



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Clara Cecilia Reyes Ochoa

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO BIOPOLIMERO
DE FIBRINA COMO ARCABOUÇO PARA CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS EM LESÕES NA DURA-
MATER EM RATOS.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor (a) em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior

**Botucatu (SP)
2019**

Clara Cecilia Reyes Ochoa

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO BIOPOLIMERO DE
FIBRINA COMO ARCABOUÇO PARA CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS EM LESÕES NA DURA-MÁTER EM RATOS**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor (a) em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior.

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Ochoa, Clara Cecilia Reyes.

Estudo do uso do biopolímero de fibrina como arcabouço para células tronco mesenquimais em lesões na dura-máter em ratos / Clara Cecilia Reyes Ochoa. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rui Seabra Ferreira Júnior

Capes: 50500007

1. Biocompatibilidade. 2. Biopolímeros. 3. Fibrina. 4. Células-tronco. 5. Regeneração.

Palavras-chave: Biopolímero de Fibrina; biocompatibilidade; células tronco mesenquimais; lesão dural; regeneração.



A mis padres por ser mi

Inspiración, soporte y puerto seguro!



AGRADECIMENTOS

À Deus!

À meus pais e irmãos pelo incentivo na procura dos meus sonhos e aceitar minha ausência no diário viver.

Ao meu amor Charles Silva, amigo, companheiro de luta e motor para continuar.

Ao meu cachorro Darko. Companheiro de todas horas e terapeuta na tormenta.

Ao meu orientador o Pro. Dr Rui Seabra pela oportunidade e confiança, além disso, pelas lembranças profissionais de uma época onde fui feliz.

Ao Pro. Dr. Benedito Barraviera pelo tempo brindado para me escutar e aconselhar. Algumas horas isso foi gasolina para meu espirito.

À Dra. Lucilene pela ajuda e pelo privilégio de aprender do seu lado.

À Renata e família por ser mais que amigos um segundo lar para me.

À Isameri e família pelo carinho e cuidado.

À Claudia pela paciência e carinho que com seu conhecimento aportou no processo do meu doutorado.

À Patrícia, Sergio, Leonardo, Francilene e ketlin pelo tempo, ensinamentos e contribuição na realização deste projeto.

À Bety pela amizade, apoio e ser o pedacinho da Colômbia na distância.

À Sandra Stoppe Capuano e família, por me abrir as portas da sua casa.

À Camila, Elenize, Cristiano, Laudiceia, Leticia (pocajontas), selma, Juliana, Wendel e marquinho pelos conselhos, amizade e horas de risada.

À Bruna pelo sorriso e colaboração no Departamento de Doenças Tropicais.

À Denise pelo auxílio no processamento das laminas histológicas.

Agradeço a todos os funcionários do CEVAP e todas as pessoas que de um ou outro modo contribuíram para a realização deste projeto ou para me manter feliz longe de casa.

Aos ratos do experimento minhas desculpas e eterna gratidão.



AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP UNESP Botucatu).

Ao Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB UNESP.

Ao Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências – IB UNESP Botucatu.

À Unidade de Pesquisa Experimental – UNIPEX UNESP Botucatu.

Ao Laboratório de Regeneração Nervosa do Instituto de Biologia – UNICAMP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).





“ Não deixem que lhe façam pensar que você não é capaz de fazer algo. Se você tem um sonho, tem que protegê-lo. Nunca deixe que ninguém impeça você de sonhar. Se quer alguma coisa, se quer realmente, lute por isso e...Ponto final ”.

- À Procura da Felicidade.



RESUMO

Terapias efetivas de lesões na dura-máter representam um enorme desafio à medicina, devido à dificuldade de suturas com êxito e de vedação das meninges, aumentando os índices de mortalidade e morbidade destes pacientes. Biomateriais que possam favorecer a regeneração e impedir o extravasamento de líquido cefalorraquidiano sem produzir efeitos adversos são alvos da indústria farmacêutica. Este estudo avaliou a biocompatibilidade do Biopolímero de Fibrina (BPF) derivado de peçonha de serpente como arcabouço tridimensional para células-tronco mesenquimais (CTMs) em lesões na dura-máter de ratos wistar (*Rattus norvegicus*). As CTMs foram caracterizadas na quinta passagem por citometria de fluxo (ICAM, CD90, CD34, CD45, CD11b) e diferenciadas em linhagens osteogênica e adipogênica. Foram utilizados 4 grupos (n=20) de ratos Wistar machos adultos. O grupo C (controle) foi submetido à durotomia. Os grupos tratados foram submetidos à durotomia seguido de: Tratamento com Biopolímero de fibrina (BPF); células-tronco mesenquimais (CTMs); e BPF+CTMs, formado pela associação do Biopolímero de fibrina e células-tronco mesenquimais. As CTMs marcadas e associadas ao BPF foram avaliadas por imageamento da fluorescência *in vivo*. Os animais foram avaliados neurológica e clinicamente quanto à sensibilidade dolorosa, deiscência de pontos, infecção da ferida, consumo de alimento e água e habilidades motoras. Foram realizadas eutanásias dos animais aos 7 e 28 dias após cirurgia e coletado material para análise histológica, e proteômica. A extração de proteínas foi feita pela combinação com espectrometria de massa baseada no método de “shotgun”. O cultivo de CTMs mostrou na caracterização, células com morfologia congruente de CTMs, adesão em substrato plástico, expressão de marcadores positivos ICAM e CD90, e ausência a marcadores negativos CD34, CD45 e CD11b, autorrenovação e diferenciação em linhagens osteogênica e adipogênica. As CTMs foram visualizadas íntegras por imageamento *in vivo* da associação após 6 horas de implantação. Não houve diferença para os parâmetros deiscência, infecção da ferida, consumo de alimento e água e habilidades motoras entre os grupos. Os grupos BPF e BPF+CTMs apresentaram menor manifestação de sensibilidade dolorosa, em comparação aos grupos CTMs e C. Nas análises histológicas, o grupo C, se apresentou com uma lesão na dura mater ou lacuna no lugar da lesão, sem nem um tipo de atividade celular. No grupo BPF não foi observada bioatividade celular, nem manifestações de rejeição do

implante no lugar da lesão. Nos grupos CTMs e BPF+CTMs foi observada atividade celular com presença de infiltrado inflamatório e interface. No entanto, no grupo BPF+CTMs a resposta inflamatória se apresentou exacerbada, levando a uma inflamação granulomatosa, indicando que a presença das CTMs foi responsável por este efeito. O perfil proteômico evidenciou principalmente moléculas envolvidas em processos celulares, desenvolvimento de sistema e resposta ao estímulo. A proteína PENK responsável pela modulação da expressão da dor foi expressa apenas naqueles grupos que não utilizaram BPF. Conclui-se portanto que o Biopolímero de Fibrina pode ser utilizado com segurança na reparação de lesões de dura mater, além de ser um excelente scaffold para células tronco.

Palavras-chave: lesão dural; Biopolímero de Fibrina, biocompatibilidade; células tronco mesenquimais, regeneração.

ABSTRACT

Effective therapies to treat dura mater injuries represents a major challenge to medicine due to its lack of sutures with high seal properties upon meninges, increasing the rate of mortality and morbidity among these patients. Biomaterials that promotes regeneration and prevent extravasation of cerebrospinal fluid, without producing adverse effects, are targets of the pharmaceutical industry. The present study aimed to evaluate the biocompatibility of the use on Fibrin Biopolymer (FBP) derived from snake venom as tridimensional scaffold to mesenchymal stem cells (MSC) on rat's dura mater injury. Mesenchymal stem cells characterization was performed at fifth passage by flow cytometry (ICAM, CD90, CD34, CD45, CD11b) and differentiated into osteogenic and adipogenic lineages. Four groups (n=20) os male Wistar rats were used. Group C (control) animals were submitted to durotomy only. Treatment groups were submitted to durotomy followed by: Fibrin Biopolymer (FBP); mesenchymal stem cells (MSC); and FBP+MSCs, consisting on the association between fibrin biopolymer and mesenchymal stem cells. Marked MSCs associated to FBP were evaluated through in vivo fluorescence imaging. Animals were evaluated neurologically and clinically regarding pain sensitivity, dehiscence of suture, wound infection, feeding e motor capacity parameters. Animals were euthanized at seven and 28 days after surgical procedure, and biological material was collected to histological and proteomic analysis. Protein extraction was performed by mass spectrometry based on "shotgun" method. Cultivated MSC presented on characterization congruent morphology to this lineage, adhesion on plastic substrate, positive expression to markers ICAM and CD 90, negative expression to markers CD34, CD45 e CD11b, self-renewal and differentiation into osteogenic and adipogenic lineages. MSC showed integrate visualization on in vivo imaging of this association six hours after implantation. No difference occurred between for dehiscence, wound infection feeding and motor capacity parameters. FBP and FBM+MSC groups showed lower pain sensitivity manifestations, compared to groups MSC and C. Histological analysis showed that control group presented a dura mater lesion or gapon the surgery site, without any type of cell activity. Cell activity or rejection indicators at lesion site was not observed in FBP group. Groups MSC and FBP+MSC showed cell activity with presence of inflammatory infiltrate and interface, however, in group FBP+MSC the inflammatory response was exacerbated, leading to a granulomatous inflammation caused by the

presence of MSCs. The proteomic profile showed mainly molecules involved on cellular processes, system developing and answer to stimulus. PENK protein, responsible for modulation of pain expression, was expressed only on those groups without FBP. Therefore, we conclude that the fibrin biopolymer is suitable for safe applying on repair of a lesion in dura mater, in addition to being an excellent scaffold to mesenchymal stem cell

Key-words: regeneration, biocompatibility, bioactivity, fibrin biopolymer, mesenchymal stem cells, dural injury.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<u>Figura 1.</u> Figura 1. Representação esquemática da circulação do LCR no crânio, mostrando as membranas do cérebro. Adaptado da fonte (20).....	12
<u>Figura 2.</u> Ilustração esquemática da inervação meníngea, implicados em ativar e / ou sensibilizar o sistema sensorial meníngeo. (Estrutura vermelha) Relação dos constituintes corticais na contribuição para nocicepção meníngea e dor. Adaptado de (36).....	14
<u>Figura 3.</u> Serpente Cascavel, nome científico <i>Crotalus durissus terrificus</i>	18
<u>Figura 4.</u> Desenho experimental indicando os grupos e tempo de coleta de material para análises histológico e proteômico.....	37
<u>Figura 5.</u> Ilustração de uma broca troncocônica.....	40
<u>Figura 6</u> Técnica cirúrgica (A) aparência macroscópica do córtex cerebral com meninges intactas. (B) aparência macroscópica do córtex cerebral com lesão na dura mater (Seta branca) lesão na dura mater.....	41
<u>Figura 7.</u> Técnica de perfusão. (Seta preta) cânula inserida no ventrículo esquerdo do coração.....	44
<u>Figura 8</u> Craniectomia total da região dorsal.....	44
<u>Figura 9.</u> Cérebro de rato sometido a lesão na dura mater. (A) tecido cerebral extraído com ajuda da técnica de perfusão intracardiaca, (Seta preta) Borda da lesão, grupo C. (B) Cérebro de rato sem perfusão intracardiaca, (Seta preta) Borda da lesão, grupo BPF.....	45

