma; PPAR α , receptor α ativado por proliferador de peroxissomo (Tanaka *et al.*, 2014). O mRNA de IL-6 é regulado de forma pós-transcricional nas posições 5'

UTR e 3' UTR. A estabilidade do mRNA é determinada pela extremidade 3'UTR e o início da tradução do mRNA pela extremidade 5'UTR. O mRNA de IL-6 é regulado pela modulação de uma sequência rica em AU (bases nitrogenadas) localizada na extremidade 3'UTR, uma vez que várias proteínas, como por exemplo a proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) p38, e microRNAs se ligam à 3'UTR e regulam a estabilidade do mRNA (Tanaka et al., 2014). A RNase-1 reguladora (regnase-1) promove a desestabilização e degradação do mRNA de IL-6. No entanto, a proteína Arid5a regula pós-transcricionalmente a IL-6, ligando-se ao UTR de 3' do mRNA da IL-6 no mesmo local em que a Regnase-1 se liga, interferindo na desestabilização da IL-6 mediada pela Regnase-1 e contribuindo para a produção de expressão da IL-6 in vivo (Nyati et al., 2017).

É perceptível a complexidade da regulação da expressão de IL-6 em um organismo vivo, ainda assim o presente estudo demonstrou que os níveis de IL-6 estavam aumentados em um período 48 horas *post-mortem*. IL-6 apresentou um padrão diferente, onde não se observou aumento entre o controle naive e o grupo 1, 0 horas após a morte, porém há um significativo aumento no período de 48 horas após a morte. Esse aumento na concentração de citocinas no grupo de animais exposto à formalina em relação ao controle naive pode indicar a possibilidade de uma transcrição e tradução *post-mortem*. Durante o processo de inflamação, a produção de citocinas ocorre em uma sequência, na qual o TNF- α é produzido primeiro e, em seguida, citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-6 são liberadas para ajudar na propagação da sinalização inflamatória (Shivers et al., 2015). Como descrito anteriormente na introdução deste relato, existem duas vias de sinalização para IL-6, uma via de sinalização clássica de IL-6 que afeta apenas alguns tecidos que expressam constitutivamente o receptor de membrana IL-6R, bem como a sinalização trans da IL-6 que afeta uma variedade de tipos de células através da presença

da forma solúvel de IL-6R (sIL-6R). O sIL-6R se separa e circula de forma solúvel por meio da clivagem que é desencadeada por citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , toxinas bacterianas e traços moleculares de dano celular, amplamente mediados pela metaloproteinase especializada ADAM17, que também é responsável pela secreção de TNF- α no plasma (Scheller *et al.*, 2011). Portanto, durante episódios inflamatórios, a sinalização trans de IL-6 é poderosamente regulada, sendo que fora dessas condições, opera em níveis baixos predominando a sinalização clássica. É por meio da via de sinalização clássica que IL-6 é sintetizada no local de uma lesão ainda no estágio inicial da inflamação, se move para o fígado pela corrente sanguínea e promove uma rápida indução de uma variedade de proteínas presentes na fase aguda da inflamação, como a proteína C reativa (PCR), soro amilóide A (SAA), fibrinogênio, haptoglobina e o α 1-anticimiotripsina. Dessa forma, IL-6 também regula positivamente o processo de lipólise no fígado (Del Giudice & Gangestad, 2018).

A liberação e sinalização de IL-6 é parcialmente induzida pela presença de IL-1 β e TNF- α que atuam como fatores de transcrição para a síntese de IL-6. Dessa forma, neste estudo pode-se dizer que exista a possibilidade de o aumento dos níveis de TNF- α e IL-1 β em um primeiro momento 0 horas estar relacionado com o aumento observado em IL-6 no momento 48 horas *post-mortem*.

Estudos *in vitro* indicam que a IL-6 inibe a liberação de IL-1 β e TNF- α (Akira *et al.*, 1990, Schindler *et al.*, 1990), pois a elevação da IL-6 durante a inflamação pode contribuir para um ciclo de feedback negativo que resulta por atenuar ou encerrar a resposta inflamatória. Garantindo também a IL-6 um caráter anti-inflamatório (Scheller *et al.*, 2011). É observado neste estudo que os níveis de TNF- α e IL-1 β no momento 48 horas *post-mortem* apresentam-se em uma aparente queda em relação ao primeiro

momento 0 horas *post-mortem*, isso pode ser explicado como sendo o efeito de contra-regulação mediado pelos níveis elevados de IL-6 nesse momento, juntamente com o processo normal de degradação dessas moléculas no período *post-mortem*.

Biomarcadores inflamatórios, como citocinas, têm sido relacionados a ambos os estados de dor crônica e aguda, sugerindo um papel direto ou facilitador na ocorrência de dor (DeVon *et al.*, 2014). Como as citocinas refletem o processo fisiopatológico da inflamação, elas podem ser potenciais biomarcadores candidatos de dor em condições ligadas à inflamação. Este trabalho abre precedente para uma possível avaliação do perfil de transcritos presentes no cérebro *post-mortem* em organismos submetidos a situação de nocicepção *ante-mortem*, podendo também gerar a comparação do perfil de transcritos expressos *post-mortem* entre as fases de resposta ao estímulo de nocicepção fisiológica observadas durante o teste de formalina. Aliado aos dados gerados por esse estudo é válido fazer também uma análise de expressão gênica visando medir e comparar genes relacionados ao estado de intensidade de dor ao qual os animais foram expostos.

6. CONCLUSÕES

1. Animais que não experimentaram dor *ante-mortem*, o grupo naive, apresentaram baixa concentração das três citocinas logo após a morte.
2. Observou-se um aumento das citocinas TNF- α e IL-1 β no momento imediatamente após a eutanásia no grupo que passou pelo teste da formalina e diminuição após 48 horas de morte. É provável que tenha ocorrido a transcrição e produção de citocina ainda no período *peri-mortem* ou logo após a morte como resposta ao experimento e que a diminuição se refere a degradação *post-mortem*.
3. A presença dessas citocinas no cérebro pode ser indicativo da ativação da microglia em resposta a uma simples injeção sub plantar de formalina em animais adultos.
4. Foi observado um aumento na concentração da citocina IL-6 no período de 48 *post-mortem*. Esse aumento na concentração da citocina pode ser consequência de transcrição *peri-mortem* e *post-mortem*, assim como deve ser decorrente de uma atividade celular ainda não descrita: a tradução *post-mortem*.