<u>Figura 10.</u> Cultura primária de células tronco mesenquimais aderidas, células confluentes com morfologia fusiforme.....	49
<u>Figura 11.</u> (A) Diferenciação adipogênica de células-tronco mesenquimais. (B) Diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais.....	50
<u>Figura 12.</u> Procedimento cirúrgico para a realização da lesão experimental na dura mater de ratos. A. lesão sem tratamento, grupo C. B. lesão preenchida com CTMs. C. lesão preenchida com BPF+ CTMs. D. lesão preenchida com BPF.....	51
<u>Figura 13.</u> A) Imagem de fluorescência da associação das células marcadas com o nano cristal QTRACKER e BPF; B) Raio x com sobreposição da imagem de fluorescência.....	52
<u>Figura 14.</u> Região da lesão na dura mater de ratos, vista transversal, grupo controle. A. 7 dias após cirurgia. (a) Córtex cerebral, (seta reta) descontinuidade das meninges. B. 28 dias após cirurgia. (b) Presença de lacuna. (seta curva) depósito de hemossiderina.....	54
<u>Figura 15.</u> Região da lesão na dura mater de ratos, vista transversal, grupo BPF. A. 7 dias após cirurgia. (a) Córtex cerebral, (seta) Descontinuidade nas meninges. B. 28 dias após cirurgia. (b) Presença de lacuna.....	55
<u>Figura 16.</u> Coleta do cérebro de rato após eutanásia. Animal 7 dias, grupo BPF. (Seta) Presença de BPF aderido ao osso.....	55
<u>Figura 17.</u> Região da lesão na dura mater de ratos, vista transversal, grupo CTMs. A. 7 dias após cirurgia. (a) Infiltrado celular. (Cabeça da seta preta) Astrócito, (Cabeça da seta branca) hemácia. B. 28 dias após cirurgia. (Seta reta) Depósito de hemossiderina, (seta curva) Interface.....	56
<u>Figura 18.</u> Região da lesão na dura mater de ratos, vista transversal, grupo BPF + CTMs. 7 dias após cirurgia. (a) Córtex cerebral, (b) Infiltrado celular, (Cabeça da seta	

preta) região da lesão, (seta curva) Interface. (Cabeça da seta branca) Células epiteloideas. (Seta reta) Células gigantes de tipo Langhans.....57

Figura 19. Região da lesão na dura mater de ratos, vista transversal, grupo BPF + CTMs. 28 dias após cirurgia. (a) Córtex cerebral, (b) Infiltrado celular, (seta curva) Interface. (Cabeça da seta preta) Células gigantes de tipo Langhans. (Seta reta) Granuloma. (Cabeça da seta branca) Hemossiderina.....58

Figura 20. Gráfico de rede de interação do software STRING (versão 10.5), proteínas identificadas grupo C.....60

Figura 21. Gráfico de rede de interação do software STRING (versão 10.5), proteínas identificadas grupo BPF.....61

Figura 22. Gráfico de rede de interação do software STRING (versão 10.5), proteínas identificadas grupo CTMs.....62

Figura 23. Gráfico de rede de interação do software STRING (versão 10.5), proteínas identificadas grupo BPF+CTMs.....63

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 01.</u> Análise descritivo, comparando os quatro grupos de estudo em relação a infiltrado celular, presença de células gigantes, presença de células epiteloideas e interface por cada tempo de estudo.....	59
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **LCR:** Líquido cefalorraquidiano.
- **SF:** Selante de Fibrina.
- **CTMs:** Células Tronco Mesenquimais.
- **BPF:** Biopolímero de Fibrina.
- **SNC:** Sistema Nervoso Central.
- **Anvisa:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- **Ag:** Expressão específica do antígeno de superfície.
- **PEG:** Polietileno glicol
- **H & E:** hematoxilina-eosina

SUMÁRIO

Capítulo I

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1.1 Considerações anatômicas e fisiológicas.....	11
1.1.1 Lesões na dura-máter	12
1.2 Biomateriais e sua aplicação.....	14
1.3. Selante de Fibrina	16
1.4. Células tronco mesenquimais.....	20
1.5 BPF associado a CTMs.....	22
2. OBJETIVO GERAL	23
2.1. Objetivos específicos	23
3. REFERÊNCIAS.....	24

Capítulo II

1. INTRODUÇÃO	35
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1. Aspectos éticos e origem do material em estudo	37
2.2. Desenho Experimental	37
2.3. Isolamento e cultura das células a partir de ratos	38
2.3.1. Coleta da medula óssea de rato.....	38
2.3.2. Isolamento da fração de células mesenquimais.....	38
2.3.3 Caracterizações celular por citometria de fluxo.....	39
2.3.4 Caracterizações por diferenciações celulares	39
2.4. Procedimento cirúrgico.....	40
2.5. Imageamento de fluorescência <i>in vivo</i> da associação BPF e CTMs.....	42
2.6. Delineamento dos tratamentos.....	42
2.7 Eutanásias dos animais e coleta de tecidos.....	43
2.8. Histologia.....	45
2.9 Analise Proteômica	46
2.9.1 Extrações de proteínas das amostras de tecido cerebral.....	46
2.9.2 Quantificações de proteínas pelo método de Bradford	46
2.9.3 Eletroforeses unidimensional	47
2.9.4 Digestão Enzimática das proteínas em solução.....	47
2.9.5 Sequenciamentos peptídico por espectrometria de massas	47
2.9.6 Análises dos dados	48

3. RESULTADOS	49
3.1 Caracterização de células-tronco mesenquimais	49
3.1.2 Caracterizações por diferenciações celulares	50
3.2. Técnica cirúrgica	50
3.3. Imageamento de fluorescência <i>in vivo</i> da associação BPF e CTMs.....	52
3.4. Avaliação clínica.....	52
3.5 Análise Histológica	53
3.6 Análise proteômica.....	59
4. DISCUSSÃO	64
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
6. CONCLUSÃO.....	73
7. REFERÊNCIAS.....	744
APÊNDICES.....	81



CAPITULO 1

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Considerações anatômicas e fisiológicas

O Sistema Nervoso Central (SNC) está contido e protegido na caixa craniana e no canal vertebral, sendo envolvido por três membranas de tecido conjuntivo chamadas meninges (1).

Estas três membranas conjuntivas que envolvem o SNC e a medula, são de dentro para fora: pia-máter, aracnóide e a dura-máter (do latim, dura, duro; mater, mãe (2), sendo esta última a mais externa, espessa e resistente, formada por abundantes fibras colágenas e ricamente innervada (3).

A dura-máter, é uma camada de tecido conjuntivo altamente vascularizada, que se apoia no crânio, está dividida anatomicamente em três camadas, as quais são fundidas na maioria dos lugares e só separadas para formar os seios venosos. Anatomicamente suas três camadas são: a camada endosteal (perióstica), a camada meníngea interna, e a camada de células da borda dural, ou neurotélion subdural (4).

A camada de células da borda dural é aderida na camada externa da aracnóide por junções celulares ocasionais, ou desmossomas, que sob várias condições patológicas, como no caso de lesão dural pode acontecer separação desta camada de fronteiras da dura e da aracnóide (4).

A dura-máter e a aracnóide estão separadas por um espaço virtual denominado espaço subdural, e entre a aracnóide e a pia-máter há o espaço subaracnóideo contendo o líquido cefalorraquidiano (LCR) (3,5), que é um ultrafiltrado de plasma produzido pelas células ependimárias dos plexos coróides (6). As células ependimárias que revestem os ventrículos são modificadas e formam o epitélio dos plexos coróides. Estas células transportam água, íons e proteínas (7,8), produzindo o LCR.

O LCR protege o SNC de diferentes maneiras envolvendo a homeostase metabólica, fornecimento de nutrientes, funcionando como sistema linfático e regulação da pressão intracraniana (9). É reabsorvido pelas células das vilosidades aracnóideas, também chamadas granulação aracnóidea, e retorna à corrente sanguínea, nos seios venosos da dura-máter (6) (Figura 1).

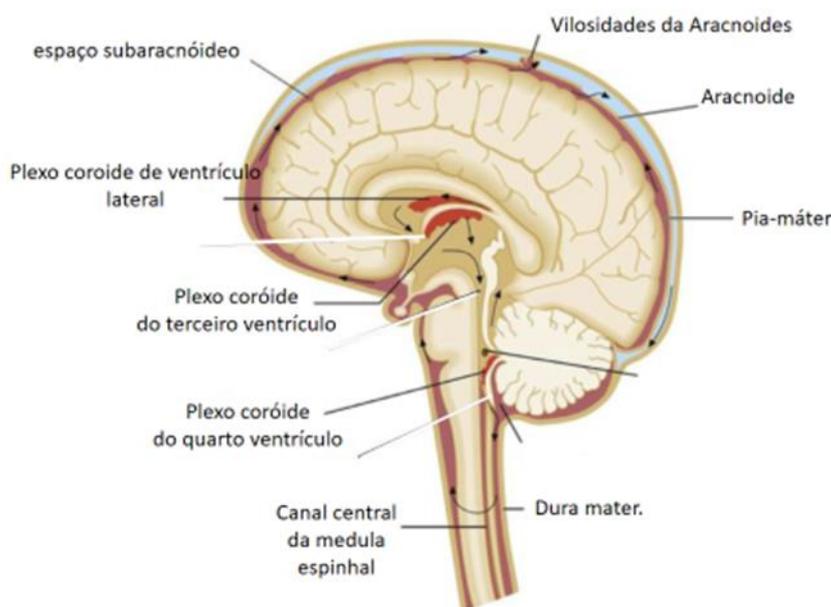


Figura 1. Representação esquemática da circulação do LCR no crânio, mostrando as membranas do cérebro. Adaptado da fonte (10).

O espaço do LCR é separado do sistema vascular pela barreira hematoencefálica, responsável pela manutenção da homeostase do cérebro. O sistema de barreira é permeável não apenas para pequenas moléculas, mas também para macromoléculas e células circulantes (9).

A inervação da dura-máter origina-se no gânglio trigeminal, o que as torna capazes de ser ativação de neurônios sensoriais (11).

1.1.1 Lesões na dura-máter

O rompimento da aracnoide e da dura-máter permite que o LCR flua ou vaze, um evento que pode levar a complicações potencialmente fatais (12).

A lesão da dura-máter pode causar complicações como fístula, encefalite, meningite, problemas para cicatrização, cefaleias e aprisionamento da raiz nervosa (13), entre outros referentes ao vazamento de LCR. Nesse contexto, muitos materiais têm sido utilizados para o reparo da lesão, porém sem consenso acerca da sua utilização (14,15).

A lesão na dura-máter tem como causa mais frequente o traumatismo (16,17). A lesão acidental na cirurgia da coluna lombar é uma das complicações mais comuns com uma prevalência de 1% a 17% (16).

A quantidade e a complexidade dos procedimentos cirúrgicos têm aumentado, com maior incidência o número de lesões durais (18).

A maioria das lesões são reconhecidas como intraoperatórias. Em alguns casos, nos quais a lesão é incompleta, afetando apenas a camada externa da dura-máter sem atingir a aracnoide, embora, pode não haver extravasamento de LCR imediato, mas isso pode vir a ocorrer nos pós-operatório (18). Por tal motivo, a lesão intraoperatória da dura-máter é causa de vários transtornos intra e pós-operatórios, devido à dificuldade para conter o LCR, levando a um aumento do tempo de cirurgia, formação de fístula liquórica e pseudomeningocele, podendo ocasionar também déficit neurológico, infecções do sítio cirúrgico e do SNC (19,20).

A fístula do LCR é uma complicação neurocirúrgica frequente, ocorrendo de 1% a 27% dos casos, as principais manifestações clínicas são a cefaléia, náusea, tontura, fotofobia e zumbido, essa condição pode estar associada à cicatrização inadequada e infecção da ferida operatória, meningite e pseudomeningocele (21).

O Vazamento do LCR pode ocorrer após a cirurgia cerebral ou espinal, porque o fechamento primário na dura-máter às vezes pode ser difícil. Um estudo revelou que apenas 6% dos fechos convencionais suturados em procedimentos cranianos e da coluna vertebral eram bons (22). Portanto, para evitar o vazamento do LCR, a procura de um material de vedação é necessária (23).

Lesão tecidual associada com inflamação local é um dos principais ativadores e sensibilizadores dos nociceptores da dor. (24) (Figura 3). Estudos pré-clínicos de referência em roedores forneceram apoio para essa hipótese, mostrando que as meninges aferentes são sensores e podem se tornar persistentemente ativadas e sensibilizadas por estímulos mecânicos locais (25).

A ativação do nervo trigêmeo (Figura 2) leva à vasodilatação e inflamação neurogênica (26) como visto em humanos durante o ataque de enxaqueca (27). Além disso, a ativação de neurônios sensoriais meníngeos foi recentemente proposta para ser um mecanismo primário na origem de dores de cabeça (28).

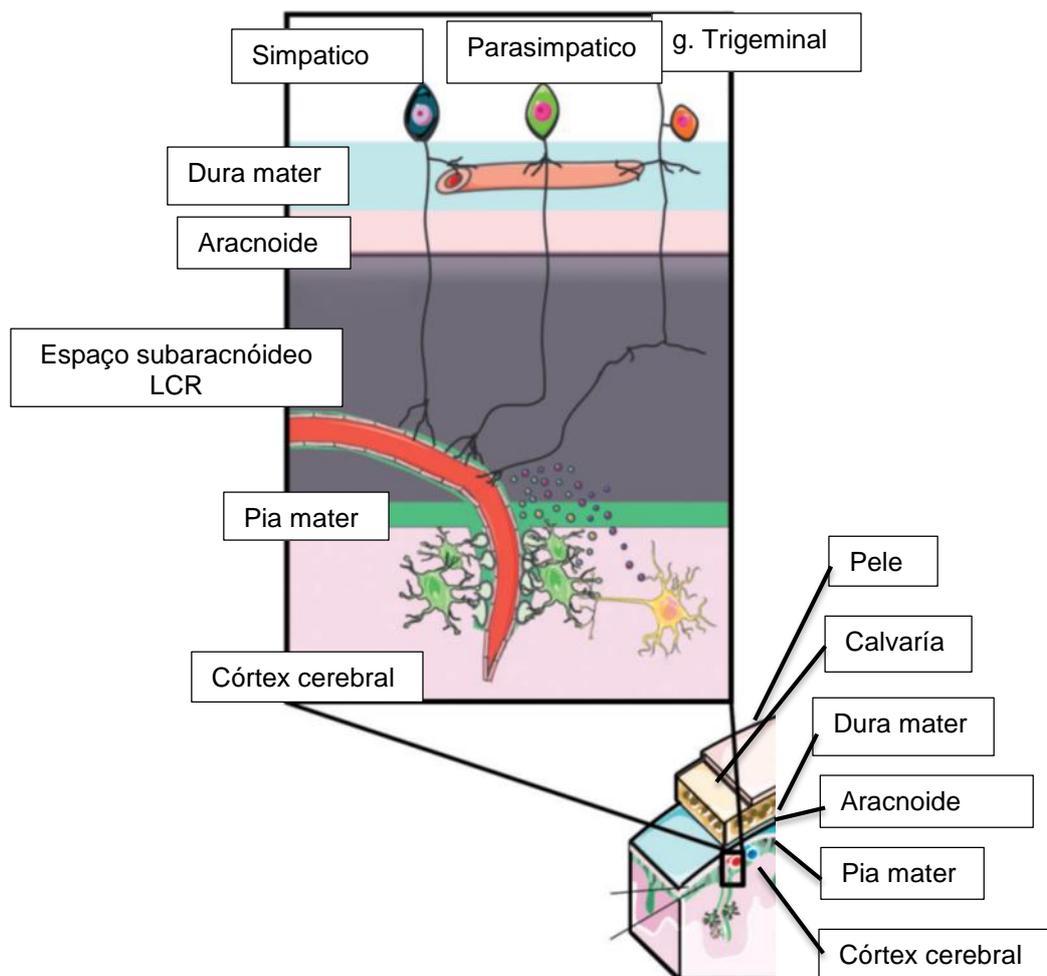


Figura 2. Ilustração esquemática da inervação meníngea, implicados em ativar e / ou sensibilizar o sistema sensorial meníngeo. (Estrutura vermelha) Relação dos constituintes corticais na contribuição para nocicepção meníngea e dor. Adaptado de (29).

Várias formas de reparo após lesão dural, têm sido utilizadas como a membrana acnótica, fásia muscular (30), selantes de fibrina (15,31), RADA16-I que é um suporte sintético de nanofibra peptídica (32), pontos simples, membrana de colágeno bovino, tela de silicone (14), tela de Vicryl (33) e solução éster de polietileno glicol (PEG) que é um hidrogel para neurocirurgia (34), entre outras.

1.2 Biomateriais e sua aplicação

O termo biomaterial é definido como dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos (incluindo fluidos biológicos), com aplicações diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas, podendo ser constituídos de compostos de

origem sintética ou natural, assim como de materiais naturais quimicamente modificados, tanto na forma de sólidos quanto de géis, pastas ou mesmo líquidos (35).

Inicialmente para seu uso, buscavam-se os materiais bioinertes, ou seja, a obtenção de materiais biocompatíveis que pudessem substituir um tecido danificado e prover suporte mecânico, com mínima resposta biológica do paciente (36). Com o passar do tempo, buscou-se aumentar a interação com o tecido hospedeiro, na atualidade tem incorporado ainda o conceito de biomimética, na procura de materiais que permitam uma interface ativa com o tecido, atuando de forma específica, com estimulação em nível celular (36,37).

Embora não seja possível generalizar quais devam ser as características dos biomateriais, pois estas dependem fundamentalmente de sua aplicação, algumas propriedades devem ser avaliadas. Entre elas, destacam-se propriedades biológicas, como a biocompatibilidade, associada à citotoxicidade, alergenicidade e proliferação celular entre outras (36,38), ou seja, o biomaterial deve apresentar propriedades compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta adequada dos mesmos (39). Deve, também, ser isento de produzir qualquer resposta biológica adversa local ou sistêmica, ou seja, o material não deve ser tóxico, carcinogênico, antigênico ou mutagênico (40).

Propriedades físicas, como morfologia da superfície, rugosidade, porosidade e permeabilidade, propriedades mecânicas como tensão de ruptura (36,41), estas duas características relacionadas a biofuncionalidade que deve ter o biomaterial implantado para cumprir a função desejada durante o tempo necessário, que pode ser longo em caso de implante permanente, ou bem mais curto em caso de implante temporário (42) e propriedades químicas, como a forma e o tempo de biodegradação. São características desejáveis de um biomaterial ter uma taxa de reabsorção conhecida e coincidente com a formação do novo tecido desejado e uma superfície adequada para a fixação, diferenciação e proliferação de células para favorecer a formação dos tecidos no local do implante (43).

O biomaterial quando inserido em meio vivo, deve substituir, complementar ou auxiliar um tecido do organismo, desempenhando funções sem efeito nocivo ao hospedeiro (44). O biomaterial empregado pode ser classificado como permanente ou temporário. O material permanente é utilizado com o objetivo de substituir um tecido por tempo indeterminado. Dessa forma, é produzido de modo a manter as suas características mecânicas e físico-químicas (45). Por outro lado, existem situações

onde se necessita de um suporte que preencha apenas temporariamente a região lesada, até que a recomposição tecidual se concretize, ou ainda que direcione o processo regenerativo. Nesse caso, uma alternativa é o biomaterial temporário (46).

Quando a substituição na dura-máter é necessária devido a lesões, os autoenxertos ou enxertos alógenos derivados de músculos e fáscia podem ser usados (47, 48). No entanto, esses tecidos nem sempre estão disponíveis na quantidade ou no formato desejado e devido a fatores como baixa disponibilidade e a possibilidade de transmissão de doenças (48). Assim sendo, substitutos com propriedades adequadas são fonte constante de pesquisas, buscando o reparo de tecidos lesionados (49,50).

Várias estruturas autólogas e materiais sintéticos têm sido utilizados na reparação da dura-máter, incluindo gordura autóloga, dura-máter liofilizada e materiais sintéticos como por exemplo o enxerto de malha de Vicryl (poliglactina) com grande variabilidade nos resultados clínicos (14,33) e substituto dural liofilizada de cadáveres, mas há a desvantagem do risco de transmissão de doenças infecciosas (51).

Adesivos teciduais como cola de fibrina, compostos à base de colágeno, agentes hemostáticos e cianoacrilatos são adjuntos comuns em cirurgia prática (52,53) para reduzir as complicações relacionadas ao vazamento de LCR e fornecer uma vedação mais definida (54).

A recente e promissora área da terapia celular vem abrindo perspectivas inovadoras no tratamento de inúmeras doenças, utilizando terapias celulares, fatores de proliferação e diferenciação celular e biomateriais que permitem ao próprio organismo reparar tecidos e órgãos lesados (55,56).