7. REFERÊNCIAS

- Akira, S., T. Hirano, T. Taga and T. Kishimoto, 1990: Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J*, **4**, 2860-2867.
- Alaeddini, R., S. J. Walsh and A. Abbas, 2010: Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA--a review. *Forensic Sci Int Genet*, **4**, 148-157.
- Asensi, V., E. Valle, A. Meana, J. Fierer, A. Celada, V. Alvarez, J. Paz, E. Coto, J. A. Carton, J. A. Maradona, A. Dieguez, J. Sarasua, M. G. Ocana and J. M. Arribas, 2004: In vivo interleukin-6 protects neutrophils from apoptosis in osteomyelitis. *Infect Immun*, **72**, 3823-3828.
- Ayoub, T. and J. Chow, 2008: The conventional autopsy in modern medicine. *Journal of the Royal Society of Medicine*, **101**, 177-181.
- Barnes, T. C., M. E. Anderson and R. J. Moots, 2011: The many faces of interleukin-6: the role of IL-6 in inflammation, vasculopathy, and fibrosis in systemic sclerosis. *Int J Rheumatol*, **2011**, 721608.
- Bernat, J. L., 2005: The concept and practice of brain death. *Progress in brain research*, **150**, 369-379.
- Bernat, J. L., 2009: Contemporary controversies in the definition of death. *Progress in brain research*, **177**, 21-31.
- Bezbradica, J. S. and R. Medzhitov, 2009: Integration of cytokine and heterologous receptor signaling pathways. *Nat Immunol*, **10**, 333-339.
- Binshtok, A. M., H. Wang, K. Zimmermann, F. Amaya, D. Vardeh, L. Shi, G. J. Brenner, R. R. Ji, B. P. Bean, C. J. Woolf and T. A. Samad, 2008: Nociceptors are interleukin-1beta sensors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **28**, 14062-14073.
- Bonavita, V. and R. De Simone, 2011: Pain as an evolutionary necessity. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, **32 Suppl 1**, S61-66.
- Bowman, K. W. and S. A. Richard, 2003: Culture, brain death, and transplantation. *Progress in transplantation (Aliso Viejo, Calif.)*, **13**, 211-215; quiz 216-217.
- Boyarsky, S., C. S. North and R. E. Boyarsky, 1992: Thanatology: a new clinical specialty to help confront death. *Missouri medicine*, **89**, 95-97.

- Chowdhury, A. A., N. B. Gawali, P. Shinde, R. Munshi and A. R. Juvekar, 2018: Imperatorin ameliorates lipopolysaccharide induced memory deficit by mitigating proinflammatory cytokines, oxidative stress and modulating brain-derived neurotropic factor. *Cytokine*, **110**, 78-86.
- Chung, U., J. S. Seo, Y. H. Kim, G. H. Son and J. J. Hwang, 2012: Quantitative analyses of postmortem heat shock protein mRNA profiles in the occipital lobes of human cerebral cortices: implications in cause of death. *Molecules and cells*, **34**, 473-480.
- Clark, A. K., E. A. Old and M. Malcangio, 2013: Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. *J Pain Res*, **6**, 803-814.
- Cocariu, E. A., V. Mageriu, F. Staniceanu, A. Bastian, C. Socoliuc and S. Zurac, 2016: Correlations Between the Autolytic Changes and Postmortem Interval in Refrigerated Cadavers. *Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne*, **54**, 105-112.
- Coderre, T. J. and R. Melzack, 1992: The role of NMDA receptor-operated calcium channels in persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **12**, 3671-3675.
- Coderre, T. J., A. L. Vaccarino and R. Melzack, 1990: Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res*, **535**, 155-158.
- Cohen, S. P. and J. Mao, 2014: Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ (Clinical research ed.)*, **348**, f7656.
- Condic, M. L., 2016: Determination of Death: A Scientific Perspective on Biological Integration. *The Journal of medicine and philosophy*, **41**, 257-278.
- Costache, M., A. M. Lazaroiu, A. Contolenco, D. Costache, S. George, M. Sajin and O. M. Patrascu, 2014: Clinical or Postmortem? The Importance of the Autopsy; a Retrospective Study. *Mædica*, **9**, 261-265.
- Costigan, M., J. Scholz and C. J. Woolf, 2009: Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. *Annual review of neuroscience*, **32**, 1-32.
- Craig, K. D., 2015: Social communication model of pain. *Pain*, **156**, 1198-1199.
- Crofford, L. J., 2015: Chronic Pain: Where the Body Meets the Brain. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, **126**, 167-183.

- Crook, R. J., K. Dickson, R. T. Hanlon and E. T. Walters, 2014: Nociceptive sensitization reduces predation risk. *Curr Biol*, **24**, 1121-1125.
- de Mesquita Padilha, M., F. C. Vilela, M. J. da Silva, M. H. dos Santos, G. Alves-da-Silva and A. Giusti-Paiva, 2009: Antinociceptive effect of the extract of *Morus nigra* leaves in mice. *Journal of medicinal food*, **12**, 1381-1385.
- de Oliveira, C. M., R. K. Sakata, A. M. Issy, L. R. Gerola and R. Salomao, 2011: Cytokines and pain. *Rev Bras Anesthesiol*, **61**, 255-259, 260-255, 137-242.
- Del Giudice, M. and S. W. Gangestad, 2018: Rethinking IL-6 and CRP: Why they are more than inflammatory biomarkers, and why it matters. *Brain Behav Immun*, **70**, 61-75.
- DeVon, H. A., M. R. Piano, A. G. Rosenfeld and D. A. Hoppensteadt, 2014: The association of pain with protein inflammatory biomarkers: a review of the literature. *Nurs Res*, **63**, 51-62.
- Dinarello, C. A., 2018: Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*, **281**, 8-27.
- Donaldson, A. E. and I. L. Lamont, 2013: Biochemistry Changes That Occur after Death: Potential Markers for Determining Post-Mortem Interval. *PLoS ONE*, **8**, e82011.
- Dubin, A. E. and A. Patapoutian, 2010: Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, **120**, 3760-3772.
- Dubuisson, D. and S. G. Dennis, 1977: The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, **4**, 161-174.
- Elenkov, I. J. and G. P. Chrousos, 2002: Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*, **966**, 290-303.
- Ellison, D. L., 2017: Physiology of Pain. *Critical care nursing clinics of North America*, **29**, 397-406.
- Erami, E., H. Azhdari-Zarmehri, K. Imoto and H. Furue, 2017: Characterization of Nociceptive Behaviors Induced by Formalin in the Glabrous and Hairy Skin of Rats. *Basic and Clinical Neuroscience*, **8**, 37-42.
- Erta, M., A. Quintana and J. Hidalgo, 2012: Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci*, **8**, 1254-1266.
- Ferreira, P. G., M. Munoz-Aguirre, F. Reverter, C. P. Sa Godinho, A. Sousa, A. Amadoz, R. Sodaei, M. R. Hidalgo, D. Pervouchine, J. Carbonell-Caballero, R. Nurtdinov, A. Breschi, R. Amador, P. Oliveira, C. Cubuk, J. Curado, F. Aguet, C. Oliveira,