1.3. Selante de Fibrina

Os selantes de fibrina comerciais (SF) são uma formulação utilizada para criar um coágulo de fibrina (22,57,58) sendo muito utilizados durante procedimentos neurocirúrgicos com esta finalidade. Eles podem ser utilizados para a reparação de lesões durais e hemóstasia intra-operatória (59). Evidências de estudos controlados, não randomizados, sugerem que os SF podem ser eficazes na prevenção de vazamentos de LCR com um perfil de segurança aceitável (31).

Entre as utilidades em procedimentos cirúrgicos de várias especialidades, inclui hemóstasia, cicatrização, suporte de sutura e adesividade tecidual (60). Além disso,

apresentam excelente tolerância tecidual e são reabsorvidos durante a cicatrização da ferida, sem reação de corpo estranho ou fibrose extensa (61).

O efeito selante baseia-se na reprodução do estágio final da cascata da coagulação, onde o fibrinogênio é segmentado em monômeros de fibrina, pela ação da trombina em uma proteólise. Os monômeros de fibrina formam então ligações cruzadas entre si pela ação do fator XIII e íon cálcio, sofrendo polimerização, formando os coágulos estáveis com propriedades adesivas (62,63). O coágulo de fibrina adere ao tecido e possui capacidades hemostáticas (cessar o sangramento) e adesivas (selar e agir como bio-cola) (64).

Foi relatado que o processo de cicatrização tem início imediato com o depósito de fibrina e fibronectina no sítio da lesão. Em resposta fibroblastos dos tecidos adjacentes se proliferam e migram para o local da injúria, produzindo principalmente colágeno tipo I e células da matriz extracelular que serão depositadas no local lesado (65).

Existem estudos comparando o uso de SF com outros produtos usados para lesões durais. Por exemplo, o DuraSeal™ que se compõe de éster de polietilenglicol (PEG) este é um polímero hidrofílico, absorvível e sintético, utilizado na atualidade, indicado para cirurgias cranioencefálicas e espinais com abertura da dura-máter (66,67,68). KIYOSHI e colaboradores, 2013 (23) relataram no seu estudo com PEG e SF que a regeneração da dura-máter foi mais eficaz quando o SF foi utilizado, facilitando o processo de cicatrização da ferida, o que resultou na regeneração da dura-máter mais eficaz, enquanto a formação de abscesso e granulação foi descrita com o uso de PEG.

Os SF foram utilizados pela primeira vez durante a segunda guerra mundial, compostos por trombina bovina e fibrinogênio humano, com características adesivas (69). Mas apresentavam como desvantagem o risco de transmissão de doenças pelo sangue humano. Alguns autores propuseram o uso do próprio plasma do paciente para evitar a transmissão de vírus (69,70).

Na procura de resolver a problemática da transmissão de doenças, em 1989, os pesquisadores do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da UNESP, campus de Botucatu, apresentaram uma proposta de um adesivo, composto por fibrinogênio de origem animal e uma enzima trombina-like, obtida de veneno de serpente. Assim, a não utilização de sangue humano em sua composição evitaria a transmissão de doenças (71), como AIDS e hepatites (71, 72).

No momento da aplicação é preparada uma mistura dos seus três componentes: crioprecipitado extraído de bubalinos, cloreto de cálcio e fração “trombina símile” giroxina, uma serinoprotease extraída do veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* (73) (Figura 3).



Figura 3. Serpente Cascavel, (*Crotalus durissus terrificus*).

A partir da mistura de uma enzima extraída do veneno da cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) – a trombina, com o fibrinogênio de bubalinos, o Cevap, desenvolveu está cola biológica, mais conhecida como selante de fibrina, que vem sendo testada com sucesso em animais e humanos em cirurgias e baseia no princípio natural da coagulação” (74).

O SF derivado de veneno de serpente é um Biopolímero de Fibrina (BPF) constituído por substâncias para o controle de hemorragias, substâncias como o fibrinogênio, o fator XIII, fibronectina e a trombina-like (75,76). Existem evidências que o BPF promova a cicatrização com aumento da angiogênese e crescimento fibroblástico observado no leito da ferida (77), e que está fibrina exerça ação como um suporte para os fibroblastos produzirem colágeno, aumentar a fagocitose inibindo a ação de agentes infecciosos (78).

Este novo BPF composto essencialmente por matéria-prima de origem animal, têm baixo custo de produção e a vantagem da não transmissão de doenças infecciosas veiculadas pelo sangue humano. Este biopolímero vem sendo padronizado por mais de 20 anos por um consórcio de pesquisadores brasileiros, com vários estudos pré-clínicos e ensaios clínicos (79) já concluídos durante a última

década, avaliando suas múltiplas funções, com bons resultados. Como por exemplo, observaram que, o adesivo biológico derivado de veneno de serpente mostrou-se eficiente na anastomose de cólon de rato (76).

Muitos estudos têm sido feitos, na procura de testar os possíveis usos e grau de segurança do BFP. Entre eles podemos citar, se uso para tratar úlceras venosas, mostrando se como um candidato seguro e clinicamente promissor (80). Na terapia para regeneração axonal, aumentou a regeneração nervosa (81,82). Além disso, o BPF produzido no Cevap, também pode ser útil na administração de medicamentos (83).

Gasparotto *et al*, 2014 (83) mostrou que o BPF tem excelente interação com CTMs derivadas da medula óssea de ratos, formando uma estrutura tridimensional que possibilita a adesão, diferenciação e proliferação das mesmas. Esta característica é importante, devido que, os arcabouços biológicos devem oferecer um ambiente que brinde condições semelhantes às dos tecidos originais (84), de modo que permita uma resposta natural do organismo. Fornecendo o ambiente, a estrutura e tempo necessário para a proliferação celular.

Estudos comparando os SF com o novo BPF indicam que ambos são similarmente eficientes (82), tanto (autólogos e heterólogos) naturais, não tóxicos nem imunogênicos (85). No entanto, o BPF derivado de veneno de serpente por não conter na sua constituição derivados de sangue humano se torna mais seguro.

Depois do uso em diversos modelos de experimentação animal, foi possível o patenteamento do BPF fabricado pelo CEVAP. Em seguida, o grupo de pesquisadores do Centro, aprovou junto à ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), seu uso para ensaios clínicos fase I/II no tratamento de úlceras venosas crônicas em seres humanos. Este estudo já foi finalizado, porém ainda não publicado, já demonstrou que é BPF é totalmente seguro para uso em seres humanos. Futuramente será proposto um ensaio de fase III e finalmente o seu registro junto à ANVISA, autorizando a sua comercialização. Além, o BPF produzido no CEVAP, tem sido usado como coagulante, selante, adesivo e recentemente como um suporte para células-tronco mesenquimais e reparação óssea e cartilaginosa (79,86).

1.4. Células tronco mesenquimais

As células tronco mesenquimais (CTMs), também conhecidas como células-tronco esqueléticas ou células estromais da medula óssea como recentemente sugerido pela *International Society for Cellular Therapy* (87).

Estas células, quando submetidas a diferentes estímulos, foram descritas como capazes de diferenciações como a osteogênica (88,89), Condrogênica (90), adipogênica (91), neurogênica (92) e cardiogênica (93).

CTMs são células indiferenciadas. As principais características das células-tronco, tornando-as extremamente interessantes, são: sua capacidade de auto renovação, ou seja, são capazes de se multiplicar, mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos; e, mais interessante ainda, sua habilidade de se diferenciar em mais de uma linhagem celular (94). Além disso as CTMs podem originar células funcionais nos tecidos derivados da mesma linhagem (95).

Desta forma, acredita-se que células-tronco presentes nos diferentes tecidos tenham papel regenerativo quando estes sofrem uma lesão ou injúria (96,97), modulando a resposta inflamatória, angiogênese e mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual (98). Assim, uma explicação relevante para a regeneração tecidual após aplicação de CTMs é a liberação de citocinas e fatores tróficos no local da lesão. Como a maioria das CTMs é capaz de identificar e migrar até o local lesado, é clara sua capacidade de responder a fatores quimiotáticos (liberados pelo tecido lesado).

Há ainda evidências de que estas células, por sua vez, podem ser capazes de liberar outras moléculas em resposta aos estímulos recebidos (99). Há várias hipóteses quanto às supostas funções de tais fatores na lesão, dentre elas: liberação de moléculas que previnem a morte celular, recrutamento de células-tronco mesenquimais adjacentes do próprio tecido (com subsequente diferenciação), interferência na inflamação provocada pelo dano tecidual (modulando a resposta do sistema imune), suporte de moléculas ou enzimas que suprem defeitos metabólicos (95,100). Uma vez no local da lesão, as CTMs podem secretar fatores pró-sobrevivência, tais como fator de crescimento (IGF) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF2), e fator de crescimento beta (TGF) (101).

No entanto, ainda não é claro quais fatores moleculares determinam o perfil de diferenciação das CTMs após o transplante, pois também tem sido relatado que o transplante de CTMs pode regular negativamente após lesão medular aguda em ratos (102).

As CTMs são consideradas uma linhagem de células-tronco somáticas e estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo a medula óssea, o tecido adiposo, o periósteo, o tecido muscular e os órgãos parenquimatosos (103). Elas caracterizam-se por ser uma população de células multipotentes capazes de se diferenciar e produzir qualquer tipo celular necessário num processo de reparação, como hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais, cardíacas, dentre outras (104).

Células isoladas a partir medula óssea representam uma fonte importante de células tronco (105 ,106), devido a que a partir de um pequeno volume, podem ser isoladas e manter sua funcionalidade após expansão, devido a sua elevada capacidade proliferativa (107).

No entanto, cada investigador tem utilizado diferentes métodos de isolamento e expansão para a caracterização das células, o que torna difícil a comparação dos resultados. Assim, a *International Society for Cellular Therapy* propõe critérios mínimos para definir as CTMs. Em primeiro lugar, deve ser aderente no plástico quando mantida em condições de cultura (87). Em segundo lugar, devem distinguem-se pela expressão de marcadores de superfície celular Ag específicos (87,108). Essa imunofenotipagem é realizada com a utilização de anticorpos monoclonais que reconhecem esses antígenos de superfície da membrana celular (109), as CTMs não possuem marcadores de células de linhagens hematopoéticas e endoteliais, permitindo distingui-las das precursoras hematopoéticas (110). Em terceiro lugar, devem diferenciar a osteoblastos, adipócitos e condroblastos em condições *in vitro* (87).

A grande capacidade de potencial de diferenciação das CTMs, a possibilidade de enxerto, seus efeitos imunossupressores e sua expansão em cultura levaram ao aumento do interesse clínico relativo ao uso destas células, através de infusão intravenosa ou administração dirigida ao local de interesse, em numerosas situações patológicas (111).

Tratamentos experimentais para trauma do SNC podem ser agrupados em “neuroproteção” e “neuroregeneração”. Enquanto neuroproteção refere-se à inibição

da morte de células do parênquima do SNC após trauma, a regeneração procura reparar a lesão, as CTMs tem sido usada para ambas estratégias (112). De fato, as terapias baseadas em CTMs mostraram resultados promissores no tratamento de doenças neurológicas (113).