- J. Dopazo, M. Sammeth, K. G. Ardlie and R. Guigo, 2018: The effects of death and post-mortem cold ischemia on human tissue transcriptomes. *Nat Commun*, **9**, 490.
- Fields, H. L., M. M. Heinricher and P. Mason, 1991: Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu Rev Neurosci*, **14**, 219-245.
- Fonseca, L. M. and I. Testoni, 2011: The emergence of thanatology and current practice in death education. *Omega*, **64**, 157-169.
- Fruhstorfer, H., E. L. Harju and U. F. Lindblom, 2003: The significance of A-delta and C fibres for the perception of synthetic heat. *European journal of pain (London, England)*, **7**, 63-71.
- Garlanda, C., C. A. Dinarello and A. Mantovani, 2013: The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*, **39**, 1003-1018.
- Gold, M. S. and G. F. Gebhart, 2010: Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nature medicine*, **16**, 1248-1257.
- Golovatscka, V., H. Ennes, E. A. Mayer and S. Bradesi, 2012: Chronic stress-induced changes in pro-inflammatory cytokines and spinal glia markers in the rat: a time course study. *Neuroimmunomodulation*, **19**, 367-376.
- Gorman, W. F., 1985: Medical diagnosis versus legal determination of death. *J Forensic Sci*, **30**, 150-157.
- Granados-Soto, V., R. Alonso-Lopez, R. Asomoza-Espinosa, M. O. Rufino, L. D. Gomes-Lopes and S. H. Ferreira, 2001: Participation of COX, IL-1 beta and TNF alpha in formalin-induced inflammatory pain. *Proc West Pharmacol Soc*, **44**, 15-17.
- Guhaniyogi, J. and G. Brewer, 2001: Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene*, **265**, 11-23.
- Hadjistavropoulos, T., K. D. Craig, S. Duck, A. Cano, L. Goubert, P. L. Jackson, J. S. Mogil, P. Rainville, M. J. L. Sullivan, A. C. C. Williams, T. Vervoort and T. D. Fitzgerald, 2011: A biopsychosocial formulation of pain communication. *Psychological bulletin*, **137**, 910-939.
- Hanisch, U. K., 2002: Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, **40**, 140-155.
- Hassani, F. V., R. Rezaee, H. Sazegara, M. Hashemzaei, K. Shirani and G. Karimi, 2015: Effects of silymarin on neuropathic pain and formalin-induced nociception in mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, **18**, 715-720.

- Holdsworth, S. R. and P. Y. Gan, 2015: Cytokines: Names and Numbers You Should Care About. *Clin J Am Soc Nephrol*, **10**, 2243-2254.
- Honore, P., C. L. Wade, C. Zhong, R. R. Harris, C. Wu, T. Ghayur, Y. Iwakura, M. W. Decker, C. Faltynek, J. Sullivan and M. F. Jarvis, 2006: Interleukin-1alpha gene-deficient mice show reduced nociceptive sensitivity in models of inflammatory and neuropathic pain but not post-operative pain. *Behav Brain Res*, **167**, 355-364.
- Houseley, J. and D. Tollervey, 2009: The many pathways of RNA degradation. *Cell*, **136**, 763-776.
- Huang, H. S., A. Matevosian, Y. Jiang and S. Akbarian, 2006: Chromatin immunoprecipitation in postmortem brain. *J Neurosci Methods*, **156**, 284-292.
- Hunskar, S. and K. Hole, 1987: The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, **30**, 103-114.
- Jardine, D., L. Cornel and M. Emond, 2011: Gene expression analysis characterizes antemortem stress and has implications for establishing cause of death. *Physiol Genomics*, **43**, 974-980.
- Jha, M. K., S. Jeon and K. Suk, 2012: Glia as a Link between Neuroinflammation and Neuropathic Pain. *Immune Netw*, **12**, 41-47.
- Lee Goff, M., 2009: Early post-mortem changes and stages of decomposition in exposed cadavers. *Experimental & applied acarology*, **49**, 21-36.
- Lee, J. H., A. R. Espinera, D. Chen, K. E. Choi, A. Y. Caslin, S. Won, V. Pecoraro, G. Y. Xu, L. Wei and S. P. Yu, 2016: Neonatal inflammatory pain and systemic inflammatory responses as possible environmental factors in the development of autism spectrum disorder of juvenile rats. *J Neuroinflammation*, **13**, 109.
- Lee, S. Y., I. A. Buhimschi, A. T. Dulay, U. A. Ali, G. Zhao, S. S. Abdel-Razek, M. O. Bahtiyar, S. F. Thung, E. F. Funai and C. S. Buhimschi, 2011: IL-6 trans-signaling system in intra-amniotic inflammation, preterm birth, and preterm premature rupture of the membranes. *J Immunol*, **186**, 3226-3236.
- Leung, L. and C. M. Cahill, 2010: TNF-alpha and neuropathic pain--a review. *J Neuroinflammation*, **7**, 27.
- Li, J. Z., F. Meng, L. Tsavaler, S. J. Evans, P. V. Choudary, H. Tomita, M. P. Vawter, D. Walsh, V. Shokoohi, T. Chung, W. E. Bunney, E. G. Jones, H. Akil, S. J. Watson and R. M. Myers, 2007: Sample matching by inferred agonal stress in gene expression analyses of the brain. *BMC genomics*, **8**, 336.

- Li, K., T. Lin, Y. Cao, A. R. Light and K. Y. Fu, 2010: Peripheral formalin injury induces 2 stages of microglial activation in the spinal cord. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*, **11**, 1056-1065.
- Liongue, C., R. Sertori and A. C. Ward, 2016: Evolution of Cytokine Receptor Signaling. *J Immunol*, **197**, 11-18.
- Liu, H., T. Xia, F. Xu, Z. Ma and X. Gu, 2018: Identification of the key genes associated with neuropathic pain. *Mol Med Rep*, **17**, 6371-6378.
- Loeser, J. D. and R. D. Treede, 2008: The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, **137**, 473-477.
- Lois, C., I. Gonzalez, D. Izquierdo-Garcia, N. R. Zurcher, P. Wilkens, M. L. Loggia, J. M. Hooker and H. D. Rosas, 2018: Neuroinflammation in Huntington's Disease: New Insights with (11)C-PBR28 PET/MRI. *ACS Chem Neurosci*, **9**, 2563-2571.
- Lopez-Castejon, G. and D. Brough, 2011: Understanding the mechanism of IL-1beta secretion. *Cytokine Growth Factor Rev*, **22**, 189-195.
- Mauer, J., B. Chaurasia, J. Goldau, M. C. Vogt, J. Ruud, K. D. Nguyen, S. Theurich, A. C. Hausen, J. Schmitz, H. S. Bronneke, E. Estevez, T. L. Allen, A. Mesaros, L. Partridge, M. A. Febbraio, A. Chawla, F. T. Wunderlich and J. C. Bruning, 2014: Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nat Immunol*, **15**, 423-430.
- Mekada, K., K. Abe, A. Murakami, S. Nakamura, H. Nakata, K. Moriwaki, Y. Obata and A. Yoshiki, 2009: Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim*, **58**, 141-149.
- Mika, J., M. Zychowska, K. Popiolek-Barczyk, E. Rojewska and B. Przewlocka, 2013: Importance of glial activation in neuropathic pain. *European journal of pharmacology*, **716**, 106-119.
- Millar, C. D. and D. M. Lambert, 2013: Ancient DNA: Towards a million-year-old genome. *Nature*, **499**, 34-35.
- Murray, K. N., A. R. Parry-Jones and S. M. Allan, 2015: Interleukin-1 and acute brain injury. *Front Cell Neurosci*, **9**, 18.
- Nadesan, K., 1997: The importance of the medico-legal autopsy. *The Malaysian journal of pathology*, **19**, 105-109.
- O'Shea, J. J. and P. J. Murray, 2008: Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity*, **28**, 477-487.

- Pinho-Ribeiro, F. A., W. A. Verri and I. M. Chiu, 2017: Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends in immunology*, **38**, 5-19.
- Pollanen, M. S., 2018: The pathology of torture. *Forensic Sci Int*, **284**, 85-96.
- Pozhitkov, A. E., R. Neme, T. Domazet-Loso, B. G. Leroux, S. Soni, D. Tautz and P. A. Noble, 2017: Tracing the dynamics of gene transcripts after organismal death. *Open Biol*, **7**.
- Price, T. J. and G. Dussor, 2014: Evolution: The Advantage of ‘Maladaptive’ Pain Plasticity. *Current biology : CB*, **24**, R384-R386.
- Randall, B. B., M. F. Fierro and R. C. Froede, 1998: Practice guideline for forensic pathology. Members of the Forensic Pathology Committee, College of American Pathologists. *Archives of pathology & laboratory medicine*, **122**, 1056-1064.
- Reemst, K., S. C. Noctor, P. J. Lucassen and E. M. Hol, 2016: The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. *Front Hum Neurosci*, **10**, 566.
- Reza, A., J. Mercy and E. Krug, 2001: Epidemiology of violent deaths in the world. *Injury Prevention*, **7**, 104-111.
- Rial, D., C. Lemos, H. Pinheiro, J. M. Duarte, F. Q. Goncalves, J. I. Real, R. D. Prediger, N. Goncalves, C. A. Gomes, P. M. Canas, P. Agostinho and R. A. Cunha, 2015: Depression as a Glial-Based Synaptic Dysfunction. *Front Cell Neurosci*, **9**, 521.
- Rosland, J. H., A. Tjolsen, B. Maehle and K. Hole, 1990: The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain*, **42**, 235-242.
- Rothwell, N. J. and G. N. Luheshi, 2000: Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci*, **23**, 618-625.
- Salinas-Abarca, A. B., S. H. Avila-Rojas, P. Barragan-Iglesias, J. B. Pineda-Farias and V. Granados-Soto, 2017: Formalin injection produces long-lasting hypersensitivity with characteristics of neuropathic pain. *European journal of pharmacology*, **797**, 83-93.
- Sanchez, O., O. Campuzano, A. Fernández-Falgueras, G. Sarquella-Brugada, S. Cesar, I. Mademont, J. Mates, A. Pérez-Serra, M. Coll, F. Pico, A. Iglesias, C. Tirón, C. Allegue, E. Carro, M. Á. Gallego, C. Ferrer-Costa, A. Hospital, N. Bardalet, J. C. Borondo, A. Vingut, E. Arbelo, J. Brugada, J. Castellà, J. Medallo and R. Brugada, 2016: Natural and Undetermined Sudden Death: Value of Post-Mortem Genetic Investigation. *PLoS ONE*, **11**, e0167358.


- Scheller, J., A. Chalaris, D. Schmidt-Arras and S. Rose-John, 2011: The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, **1813**, 878-888.
- Schindler, R., J. Mancilla, S. Endres, R. Ghorbani, S. C. Clark and C. A. Dinarello, 1990: Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*, **75**, 40-47.
- Sevilla-Godinez, H. T., 2009: [Thanatos and ethics: an approach from philosophy on facing death]. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, **47**, 227-230.
- Sheleg, S. V., J. R. LoBello, H. Hixon, S. W. Coons, D. Lowry and M. K. Nedzved, 2008: Stability and Autolysis of Cortical Neurons in Post-Mortem Adult Rat Brains. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, **1**, 291-299.
- Shivers, K. Y., N. Amador, L. Abrams, D. Hunter, S. Jenab and V. Quinones-Jenab, 2015: Estrogen alters baseline and inflammatory-induced cytokine levels independent from hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Cytokine*, **72**, 121-129.
- Sloan, S. A. and B. A. Barres, 2013: Glia as primary drivers of neuropathology in TDP-43 proteinopathies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 4439-4440.
- Smith, E. S. and G. R. Lewin, 2009: Nociceptors: a phylogenetic view. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology*, **195**, 1089-1106.
- Song, H. K. and D. Y. Hwang, 2017: Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches. *Lab Anim Res*, **33**, 119-123.
- Stemkowski, P. L., A. Garcia-Caballero, V. M. Gadotti, S. M'Dahoma, L. Chen, I. A. Souza and G. W. Zamponi, 2017: Identification of interleukin-1 beta as a key mediator in the upregulation of Cav3.2-USP5 interactions in the pain pathway. *Molecular pain*, **13**, 1744806917724698.
- Sufka, K. J., G. S. Watson, R. E. Nothdurft and J. S. Mogil, 1998: Scoring the mouse formalin test: validation study. *European journal of pain (London, England)*, **2**, 351-358.

- Tjolsen, A., O. G. Berge, S. Hunnskaar, J. H. Rosland and K. Hole, 1992: The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, **51**, 5-17.
- Treede, R.-D., W. Rief, A. Barke, Q. Aziz, M. I. Bennett, R. Benoliel, M. Cohen, S. Evers, N. B. Finnerup, M. B. First, M. A. Giamberardino, S. Kaasa, E. Kosek, P. Lavand'homme, M. Nicholas, S. Perrot, J. Scholz, S. Schug, B. H. Smith, P. Svensson, J. W. S. Vlaeyen and S.-J. Wang, 2015: A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain*, **156**, 1003-1007.
- Urbano, P. C., V. T. Soccol and V. F. Azevedo, 2014: Apoptosis and the FLIP and NF-kappa B proteins as pharmacodynamic criteria for biosimilar TNF-alpha antagonists. *Biologics*, **8**, 211-220.
- Vallejo, R., D. M. Tilley, L. Vogel and R. Benyamin, 2010: The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. *Pain Pract*, **10**, 167-184.
- van der Linden, A., B. M. Blokker, M. Kap, A. C. Weustink, J. L. Robertus, P. H. Riegman and J. W. Oosterhuis, 2014: Post-mortem tissue biopsies obtained at minimally invasive autopsy: an RNA-quality analysis. *PLoS One*, **9**, e115675.
- Vanderah, T. W., 2007: Pathophysiology of pain. *The Medical clinics of North America*, **91**, 1-12.
- Vitkovic, L., J. Bockaert and C. Jacque, 2000: "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain? *J Neurochem*, **74**, 457-471.
- Wagner, R., M. Janjigian and R. R. Myers, 1998: Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in CCI neuropathy decreases thermal hyperalgesia, macrophage recruitment, and endoneurial TNF-alpha expression. *Pain*, **74**, 35-42.
- Weir, G. A. and M. Z. Cader, 2011: New directions in migraine. *BMC Med*, **9**, 116.
- Whitehead, K. J., C. G. Smith, S. A. Delaney, S. J. Curnow, M. Salmon, J. P. Hughes and I. P. Chessell, 2010: Dynamic regulation of spinal pro-inflammatory cytokine release in the rat in vivo following peripheral nerve injury. *Brain Behav Immun*, **24**, 569-576.
- Williams, A. C. and K. D. Craig, 2016: Updating the definition of pain. *Pain*, **157**, 2420-2423.
- Wittkowski, J., K. J. Doka, R. A. Neimeyer and M. Vallergera, 2015: Publication Trends in Thanatology: An Analysis of Leading Journals. *Death studies*, **39**, 453-462.
- Woolf, C. J., 2010: What is this thing called pain? *The Journal of Clinical Investigation*, **120**, 3742-3744.