1.5 BPF associado a CTMs

A otimização de um arcabouço específico para aplicações de células é vital para o sucesso da engenharia de tecidos (83). Os arcabouços associados a CTMs são usados para manter e evitar perda das CTMs após aplicação (114).

Biomateriais à base de fibrina exibem várias características de um arcabouço ideal, por exemplo, biocompatibilidade, biodegradabilidade e uma alta afinidade para superfícies biológicas (115). Esta biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de ligação celular dos SF, indicam que são veículos biológicos potencialmente adequados para uso em transplante de células (72,116).

O primeiro estudo avaliando o uso do BPF como um suporte celular, demonstrou os efeitos deste biomaterial na manutenção, indução, diferenciação, integridade e viabilidade das CTMs (83).

Outros estudos comprovaram a funcionalidade do BPF na terapia celular, mostrando que a associação do BPF+CTMs apresenta melhora no processo de regeneração nervosa, tem efeito neuroprotetor e pode ser considerado uma abordagem para melhorar a recuperação sensório-motora (117,118,119) Além, na terapia para regeneração óssea, mostrou uma maior formação de células ósseas no local do defeito (114).

2. OBJETIVO GERAL

Este estudo teve por objetivo avaliar pela primeira vez a segurança do Biopolímero de fibrina, e seu efeito como arcabouço de células tronco mesenquimais em lesões na dura-máter de ratos wistar (*Rattus norvegicus*), verificando sua biocompatibilidade e bioatividade, na tentativa de auxiliar a recuperação, diminuindo complicações, sem produzirem efeitos adversos.

2.1. Objetivos específicos

Analisar o impacto dos tratamentos após lesões na dura-máter no que diz respeito a:

- ❖ Sobrevida dos ratos e sua resposta clínica e neurológica, após lesão na dura máter e implantação ou não de biomateriais.
- ❖ Presença de infiltrado celular, células gigantes, células epiteloideas e interface através de histopatologia.
- ❖ Modificações no tecido cerebral, através da identificação e quantificação de proteínas expressas ante uma lesão na dura mater, tratada ou não com BPF e CTMs.

3. REFERÊNCIAS

1. Junqueira & carneiro, histologia básica - texto & atlas. 2013,(12), 150, 157-160.
2. Montanari t; histologia - texto, atlas e roteiro de aulas práticas - série graduação – 2006 (2), 155.
3. Machado abm. neuroanatomia funcional, atheneu .1993, 35.
4. Haines de. on the question of a subdural space. anat rec 1991; 230: 3–21.
5. Riew kd, khanna n. treatment of cerebrospinal fluid leaks. in: vacarro ar, betz rr, zeidman sm. principles and practice of spine surgery. st. louis: mosby; .2003, 735-43.
6. Junqueira, l.c.u.; carneiro, j. histologia básica. 2013(12) 524.
7. Gartner, l, hiatt, j. l. tratado de histologia em cores. elsevier, 2007, (3), 191.
8. Geneser, f. histologia: com bases moleculares. médica panamericana/ rio de janeiro, 2003(3), j269.
9. Tumani h, huss a, bachhuber f, the cerebrospinal fluid and barriers – anatomic and physiologic considerations, handbook of clinical neurology, 2018, 23-32.
10. Tille. bailey & scott's diagnostic microbiology. elsevier, st louis. 2013.
11. Lee sh, shin kj, koh ks, song w. visualization of the tentorial innervation of human dura mater. j anat. 2017; 231: 683–689.
12. Merkus p, taibah a, sequino g, sanna m. less than 1% cerebrospinal fluid leakage in 1,803 translabyrinthine vestibular schwannoma surgery cases. otol neurotol. 2010; 31:276–283.
13. Kawai h, nakagawa i, nishimura f, motoyama y, park y, nakamura m, nakase h, suzuki s, ikada y. effectiveness of a new gelatin sealant system for dural closure. neurological research .2014 (36), 886-872.
14. Da rosa f, pohl p, mader a, de paiva c, dos santos a, bianco b, rodrigues l. histological analysis of the repair of dural lesions with silicone mesh in rats subjected to experimental lesions, einstein. 2015, 13(4):567-73.
15. Barcelos fc, garcia meo, mendonça ab, oliveira rp. análise histopatológica das alterações medulares observadas na reparação da dura-máter com cola de fibrina em ratos wistar. coluna/columna. 2008, 7(4)309-314.
16. Wang jc, bohlman hh, riew kd. dural tears secondary to operations on the lumbar spine: management and results after a two-year-minimum follow-up of eighty-eight patients. j bone joint surg. 1998, (80)1728-1732.
17. Cammisa fp, eismont fj, green ba. dural laceration occurring with burst fractures and associated laminar fractures. j bone joint surg am. 1989, 71(7):1044-52.

18. Bosacco sj, gardner mj, guille jt. evaluation and treatment of dural tears in lumbar spine surgery: a review. *clin orthop relat res*, 2001, (389):238-47.
19. Sin ah, caldito g, smith d, rashidi m, willis b, nanda a. predictive factors for dural tear and cerebrospinal fluid leakage in patients undergoing lumbar surgery. *j neurosurg spine*. 2006, 5(3):224-7.
20. Khan mh, rihn j, steele g, davis r, donaldson wf 3rd, kang jd, et al. postoperative management protocol for incidental dural tears during degenerative lumbar spine surgery: a review of 3,183 consecutive degenerative lumbar cases. *spine*, 2006, 31(22):2609-13.
21. Bernardo l, bernardo wm, shu ebs, da roz lm, de almeida cc, de monaco ba, figueiredo eg, sanders fh, neto hs, teixeira mj. does the use of duraseal in head and spinal surgeries reduce the risk of cerebrospinal fluid leaks and complications when compared to conventional methods of dura mater closure? *rev assoc med bras*. 2012, 58(4):402-403.
22. Nagata k, kawamoto s, sashida j, abe t, mukasa a, imaizumi y: mesh-and-glue technique to prevent leakage of cerebrospinal fluid after implantation of expanded polytetrafluoroethylene dura substitute—technical note. *neurolog med chir*. 1999, 39:316–319.
23. Kiyoshi i, tetsuyoshi h, kiyomitsu o, tetsuo n, kazuhiko h. comparative study of fibrin and chemical synthetic sealant on dural regeneration and brain damage. *j neurosurg spine*. 2013, 19:736–743.
24. Levy d. migraine pain and nociceptor activation – where do we stand? *headache*. 2010; 50: 909–916.
25. Yan j, melemedjian ok, price tj, et al. sensitization of dural afferents underlies migraine-related behavior following meningeal application of interleukin-6 (il-6). *mol pain* 2012; 8: 6.
26. Moskowitz m, neurogenic versus vascular mechanisms of suma- triptan and ergot alkaloids in migraine, *tips* 13 ,1992. 307–311.
27. Olesen j, friberg l, olesen t, iversen t, lassen n, andersen a, karle a, timing and topography of cerebral blood flow, aura and headache during migraine attacks, *ann. neurol*. 1990. 791–798.
28. Strassman a, raymond s, burstein r, sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches, *nature* ,1996. 560–564.

29. Levy d, labastida-ramirez a, maassenvandenbrink a. current understanding of meningeal and cerebral vascular function underlying migraine headache, cephalalgia international headache society 2018, 0(0) 1–17.
30. Turchan a, rochman t, ibrahim a, fauziah d, i wahyuhadi j, parenrengi a, fauzi a, sufarnap e, bajamal a, ferdiansyah e, suroto h, purwati, rantam f, paramadini a, lumenta c. duraplasty using amniotic membrane versus temporal muscle fascia: a clinical comparative study. journal of clinical neuroscience .2018, (50)272–276.
31. Esposito f, grimod g, cavallo lm, lanterna l, biroli f, cappabianca p. collagen-only biomatrix as dural substitute: what happened after a 5-year observational follow-up study. clin neurol neurosurg. 2013; 115:1735–1737.
32. Xu f, wang y, sun s, amy s.w. ho lee d, kiang k, zhang x, lui w, liu b, wu w, leung g. comparison between self-assembling peptide nanofiber scaffold (sapns) and fibrin sealant in neurosurgical hemostasis. clin trans sci 2015 (89) 490–494.
33. Maurer p, mcdonald j. vicryl (polyglactin 910) mesh as a dural substitute, neurosurg. 1985, 63:448-452.
34. Boogaarts jd, grotenhuis ja, bartels rh, beems t: use of a novel absorbable hydrogel for augmentation of dural repair: results of a preliminary clinical study. neurosurgery. 2005, 146-151.
35. Pires a, bierhalz a, moraes a. biomateriais: tipos, aplicações e mercado quim. nova, 2015,7, 957-971.
36. Holzapfel, b. m.; reichert, j. c.; schantz, j.-t.; gbureck, u.; rackwitz, l.; nöth, u.; jakob, f.; rudert, m.; groll, j.; hutmacher, d. w.; how smart do biomaterials need to be? a translational science and clinical point of view. adv. drug deliv. rev. 2013, 65, 581.
37. Vunjak-novakovic, g.; kaplan, d.l. tissue engineering: the next generation. tissue eng., 2006, 12, 3261-3263.
38. Chen, k. y.; shyu, p. c.; dong, g. c.; chen, y. s.; kuo, w. w.; yao, c. h. reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite. biomaterials, 2009, 30, 1682-1688.
39. Lima s, wodewotzky t, lima-neto j, beltrão-braga p, alvarenga f. diferenciação in vitro de células-tronco mesenquimais da medula óssea de cães em precursores osteogênicos1. pesq. vet. bras. 2012, 32(5):463-469.
40. Habibovic, p; yuan, h; valk, c.m.v.d; meier, g; blitterswijk c.a.v; groot, k.d. 3d microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. biomaterials, 2005, 3565–3575.