- Woolf, C. J. and Q. Ma, 2007: Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron*, **55**, 353-364.
- Yaksh, T. L., S. A. Woller, R. Ramachandran and L. S. Sorkin, 2015: The search for novel analgesics: targets and mechanisms. *F1000Prime Reports*, **7**, 56.
- Yu, B. and P. Shinnick-Gallagher, 1994: Interleukin-1 beta inhibits synaptic transmission and induces membrane hyperpolarization in amygdala neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, **271**, 590-600.
- Zhang, J. M. and J. An, 2007: Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*, **45**, 27-37.
- Zhou, Y. Q., Z. Liu, Z. H. Liu, S. P. Chen, M. Li, A. Shahveranov, D. W. Ye and Y. K. Tian, 2016: Interleukin-6: an emerging regulator of pathological pain. *J Neuroinflammation*, **13**, 141.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1. Declaração de aprovação do projeto no CEUA (Comitê de Ética do Uso Animal) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília




Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal


Brasília, 29 de maio de 2018.


DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "ANÁLISE DE TRANSCRITOS POSTMORTEM DE CÉREBRO DE MUS MUSCULUS: BUSCA POR BIOMARCADORES DE INTENSIDADE DE DOR ANTEMORTEM.", Protocolo n.º 10/2018, sob responsabilidade da Professora Silviene Fabiana de Oliveira foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Mus musculus* (35 machos). A presente aprovação é válida pelo período de: 01/04/2018 a 31/12/2021.



Prof. Dr. Cássio José da Silva
Coordenador da CEUA – UnB





*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

8.2. Anexo 2. Termo de doação de camundongos do Biotério Central da
Universidade Católica de Brasília



**TERMO DE DOAÇÃO DE CAMUNDONGOS DO BIOTÉRIO CENTRAL DA
UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA**

Pelo presente instrumento de doação de camundongos, de um lado, o Biotério Central da Universidade Católica de Brasília, CNPJ 00.331.801/0004-82 ora designado DOADOR, neste ato representado pela colaboradora Mania Eduarda D. de Carvalho, Matrícula: 04083339; e de outro lado, Carlos Eduardo Cardoso da Silva Cruz, RG 3005 017, CPF 0812 728039144, doravante denominado DONATÁRIO celebram o presente TERMO DE DOAÇÃO, sem encargos, sob a forma e condições constantes nas seguintes cláusulas:

CLÁUSULA 1ª - Por livre e espontânea vontade, sem coação ou influência de quem quer que seja, a parte DONATÁRIO, de forma gratuita, ajusta com a segunda, de ora em diante denominada DOADORA, contrato relativo à doação de 16 Camundongos, da Linhagem C57, com idade de 25 semanas aceitando as condições e os termos estabelecidos.

CLÁUSULA 2ª - Os animais, objeto da presente DOAÇÃO, destinam-se a atividade de pesquisa e/ou ensino.

CLÁUSULA 3ª - O DOADOR não se responsabiliza, em hipótese alguma, pela substituição dos animais, que passarão à propriedade exclusiva do DONATÁRIO com a assinatura do respectivo TERMO.

CLÁUSULA 4ª - A partir da DOAÇÃO, a responsabilidade pelos animais, os respectivos encargos financeiros com transporte, alimentação, tratamentos, e descarte de suas carcaças, são exclusivamente do DONATÁRIO.

CLÁUSULA 5ª - O presente TERMO passa a vigorar entre as partes a partir da assinatura do mesmo.

E, por estarem justos e acordados, assinam as partes o presente TERMO DE DOAÇÃO em 02 (duas) vias de igual teor.

Brasília - DF, 12/09/18.

DONATÁRIO Carlos Eduardo Cardoso da Silva Cruz
Nº CEUA 1/2018 UNB.

DOADOR Mania Eduarda D. de Carvalho

8.3. Anexo 3. Protocolo de Homogeneização de tecidos

Laboratório de Imunologia Aplicada		PROCEDIMENTO TÉCNICO
Revisão 00	PT	Homogeneização de tecidos Para avaliar a carga fúngica e a produção de citocinas
Pág.: 77/87		

A. DESCRIÇÃO

Protocolo para homogeneização de tecidos dos pulmões, cérebro e coxim plantar utilizando o equipamento Precellys.

B. OBJETIVO

Avaliar a carga fúngica (quantificação de unidades formadoras de colônia) e a produção de citocinas de tecidos animais.

C. MATERIAIS NECESSÁRIOS

- Tubos (com tampa) para Precellys (estéreis, no caso de CFU). Não autoclavar o tubo tampado – esterilizar os 2 separadamente;
- Esferas de aço inoxidável (2-3/tubo);
- Pinça (para colocar as esferas nos tubos);
- Pipetas P200 e P1000 e ponteiras;
- Gelo

D. Reagentes:

- PBS.

E. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- Homogeneizador Precellys;

- Centrífuga para microtubos.

F. PROCEDIMENTO

PREPARO DAS AMOSTRAS

1. No caso de uma análise (e.g. CFU ou dosagem de citocinas) onde o dado será expresso em relação à massa de tecido (por exemplo, pg de TNF- α presente em um grama de tecido – TNF- α (pg)/g), pesar os tubos vazios, com tampa, e anotar o valor do peso (em gramas) em um papel. Lembre-se de identificar o nome da amostra nos tubos com caneta marcadora (evite usar fita crepe);
2. Coletar o órgão e colocá-lo no tubo. Pesar o tubo novamente e registrar o valor da pesagem (em gramas) em um papel;
 - *OBS.: Posteriormente, para a análise dos dados, dividir a quantidade de UFC ou pg de citocinas pela massa do órgão em gramas (peso do tubo com o órgão – peso do tubo vazio). O resultado será expresso como UFC ou pg de citocina/g de tecido.*
3. Adicionar as esferas de aço (2-3/tubo) e 1 mL de PBS gelado no tubo e mantê-lo no gelo até proceder com a homogeneização do tecido;

HOMOGENEIZAÇÃO NO PRECELLYS

4. Ligar o Precellys (figura 1) no botão localizado atrás do equipamento da direita;



Figura 1. Precellys.