41. Davies, j.e.; matta, r.; mendes, v.c.; perri de carvalho, p.s. development, characterization and clinical use of a biodegradable composite scaffold for bone engineering in oro-maxillo-facial surgery. *organogenesis*, 2010, 6, 161-166.
42. Fonseca, f.m. biocerâmicas porosas bifásicas e trifásicas à base de hidroxiapatita produzidas por gelcasting, dissertação (mestrado em engenharia dos materiais). instituto militar de engenharia, rio de janeiro. brasil. 2007.
43. Nair, l.s. laurencin, c.t. biodegradable polymers as biomaterials. *progr polym sci*, 2007, 32.
44. Hayek, e; newesely, h. pentacalcium monohydroxyorthophosphate, *inorg. syn.* 1963, 7, 63-65.
45. Törmälä p, pohjonen t, rokkanen p. bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications. *proc inst mech eng [h]*. 1998, 212, 101-111. pires a, bierhalz a, moraes a. biomateriais: tipos, aplicações e mercado *quim. nova*, 2015,7, 957-971.
46. Arnaldo r. santos jr. polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. *polímeros: ciência e tecnologia*. 2007, 17, 308-317.
47. Thammavaram kv, benzel ec, kesterson l. fascia lata graft as a dural substitute in neurosurgery (“enxerto de fásia lata como substituto dural em neurocirurgias”). *south med j*. 1990, 83:634-6.
48. Mygind, t.; stichler, m.; baatrup, a.; li, h.; zou, x.; flyvbjerg, a.; kasse, m. bürger, c. mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. *biomaterials*, 2007, 28:1036-1047.
49. Tabata, y. biomaterial technology for tissue engineering applications. *j r soc interface*. 2009, 6, 311-324.
50. Oliveira, l.s.a; oliveira, c.s; machado, a.l; rosa, f.p. biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. *revista de ciências médicas e biológicas*. 2010, 37-44.
51. Tamaki n, shirataki k, kojima n, shouse y, matsumoto s. tethered cord syndrome of delayed onset following repair of myelomeningocele. *j neurosurg*. 1988;69(3):393-8.
52. Cosgrove gr, delashaw jb, grotenhuis ja, tew jm, van loveren h, spetzler rf, payner t, rosseau g, shaffrey me, hopkins ln, byrne r, norbash a: safety and efficacy of a novel polyethylene glycol hydrogel sealant for watertight dural repair. *j neurosurg*. 2007, 106: 52-58.

53. Preul mc, campbell pk, garlick ds, spetzler rf: application of a new hydrogel dural sealant that reduces epidural adhesion formation: evaluation in a large animal laminectomy model. *j neurosurg spine*. 2010, 12: 381-390.
54. Weinstein js, liu kc, delashaw jb jr, burchiel kj, van loveren hr, vale fl, agazzi s, greenberg ms, smith da, tew j jr: the safety and effectiveness of a dural sealant system for use with nonautologous duraplasty materials. *j neurosurg*. 2010, 112: 428-433.
55. Pinedo, u.g. utilización de prótesis de quitosana y silicona en la regeneración del nervio ciático axotomizado de ratas. *archivos de neurociencias mexicanas*. 2001, 6, 4, 184-193.
56. Barth, w.l. células tronco e bioética: o progresso biomédico e os desafios éticos. porto alegre: edipucrs, 2006.
57. Hida k, yamaguchi s, seki t, yano s, akino m, terasaka s, nonsuture dural repair using polyglycolic acid mesh and fibrin glue: clinical application to spinal surgery. *surg neurol*. 2006, 65:136–143.
58. Shaffrey ci, spotnitz wd, shaffrey me, jane ja: neurosurgical applications of fibrin glue: augmentation of dural closure in 134 patients. *neurosurgery*. 1990, 26:207–210.
59. Ghulam muhammad ak, yoshimine t, maruno m, takemoto o, hayakawa t: topical application of fibrin adhesive in the rat brain: effects on different cellular elements of the wound. *neuro res*. 1997, 19:84–88.
60. Mankad p.s., codisponi m. the role of fibrin sealants in hemostasis. *american journal of sugery*. 2001, 182, 21-18.
61. Brennan, m. fibrin glue. *blood rev*. 1991, 5, 240-244.
62. Gosk j., knakiewicz m., wiacek r., reichert p., the use of the fibrin glue in the periplivalneves reconstructions. *polim med*. 2006, 36, 11-15.
63. Farrag t. y., lehar m, verhaegen p., carson k.a., byrne p.j., effect of platelet rich plasma of fibrin sealant of facial nerve regeneration in a rat model. *laryngoscope*. 2007, 117, 65-157.
64. Tisseel: package insert and label information. italian version, 2013.
65. Furlam m, structure of fibronogen and fibrin. in francis, jl, fibrinogen fibrin stabilization and fibrinolysis. london: vchpublishers. 1988, 17-64.
66. Preul mc, campbell pk, bichard wd, spetzler rf: application of a hydrogel sealant improves watertight closures of duraplasty onlay grafts in a canine craniotomy model. *j neurosurg*. 2007, 107: 642-650.

67. Bjugstad kb, lampe k, kern ds, mahoney m: biocompatibility of poly (ethylene glycol)-based hydrogels in the brain: an analysis of the glial response across space and time. *j biomed mater res a* . 2010, 95: 79-91.
68. Bakar b, kose ea, balci m, ou pa, karat bs, alhan a, kilinc k, kil isk. evaluation of the neurotoxicity of the polyethylene glycol hydrogel dural sealant. *turkish neurosurgery*. 2013, 23, (1), 16-24.
69. Durham lh., willatt dj., yung mw., jones i., stevenson pa. a method for preparation of fibrin glue.*j. laryngol. otol.*,1987, 101, 1182-6.
70. Silberstein le., williams jj., hughlett ma., magee da., weisman ra. an autologous fibrinogen: based adhesive for use in othologic surgery. *transfusion*. 1988, 28, 319-21.
71. Thomazini-santos ia, barraviera srca, mendes-giannini mjs, barravieira b. surgical adhesives. *j venom anim toxins*. 2007, 7: 159-71.
72. Barros lc, ferreira rs, barraviera srca, stolf ho, thomazini-santos ia, giannini m. a new fibrin sealant from *crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine. *j toxicol environ health b critvrev*. 2009; 12:553–71.
73. Viterbo, f.,thomazini, i.a., and giannini, m.j.s.m. reparação de nervo periférico com cola de fibrina derivada de veneno de cobra. *acta cir bras* 1993, 8.
74. Giraldi, a. toxina como adesivo. *revista de pesquisa medica*, 2014.
75. Ellis d.a., pelau sa e.d. fibrin glue in facial plastic and reconstructive surgery. *j. otholaryngol*. 1988, 17, 74-7.
76. Leite c.v.s; naresse l.e; arantes h.j; lopes a.f; thomazini-santos i.a; giannini m.j.s; mercadante m.c; barraviera b; kobayasi s. an evaluation by rat colon anastomosis of the efficacy of fibrin glue derived from snake venom. *journal of venomous animals and toxins*. 2000, 6.
77. Gosain, a. k; lyon v. b; the current status of tissue glues: part ii. for adhesion of soft tissues.*plastic and reconstructive surgery*. 2002, 110, 84-1581.
78. Saltz r., sierra d., feldman d., saltz m.b., dimick a.d., vasconez l.o., experimental and clinical applications of fibrin glue.*plastic an reconstructive surgery*. 1991, 88, 55-1005.
79. Ferreira jr, r, de barros l, abbade l, barraviera s, silvares m, de pontes l, dos santos l, barraviera b. heterologous fibrin sealant derived from snake venom: from bench to bedside – na overview. *journal of venomous animals and toxins including tropical diseases* .2017, 23:21.

80. Abbade lpf, barraviera srcs, silvares mrc, carneiro mtr, medolago nb, ferreira jr rs, carneiro m, bronzatto n, barraviera b. a new fibrin sealant derived from snake venom candidate to treat chronic venous ulcers. *j am acad dermatol*. 2015;72(5).
81. Buchaim r, andreo j, barraviera b, ferreira j, r, buchaim d, junior g, de oliveira a, rodrigues a. effect of low-level laser therapy (lllt) on peripheral nerve regeneration using fibrin glue derived from snake venom. *injury, int. j. care injured* .2015, 655–660.
82. De castro m, barbizan r, ferreira jr. r, barraviera b, de oliveira a. direct spinal ventral root repair following avulsion: effectiveness of a new heterologous fibrin sealant on motoneuron survival and regeneration. *article* 2016, 16.
83. Gasparotto v, landim-alvarenga fc, oliveira alr, simões gf, lima-neto jf, barraviera b, ferreira junior, rs. a new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. *stem cell res ther*. 2014,5(3):78.
84. Liu x, smith la, hu j, ma px. biomimetic nanofibrous gelatin/apatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *biomaterials*. 2009 (12):2252-8.
85. Ferreira j, r.. autologous or heterologous fibrin sealant scaffold: which is the better choice?. *journal of venomous animals and toxins including tropical diseases* 2014, 20:31.
86. De barros c, yamada a, ferreira r, barraviera b, hussni c, de souza j, watanabe m, rodrigues c, alves a. a new heterologous fibrin sealant as a scaffold to cartilage repair—experimental study and preliminary results. *experimental biology and medicine* 2016; 241: 1410–1415.
87. Dominici m, blanc, mueller i, slaper-cortenbach i, marini f, ds krause, deans r, keating a, prockop d, horwitz e. minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. *cytotherapy*. 2006, (8), 315 317
88. Kulterer b, friedl g, jandrositz a, sanchez-cabo f, prokesch a, paar c. gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *bmc genomics*. 2007, 8:70.
89. Park ks, lee ys, kang ks. in vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *j vet sci*. 2006, (4):343-8.
90. Hashimoto j, kariya y, miyazaki k. regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332). *stem cells*. 2006, 24. 54-2346.

91. De gemmis p, lapucci c, bertelli m, tognetto a, fanin e, vettor r. a real-time pcr approach to evaluate adipogenic potential of amniotic fluid-derived human mesenchymal stem cells. *stem cells dev.* 2006, 15(5):719-28.
92. Anisimov sv, christophersen ns, correia as, li jy, brundin p. "neurostem chip": a novel highly specialized tool to study neural differentiation pathways in human stem cells. *bmc genomics.* 2007, 8:46.
93. Amado lc, saliaris ap, schuleri kh, st john m, xie js, cattaneo s. cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *procnatl acadsci usa.* 2005, 102(32):11474-9.
94. Lemischka ir. stem cell biology: a view toward the future. *ann n y acad sci.* 2005, 1044:132-8.
95. Kelly s, bliss tm, shah ak. transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *proc nat acadsci,* 2004, 101: 11839-44.
96. Blau hm, brazelton tr, weimann jm. the evolving concept of a stem cell: entity or function? *cell.* 2001, (7):829-41.
97. Fodor wl. tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *reprodbiolendocrinol.* 2003, 1:102.
98. Caplan, a.i. new era of cell-based orthopedic therapies. *tissue engin.:* part b, 2009, (15),195-200.
99. Boulanger lm, shatz cj: immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease. *nat neurosci,* 2004, 5:521-31.
100. Muñoz-elias g, marcus aj, coyne tm, woodbury d, black ib: adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *j neurosci,* 2004, 24: 4585-95.
101. Sadat, s., gehmert, s., song, y.h., yen, y., bai, x., gaiser, s., klein, h., alt, e. the cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by igf-i and vegf. *biochem. biophys. res. commun.* 2007, 363(3), 674-679.
102. Dasari, v.r., spomar, d.g., li, l., gujrati, m., rao, j.s., dinh, d.h. umbilical cord blood stem cell mediated downregulation of fas improves functional recovery of rats after spinal cord injury. *neurochem. res.,* 2008, 33(1), 134-149.
103. Zucconi e., vieira n.m, bueno d.f, secco m, jazedje t, ambrosio c.e, bueno m.p, miglino m, zatz m. mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein –

a novel source for cell therapy studies. *stem cells and development*, 2009, 19, 395-402.

104. Pittenger, m.f. alastair m. m., stephen c. b., rama k . j, robin d, joseph d. m, mark a. m., donald w. s., stewart c., daniel r. m. multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*. 1999, 284, 143-147.

105. Minguell, j.j. et al. biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *brazilian journal of medical and biological research*, 2000, (33), 881-887.

106. Wang x, wang y, gou w, lu q, peng j, lu s. role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *int orthop*. 2013; 37(12):2491-8.

107. Tatullo m, marrelli m, paduano f. the regenerative medicine in oral and maxillofacial surgery: the most important innovations in the clinical application of mesenchymal stem cells. *int j med sci*. 2015; 12(1): 72–77.

108. Maumus m, guérit d, toupet k, jorgensen c, noël d: mesenchymal stem cell-based therapies in regenerative medicine: applications in rheumatology. *stem cell res ther* 2011, 2:14.

109. Lojudice, f.h. identificação de genes diferencialmente expressos durante diferenciação de células-tronco progenitoras mesenquimais. tese (doutorado em ciências biológicas, bioquímica) - universidade de são paulo, sp. 2008. 173f.

110. Kolf, c.m. et al. mesenchymal stromal cells. *biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. *arthritis research & therapy*, 2007, (9), 204-213.

111. Sensebé I. generation and characterization of mesenchymal stromal cells for clinical application. *isbt science series*. 2009, 4:31-6.

112. Dasari, v.r., spomar, d.g., gondi, c.s., sloffer, c.a., saving, k.l., gujrati, m., rao, j.s., dinh, d.h. axonal remyelination by cord blood stem cells after spinal cord injury. *j. neurotrauma*, 2007, 24(2), 391-410.

113. Cizkova, d., kakinoana, o., kucharova, k., marsala, s., johe, k., hazel, t., hefferan, m.p., marsala, m. functional recovery in rats with ischemic paraplegia after spinal grafting of human spinal stem cells. *neuroscience*. 2007, 147, 560–564.

114. Orsi p, landim-alvarenga f, justulin jr l, kaneno r, golim m, dos santos d, creste c, oba e, maia l, barraviera b, ferreira jr r. a unique heterologous fibrin sealant (hfs) as a candidate biological scaffold for mesenchymal stem cells in osteoporotic rats. *stem cell research & therapy* .2017, 8:205.

115. Hokugo a, takamoto t, tabata y. preparation of hybrid scaffold from fibrina and biodegradable polymer fiber. *biomaterials*. 2006;27:61–7.
116. Thomazini-santos ia, barraviera sracs, mendes-giannini mjs, barraviera b. surgical adhesives. *j venom anim toxins*. 2001;7:159–71.
117. Cartarozzia l, spejoa a, ferreira jr.r, barraviera b, duek e, carvalho j, góes a, oliveira a. mesenchymal stem cells engrafted in a fibrin scaffold stimulate schwann cell reactivity and axonal regeneration following sciatic nerve tubulization. *brain research bulletin* .2015, 14–24.
118. Benitez s, barbizan r, spejo a, ferreira jr.r, barraviera, góes a, de oliveira a. synaptic plasticity and sensory-motor improvement following fibrin sealant dorsal root reimplantation and mononuclear cell therapy. *frontiers in neuroanatomy*. 2014, (8), 2.
119. Barbizan r, castro m, barraviera b, ferreira jr.r, de oliveira a. influence of delivery method on neuroprotection by bone marrow mononuclear cell therapy following ventral root reimplantation with fibrin sealant. *plos one*. 2014, (9), 8.



CAPITULO II

1. INTRODUÇÃO

O vazamento do líquido cefalorraquidiano é uma complicação comum após uma laceração na dura-máter, permitindo que o líquido seja liberado. Uma vez que o vazamento persistente coloca os pacientes em risco significativo de complicações. Entretanto, o fechamento primário da dura-máter pode ser difícil, especialmente se a dura-máter está fragilizada ou ossificada (1).

Lesões diretas ou indiretas na dura-máter são condições que afetam diretamente a qualidade de recuperação dos pacientes. A magnitude destes desafios tem levado pesquisadores a buscarem diferentes materiais que possam substituir ou até regenerar essa membrana, com o objetivo de desenvolver um material adequado para o tecido lesionado sem produzir efeitos adversos, já que em muitos casos é necessário recorrer a uma cirurgia reconstrutiva quando suas bordas não podem ser unidas corretamente.

Embora existam uma variedade de produtos disponíveis, nenhum tem se mostrado totalmente satisfatório e o uso de biomateriais tem surgido como uma excelente alternativa. Os objetivos de uma correta duroplastia com o uso de um biomaterial são conseguir um fechamento hermético; reduzir o risco de infecção; evitar o extravasamento de líquido cefalorraquidiano LCR e fornecer se é possível as células necessárias para tal processo, ou seja uma estrutura adequada para a correta regeneração da dura-máter.

Há grandes dificuldades em se comparar os diferentes tipos de tratamentos para lesão na dura-máter (2) e o melhor método de reparação e os materiais existentes para seu tratamento ainda não são consenso. (3).

Selantes de Fibrina (SF) tem sido utilizado amplamente em neurocirurgia para vedar a linha de sutura, fornece fechamento impermeável e evitar vazamentos de líquido cefalorraquidiano, porém sem evidências clínicas adequadas (4).

Em 1989, os pesquisadores do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da UNESP, campus de Botucatu, apresentaram uma nova proposta de SF, composto por fibrinogênio de origem animal e uma enzima trombina-like, obtida de veneno de serpente cascavel *Crotalus durissus terrificus*, denominado Biopolímero de Fibrina BPF. Este novo tipo de SF, agora denominado BPF vem sendo avaliado com vários estudos pré-clínicos e ensaios clínicos já concluídos (5, 6). Como

por exemplo na terapia para regeneração axonal e aumentou na regeneração nervosa (7, 8). Além, Gasparotto *et al*, 2014 (9) mostrou que o BPF tem excelente interação com as células tronco mesenquimais CTMs, esta característica é importante, para permitir uma resposta natural do organismo.

Nos últimos anos a medicina regenerativa associou as células-tronco aos biomateriais com o intuito de fornecer não apenas a matriz para a regeneração, mas também os fatores de crescimento e as células envolvidas neste processo (10,11).

Com tal intuito, nosso estudo tem procurado desenvolver ou aperfeiçoar materiais biocompatíveis, os quais favoreçam o reparo dural sem efeitos adversos. O principal objetivo da nossa pesquisa foi a avaliação de um biomaterial denominado de Biopolímero de Fibrina (BPF), associado ou não a Células Tronco Mesenquimais (CTMs) para o tratamento de lesões na dura mater em ratos, na tentativa de auxiliar a recuperação, diminuindo complicações, sem produzirem efeitos adversos, visando seu uso na medicina humana quanto na veterinária.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aspectos éticos e origem do material em estudo

O projeto foi encaminhado para Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA /UNESP- Botucatu) e aprovado sob o protocolo número 1136-2015.

Nesse estudo, foi utilizado o Biopolímero de fibrina derivado de peçonha de serpente (BPF) gentilmente fornecido pelo Centro de Estudos de Venenos de Animais Peçonhentos (CEVAP) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Fazenda Lageado, Campus Botucatu e células tronco mesenquimais (CTMs) de ratos *Wistar*.

2.2. Desenho Experimental

Para este estudo foram utilizados 80 ratos *wistar* (*Rattus norvegicus*) adultos, machos, hígidos, pesando entre 450 e 550 g. Eles foram mantidos no Biotério do CEVAP, distribuídos em 3 animais por caixa plástica em local fechado com luz artificial em fotoperíodo de 12 horas a 23°C, recebendo água e comida *ad libitum*.

No momento anterior a cirurgia, todos os ratos foram avaliados quanto às condições gerais, utilizando se como critério de inclusão só animais saudáveis.

Os animais foram divididos em 4 grupos com 20 animais cada grupo (Figura 4).

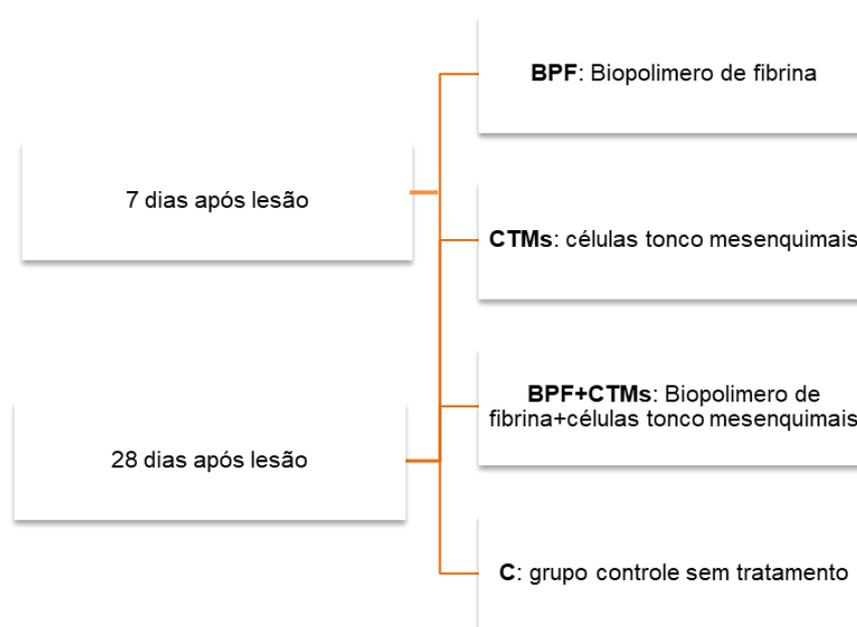


Figura 4. Desenho experimental indicando os grupos e tempo de coleta de material para análises histológico e proteômico.

2.3. Isolamento e cultura das células a partir de ratos

Foram utilizados 2 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) como doadores de medula óssea com 21 dias de idade.

2.3.1. Coleta da medula óssea de rato

Os animais foram eutanasiados com sobre dose de xilazina 30mg/kg e ketamina 270mg/kg via intraperitoneal. Após a remoção dos fêmures e das tíbias, foi cortada sob fluxo laminar em capela uma das epífises de cada osso coletado. Os ossos foram colocados com a epífise cortada para baixo, dentro de uma ponteira de 1 ml cuja ponta também foi cortada. Essa ponteira contendo o osso foi posicionada dentro de um tubo falcon de 15 ml, que foi então centrifugado a 1.700 rpm por 5 minutos, promovendo a precipitação da medula óssea. O precipitado contendo a fração celular foi então ressuspensado em 1ml de meio de cultura DMEM alta glicose (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com soro fetal bovino 10% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda), penicilina 0,1% e streptomicina 0,1%.