5. No painel de controle (vide figura 2), procure um programa de homogeneização já criado anteriormente utilizando as setas de navegação

(setas para cima e para baixo) e o selecione apertando “valid”. Caso não tenha o programa de seu interesse, crie um a partir de um já existente.

6. Selecionar o programa/Programar de acordo com o órgão da amostra (vide figura 2):
 - Pulmões e cérebro:
4000 rpm, 3 ciclos de 15 segundos cada, 005 segundos de intervalo entre os ciclos;
 - Coxim plantar:
5500 rpm, 3 ciclos de 15 segundos cada, 005 segundos de intervalo entre os ciclos;



Figura 2. Painel de controle do Precellys.

7. Abra a tampa, retire o disco branco e coloque os tubos no equipamento formando uma distribuição balanceada. Confira se os tubos estão com as tampas bem rosqueadas para evitar vazamento de amostra;
8. Recoloque o disco na posição adequada. O menor dente do disco branco deve ficar entre os 2 pinos de aço, como indicado pelas setas vermelhas. Desta forma, os dentes maiores do disco ficam sobre os tubos amostrais, prendendo-os;
9. Abaixee a tampa até que ela trave e aperte “valid”. Espere o procedimento acabar para reabrir a tampa;
10. Retire os tubos do equipamento e mantenha-os sempre no gelo para evitar a degradação proteica da amostra.
11. Após a lise, as amostras de pulmão, coxim plantar e cérebro devem ficar de forma semelhante às amostras das figuras 3 e 4. Caso o tecido ainda não esteja bem homogeneizado, fazer um novo ciclo (lembrar de programar desta vez para somente um ciclo, e não 3) mantendo os mesmos parâmetros ou utilizando uma velocidade superior;

12. Terminado o uso do equipamento, recolha o disco branco, feche a tampa e desligue o equipamento (botão traseiro);

DESTINO DAS AMOSTRAS HOMOGENEIZADAS

13. Para análise de CFU, faça uma diluição seriada da amostra homogeneizada e inócupe no meio de cultura para recuperação do fungo;
14. Para dosagem de citocinas, centrifugue os tubos a 1000 x g e 4°C, durante 1 minuto, para separar os fragmentos teciduais remanescentes da fase líquida que contém as citocinas;
 - *Caso queira fazer CFU e dosagem de citocinas da mesma amostra, primeiro proceder com o CFU e só depois com a centrifugação da amostra para a coleta do sobrenadante;*
15. Colete o sobrenadante (contendo as citocinas) e transfira para um eppendorf identificado e armazene a amostra congelada até o uso;
16. Descontamine (caso tenham sido utilizados com material infectante) os tubos e esferas de aço utilizadas por esterilização em autoclave (120°C, 20-40 minutos) e posteriormente lave com água e sabão. Não descontamine as esferas de aço com água sanitária. Remova a escrita de caneta marcadora do tubo utilizando álcool $\geq 92\%$.



Figura 3. Aspecto do homogeneizado pulmonar à esquerda e de homogeneizado do coxim plantar à direita.



Figura 4. Aspecto do homogeneizado pulmonar (tubo da esquerda) e cerebral (tubo da direita) após centrifugação para a coleta do sobrenadante destinado à quantificação de citocinas

8.4. Anexo 4. Protocolo de Dosagem de citocinas

DOSAGEM DE CITOCINAS PELO MÉTODO DE ELISA

Utilizar placa de 96 poços

Importante: verificar a concentração indicada para cada citocina no momento da preparação da solução do anticorpo de captura, recombinante e detecção.

1º dia

- 1- Utilizando a placa de 96 poços, adicionar **25ul** da solução de anticorpo de captura diluído em Coating Buffer (verificar concentração de uso que é específica para cada tipo de Elisa) em cada poço.

Coating Buffer (10X)- 1 tubo com 12 ml

Diluição: adicionar 5ml de Coating Buffer (10X) em 45ml de água MillQ

Capture Antibody (Anti-mouse) IL1-beta (250x)

Diluição: 12ul de anticorpo de captura em 3ml de 1X Coating Buffer

- 2- Cobrir a placa cuidadosamente com parafilme .
- 3- Colocar na geladeira, observando para que ela esteja em uma superfície completamente plana e encubar a 4°C durante a noite para aderir o anticorpo.

2º dia

- 1- Preparar o Wash Buffer (PBS 1X + 0.05% Tween 20)

500ul de Tween 20 em 12ml de PBS1x

- 2- Lavar a placa 3 X por 1 minuto com descanso entre as lavagens e agitar de preferência com 250ul de Wash Buffer (PBS 1X + 0.05% Tween 20) sem encostar no fundo da placa. A lavagem é feita vertendo-se a placa diretamente sobre um recipiente de descarte, e depois batendo a placa sobre o papel toalha.

- 3- Bloquear a placa com 30ul do Diluente 1X (Elisa/Elispot Diluent) em cada poço e encubar em temperatura ambiente por 1 hora. Mantenha a placa sempre coberta com parafilme.

5X Elisa/Elispot Diluent- 1 tubo 150ml

Diluição: Adicionar 5ml de 5X Elisa/Elispot Diluent em 20ml de água MillQ

- 4- Neste período de 1h, descongelar as suas amostras e preparar o Standard (proteína recombinante) seguindo as concentrações específicas para cada citocina. Nesta etapa é necessário um cuidado ainda maior com a pipetagem para que a curva fique com as

concentrações certas. Lembre-se de que o standard deve ser mantido no gelo durante todo o experimento.

Standard: Mouse IL-1beta

Reconstituição: Adicionar 1ml de água MillQ no frasco

Diluição: Adicionar 25ul de Standard em 350ul de Diluente 1X (Elisa/Elispot Diluent)

(adicionar 1ml no frasco e fazer alíquotas com 25ul em cada tubo e guardar no -80, quando descongelar adicionar 350ul de Diluente, não reutilizar o tubo descongelado).

Passo opcional: lavar 2x com 60ul de Wash Buffer (PBS 1X + 0.05% Tween 20).

5- Adicionar 25ul de Diluente nos poços A1 e A2 que será o BRANCO, colocar 50ul da solução Standard (proteína recombinante) (antígeno conhecido) nos poços B1 e B2 aonde serão a curva de calibração em duplicata e adicionar 25ul de Diluente nos poços C1 e C2 até o H1 e H2. Em seguida colocar 25ul da amostra em cada poço de acordo com o desenho da placa previsto, cada amostra deve ser vortexada antes de ser colocada na placa, fechar a placa e incubar a temperatura ambiente por 2 horas ou a noite inteira para maior sensibilidade.

6- Desenho da placa:

	ANCO) 25ul diluente	ANCO) 25ul diluente	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado E
	l Solução Standards	l Solução Standards	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado E
	l diluente + 25ul STD do B	l diluente + 25ul STD do B	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado E
	l diluente 25ul STD do C	l diluente 25ul STD do C	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado E
	l diluente 25ul STD do D	l diluente 25ul STD do D	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado E
	l diluente 25ul STD do E	l diluente 25ul STD do E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado E
	l diluente 25ul STD do F	l diluente 25ul STD do F	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado E
	l diluente 25ul STD do G	l diluente 25ul STD do G	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado D	ostra Animal 1 lado E	ostra Animal 1 lado E

- Descartar os últimos 25ul

3º dia

7- Preparar o anticorpo de detecção, streptavidina (enzima). Verificar a concentração de uso que é específica para cada tipo de Elisa, manter a solução pronta no gelo até o uso.

Detection Antibody 0,5ml 1 tubo

Diluição: adicionar 12ul de Detection Antibody para 3ml de 1X Elisa/Elispot Diluent

- 8- Lavar os poços com 250ul de Wash Buffer (PBS 1X + 0.05% Tween 20) por 3x lavagens para retirar o antígeno que não se ligou ao anticorpo.
- 9- Adicionar 25ul da solução de anticorpo de detecção (Detection Antibody) em cada poço. Cobrir com parafilme incubar por uma hora a temperatura ambiente (anticorpo reconhece o complexo anticorpo antígeno)
- 10- Lavar a placa 3x com 60ul de Wash Buffer (PBS 1X + 0.05% Tween 20)

11- Adicionar 25ul em cada poço da solução Avidina-HRP que é a enzima, incubar a temperatura ambiente por 30 minutos coberto com papel alumínio.**Avidin-HRP (250X) 0,5ml 1 tubo****Diluição: Adicionar 12ul da Enzima em 3ml de diluente em tubo coberto com alumínio.**

- 12- Lavar 3x com 60ul de Wash Buffer (PBS 1X + 0.05% Tween 20) em cada lavagem por 1 a 2 minutos retirar o excesso de enzima.
- 13- Adicionar 25ul da (Substrate Solution) solução de substrato (temperatura ambiente) em cada poço e encubar por 15 minutos com papel alumínio a temperatura ambiente (marcador enzimático que vai reagir com a enzima). Pode ser de 3 a 15 minutos, perceber isso quando mudar o padrão de cores.
- 14- Após o aparecimento das cores azuis na curva, adicionar 12,5ul de (Stop solution) solução de parada (H₃PO₄) em cada poço. Limpar o fundo da placa e furar as bolhas com agulha eletrizada.
- 15- Analisar no espectrômetro, fazer a leitura a 450nm

8.5. Anexo 5. Kit comercial Invitrogen. Informação do produto

invitrogen
PRODUCT INFORMATION SHEET
Mouse IL-1 beta Uncoated ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative detection of mouse IL-1 beta

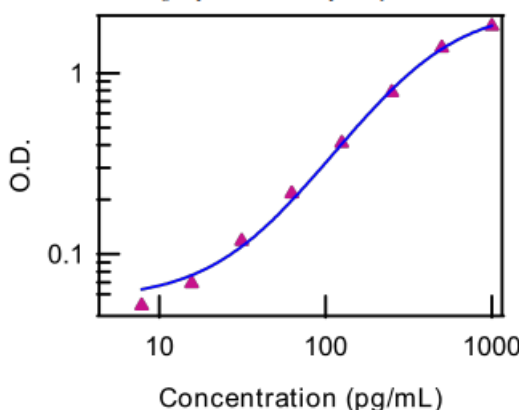
Catalog Number 88-7013

Pub. No. MAN0017504 **Rev.** B.0 [32]

WARNING! Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves. Safety Data Sheets (SDSs) are available from thermofisher.com/support.

Standard curve of mouse IL-1 beta

Do not use this standard curve to derive test results. A standard curve must be run for each group of microwell strips assayed.


Product information

Symbol	Contents	Mouse IL-1 beta Uncoated ELISA
REF	Catalog number	88-7013
—	Sensitivity	8 pg/mL
—	Standard curve range	8-1000 pg/mL
	Temperature limitation	Store at 2-8°C
LOT	Batch code	Refer to vial
	Use by	Refer to box label
	Caution	Contains preservatives

Description

This Mouse IL-1 beta Uncoated ELISA contains the necessary reagents, standards, buffers and diluents for performing quantitative enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). This ELISA set is specifically engineered for accurate and precise measurement of mouse IL-1 beta protein levels from samples including serum, protein lysate and supernatants from cell cultures.

Components of 2-plate format (2x96 tests)

- **Capture Antibody:** Pre-titrated, purified anti-mouse IL-1 beta antibody
1 vial (100 µL) Capture Antibody Concentrate (250X)
- **Detection Antibody:** Pre-titrated, biotin-conjugated anti-mouse IL-1 beta antibody
1 vial (100 µL) Detection Antibody Concentrate (250X)
- **Standard:** Recombinant mouse IL-1 beta for generating standard curve and calibrating samples
2 vials mouse IL-1 beta Standard (lyophilized): 1000 pg/mL upon reconstitution
- **Coating Buffer**
1 vial (2.5 ml) Phosphate Buffered Saline Concentrate (PBS, 10X)
- **5X ELISA/ELISPOT Diluent**
1 bottle (30 ml) Diluent Concentrate (5X)
- **Enzyme**
1 vial (250 µL) pre-titrated Streptavidin-HRP Concentrate (100X)
- **Substrate Solution:** Tetramethylbenzidine (TMB) Substrate Solution
1 bottle (20 ml)
- **96-well plates:** Corning Costar 9018
2 plates

Components of 10-plates format (10x96 tests)

- **Capture Antibody:** Pre-titrated, purified anti-mouse IL-1 beta antibody
1 vial (500 µL) Capture Antibody Concentrate (250X)
- **Detection Antibody:** Pre-titrated, biotin-conjugated anti-mouse IL-1 beta antibody
1 vial (500 µL) Detection Antibody Concentrate (250X)
- **Standard:** Recombinant mouse IL-1 beta for generating standard curve and calibrating samples
10 vials mouse IL-1 beta Standard (lyophilized): 1000 pg/mL upon reconstitution
- **Coating Buffer**
1 vial (12 ml) Phosphate Buffered Saline Concentrate (PBS, 10X)
- **5X ELISA/ELISPOT Diluent**
1 bottle (150 ml) Diluent Concentrate (5X)
- **Enzyme**
1 vial (1.25 mL) pre-titrated Streptavidin-HRP Concentrate (100X)
- **Substrate Solution:** Tetramethylbenzidine (TMB) Substrate Solution

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

ThermoFisher
 SCIENTIFIC

Mouse TNF alpha Uncoated ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative detection of mouse TNF alpha

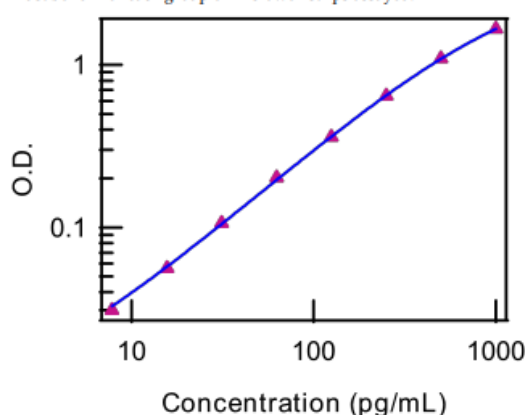
Catalog Number 88-7324

Pub. No. MAN0017423 Rev. B.0 [32]

WARNING! Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves. Safety Data Sheets (SDSs) are available from thermofisher.com/support.

Standard curve of mouse TNF alpha

Do not use this standard curve to derive test results. A standard curve must be run for each group of microwell strips assayed.



Product information

Symbol	Contents	Mouse TNF alpha Uncoated ELISA
REF	Catalog number	88-7324
—	Sensitivity	8 pg/mL
—	Standard curve range	8-1000 pg/mL
	Temperature limitation	Store at 2-8°C
LOT	Batch code	Refer to vial
	Use by	Refer to box label
	Caution	Contains preservatives

Description

This Mouse TNF alpha Uncoated ELISA contains the necessary reagents, standards, buffers and diluents for performing quantitative enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). This ELISA set is specifically engineered for accurate and precise measurement of mouse TNF alpha protein levels from samples including serum, plasma, tissue homogenate, lavage fluid and supernatants from cell cultures.

Components of 2-plate format (2x96 tests)

- **Capture Antibody:** Pre-titrated, purified anti mouse TNF alpha antibody
1 vial (100 µL) Capture Antibody Concentrate (250X)
- **Detection Antibody:** Pre-titrated, biotin-conjugated anti mouse TNF alpha antibody
1 vial (100 µL) Detection Antibody Concentrate (250X)
- **Standard:** Recombinant mouse TNF alpha for generating standard curve and calibrating samples
2 vials mouse TNF alpha Standard (lyophilized): 1000 pg/mL upon reconstitution
- **Coating Buffer**
1 vial (2.5 ml) Phosphate Buffered Saline Concentrate (PBS, 10X)
- **5X ELISA/ELISPOT Diluent**
1 bottle (30 ml) Diluent Concentrate (5X)
- **Enzyme**
1 vial (250 µL) pre-titrated Streptavidin-HRP Concentrate (100X)
- **Substrate Solution:** Tetramethylbenzidine (TMB) Substrate Solution
1 bottle (20 ml)
- **96-well plates:** Corning Costar 9018
2 plates

Components of 10-plates format (10x96 tests)

- **Capture Antibody:** Pre-titrated, purified anti mouse TNF alpha antibody
1 vial (500 µL) Capture Antibody Concentrate (250X)
- **Detection Antibody:** Pre-titrated, biotin-conjugated anti mouse TNF alpha antibody
1 vial (500 µL) Detection Antibody Concentrate (250X)
- **Standard:** Recombinant mouse TNF alpha for generating standard curve and calibrating samples
10 vials mouse TNF alpha Standard (lyophilized): 1000 pg/mL upon reconstitution
- **Coating Buffer**
1 vial (12 ml) Phosphate Buffered Saline Concentrate (PBS, 10X)
- **5X ELISA/ELISPOT Diluent**
1 bottle (150 ml) Diluent Concentrate (5X)
- **Enzyme**
1 vial (1.25 mL) pre-titrated Streptavidin-HRP Concentrate (100X)

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Mouse IL-6 Uncoated ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative detection of mouse IL-6

Catalog Number 88-7064

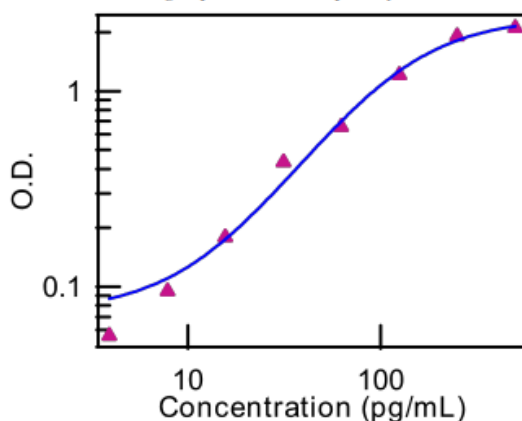
Pub. No. MAN0017508 Rev. B.0 [31]



WARNING! Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves. Safety Data Sheets (SDSs) are available from thermofisher.com/support.

Standard curve of mouse IL-6

Do not use this standard curve to derive test results. A standard curve must be run for each group of microwell strips assayed.



Product information

Symbol	Contents	Mouse IL-6 Uncoated ELISA
	Catalog number	88-7064
—	Sensitivity	4 pg/mL
—	Standard curve range	4-500 pg/mL
	Temperature limitation	Store at 2-8°C
	Batch code	Refer to vial
	Use by	Refer to box label
	Caution	Contains preservatives

Description

This Mouse IL-6 Uncoated ELISA contains the necessary reagents, standards, buffers and diluents for performing quantitative enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). This ELISA set is specifically engineered for accurate and precise measurement of mouse IL-6 protein levels from samples including serum, plasma, cell lysates and supernatants from cell cultures.

Components of 2-plate format (2x96 tests)

- **Capture Antibody:** Pre-titrated, purified anti-mouse IL-6 antibody
1 vial (100 µL) Capture Antibody Concentrate (250X)
- **Detection Antibody:** Pre-titrated, biotin-conjugated anti-mouse IL-6 antibody
1 vial (100 µL) Detection Antibody Concentrate (250X)
- **Standard:** Recombinant mouse IL-6 for generating standard curve and calibrating samples
2 vials mouse IL-6 Standard (lyophilized): 500 pg/mL upon reconstitution
- **Coating Buffer**
1 vial (2.5 ml) Phosphate Buffered Saline Concentrate (PBS, 10X)
- **5X ELISA/ELISPOT Diluent**
1 bottle (30 ml) Diluent Concentrate (5X)
- **Enzyme**
1 vial (100 µL) pre-titrated Avidin-HRP Concentrate (250X)
- **Substrate Solution:** Tetramethylbenzidine (TMB) Substrate Solution
1 bottle (20 ml)
- **96-well plates:** Corning Costar 9018
2 plates

Components of 10-plates format (10x96 tests)

- **Capture Antibody:** Pre-titrated, purified anti-mouse IL-6 antibody
1 vial (500 µL) Capture Antibody Concentrate (250X)
- **Detection Antibody:** Pre-titrated, biotin-conjugated anti-mouse IL-6 antibody
1 vial (500 µL) Detection Antibody Concentrate (250X)
- **Standard:** Recombinant mouse IL-6 for generating standard curve and calibrating samples
10 vials mouse IL-6 Standard (lyophilized): 500 pg/mL upon reconstitution
- **Coating Buffer**
1 vial (12 ml) Phosphate Buffered Saline Concentrate (PBS, 10X)
- **5X ELISA/ELISPOT Diluent**
1 bottle (150 ml) Diluent Concentrate (5X)
- **Enzyme**
1 vial (500 µL) pre-titrated Avidin-HRP Concentrate (250X)
- **Substrate Solution:** Tetramethylbenzidine (TMB) Substrate Solution
1 bottle (100 ml)
- **96-well plates:** Corning Costar 9018

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.