2.3.2. Isolamento da fração de células mesenquimais

As células obtidas da medula óssea foram semeadas em frasco para cultura celular de 25cm², com 5mL de meio DMEM alta glicose preparado com 10% SFB, 1% penicilina/estreptomicina e 1% anfotericina e cultivadas em uma estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, onde permaneceram até a confluência celular e posteriores passagens.

O meio foi trocado a cada 2 dias e as passagens foram feitas quando o frasco para cultura celular atingiram 80 a 85% de confluência, utilizando-se tripsina durante quatro minutos a 37°C para individualização das células e desprendimento da parede do frasco de cultivo. As células foram centrifugadas a 1.700 RPM por 10 minutos e ressuspensas em meio de cultura.

As células foram então cultivadas até a quinta passagem. Nos grupos **CTMs** e grupo **BPF+CTMs** foram posicionadas as células diretamente na região lesionada com o auxílio de uma micropipeta contendo 40µl de meio de cultivo com aproximadamente 100.000 de células.

2.3.3 Caracterizações celular por citometria de fluxo

As células foram ressuspensas em uma concentração celular de 1×10^6 cel/mL, e desta suspensão uma amostra de 1×10^5 células para cada teste realizado e utilizando-se os seguintes marcadores.

Positivos: ICAM1/FITC, CD90/FITC.

Negativos: CD34/PE, CD45/FITC, CD11b/PE.

Para controle secundário (Alexa Fluor® 488) usado com CD73.

Os anticorpos foram adicionados em diluição de 1:10 e aguardaram 30min em temperatura ambiente. Imediatamente os tubos foram lidos no Citometro de Fluxo FACS Calibur BD® - Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu – SP.

Os marcadores negativos selecionados são específicos de outro tipo de células. CD34 marca progenitores hematopoiéticos primitivos e células endoteliais, CD45 é um marcador pan-leucócito e CD11b são as mais prováveis células hematopoiéticas a serem encontradas em uma cultura, tem expressão em monócitos e macrófagos (12).

2.3.4 Caracterizações por diferenciações celulares

A capacidade das CTMs de se diferenciar em linhagens osteogênicas e adipogênicas foi testado.

Para diferenciação adipogênica foi utilizado o Kit de diferenciação de StemPro para adipogênese. Quando a cultura de células atingiu 70% de confluência, o meio de cultura foi substituído por uma diferenciação específica de meio que continha 90% de Adipócitos StemPro Meio de diferenciação (Invitrogen Life Science Technologies), 10% Suplemento de Adipogênese StemPro (Invitrogen Life Science Technologies), 100 UI / ml de penicilina, 100 µg / ml de estreptomicina e 3 µg / ml de anfotericina B (Invitrogen Life Science Technologies). O meio de diferenciação foi substituído a cada 3 dias durante um período de 7 dias.

Para diferença osteogênica o Kit StemPro Kit de diferenciação para Osteogênese foi usado. (Todos Invitrogen Life Science Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Quando a cultura de células atingiu 70% de confluência, o meio de cultura foi substituído por um meio específico que continha 90% de StemPro Osteocyte /meio de diferenciação de condrócitos, 10% StemPro Suplemento de condrogênese, 100 UI / ml de penicilina, 100 µg / ml de estreptomicina e 3 µg / ml de anfotericina B. O meio de diferenciação foi substituído a cada 3 dias durante um período de total de 10 dias.

Os kits foram utilizados de acordo às instruções do fabricante, seguindo o modelo proposto por Gasparotto *et al*, 2014 (9).

2.4. Procedimento cirúrgico

Os ratos foram anestesiados usando a associação na mesma seringa, de cloridrato de ketamina 5% na dose de 90mg/kg e cloridrato de xilazina 2% na dose de 5mg/kg, injetada por via intraperitoneal. O nível de anestesia foi determinado observando os reflexos palpebrais e respiratórios, tônus musculares e ausência de reação à dor profunda infligida por compressão interdigital das patas. Os animais foram considerados anestesiados quando sua respiração foi regular e superficial e tônus muscular flácido com ausência de reflexos e dor. A região do campo operatório foi lavada e a tricotomia da porção dorsal do crânio foi feita. O preparo do campo operatório foi feito com povidine tópico, sendo delimitado com gazas estéril.

Todo o instrumental utilizado nas cirurgias foi previamente auto clavado, os animais foram colocados em decúbito ventral, permitindo a exposição óssea por meio de incisão de pele na linha média, desde a região anterior do osso parietal até a parte média do osso frontal. O tecido subcutâneo e os músculos frontais, occipital e temporal foram incisados e rebatidos lateralmente, assim como o perióstio, para permitir exposição do osso. Após exposição foi realizada uma craniectomia de aproximadamente 5 milímetros quadrados na região caudal do hemisfério direito, com o auxílio de uma broca troncocônica (Figura 5) acoplada a um micromotor odontológico Beltec LB100. A dura-máter foi exposta, sendo, então, realizada uma durotomia, delicadamente com lâmina de bisturi 15, com ângulo de 45° até o levantamento da mesma, sem danificar o tecido neural subjacente (Figura 6), durante todo o procedimento manteve-se o campo cirúrgico irrigado com solução salina para preservar a integridade dos tecidos e evitar aumento da temperatura ocasionada pelo uso do micromotor.



Figura 5. Ilustração de uma broca troncocônica

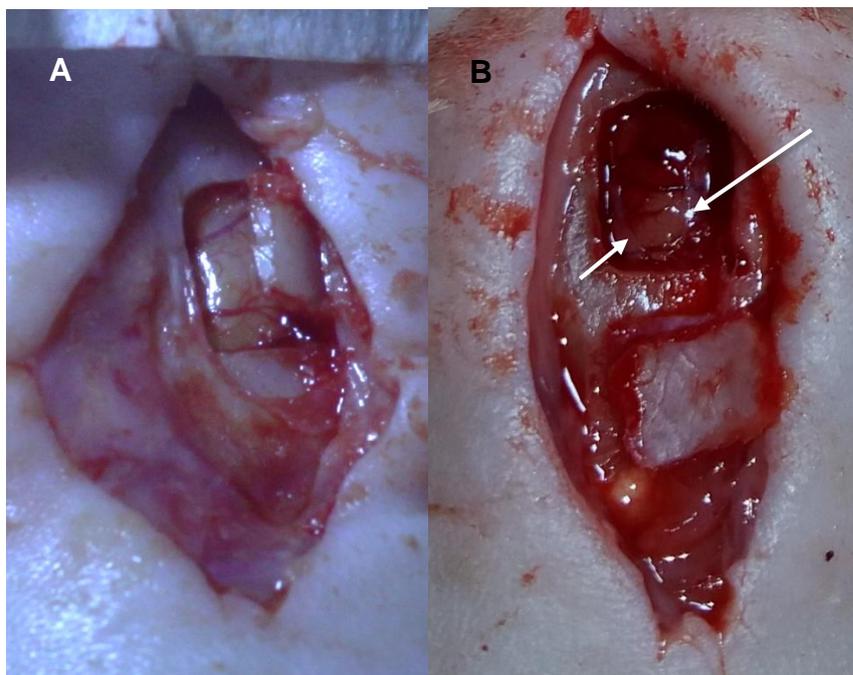


Figura 6. Técnica cirúrgica (A) aparência macroscópica do córtex cerebral com meninges intactas. (B) aparência macroscópica do córtex cerebral com lesão na dura mater (Seta branca) lesão na dura mater.

Com o auxílio de uma micropipeta, após lesão na dura máter, os animais receberam os tratamentos já estabelecidos para os grupos **BPF**, **BPF+CTMs** e **CTMs**, exceto aqueles animais do grupo **C** que não receberam nem um tipo de tratamento. Não foi feita aproximação das bordas da lesão para nem um grupo, com o fim de permitir o maior contato possível dos bioprodutos com o tecido cerebral. No grupo **C** a lesão na dura mater ficou aberta, sem nem um tipo de tratamento, para não induzir alguma variável como por exemplo, o uso de fio de sutura. O osso cortical rebatido foi reposicionado novamente no lugar do defeito ósseo antes de ser feita a síntese dos músculos e fáscias com fio cirúrgico sintético, nylon preto, mono-filamento número 5-0, para logo ser realizada a síntese da pele com fio de nylon preto monofilamento 3-0, ambas com pontos separados simples.

No momento da aplicação, logo após lesão na dura máter, o selante de fibrina foi preparado é misturando-se seus três componentes, já no local da aplicação (superfície cerebral): crioprecipitado extraído de bubalinos (10µl), cloreto de cálcio

(15µl) e fração “trombina símile” extraída de veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* (25µl). O selante polimerizou em alguns segundos após a aplicação.

Nos grupos **BPF+CTMs** e **CTMs**, foram aplicadas 40µl de meio de cultivo contendo aproximadamente 100.000 células tronco mesenquimais.

Após cirurgia, como metodo profilático, foi aplicada na ferida operatória Vetaglós® (gentamicina, sulfanilamida, sulfadiazina, ureia, palmitato de vitamina A) como pomada anti-infecciosa, epitelizante e cicatrizante. Os animais foram mantidos em caixa plástica individuais e receberam analgesia com cloridrato de tramadol via oral na dose de 30mg/kg, por 2 dias.

2. 5. Imageamento de fluorescência *in vivo* da associação BPF e CTMs

As células previamente cultivadas foram incubadas com nano marcadores cristais Qtracker 800 cell Labeling Kit (Q25071MP – Lifetechnologies), acrescentou-se 1 µL da solução A a 1 µL da solução B para cada 1 milhão de células a serem marcadas, após 5 min. Em temperatura ambiente foi acrescido 200 µL de meio DMEM e então colocado 30 segundos no vórtex. Acrescentou-se essa solução ao pellet celular, e foi levado para estufa a 37°C *overnight*.

A tecnica cirurgia para realizar a lesão na dura mater e implantar o BPF e as células marcadas matevesse igual como anteriormente mencionado no item 2.4. O BPF e as células marcadas foram colocados no lugar da lesão da dura-máter, sendo 5 µL de células marcadas e 12 µL de BPF.

Para o imageamento os animais foram posicionados em decúbito ventral no equipamento para imageamento *in vivo* (modelo MS FX PRO – Bruker) ainda sob o efeito da anestesia operatória. Realizou-se raio x e imageamento da florescência das células marcadas e posteriormente realizou-se a superposição das imagens.

O imageamento foi realizado 6 horas após realização da lesão na dura mater e implantação das células marcadas e o BPF, para avaliar o arcabouço biológico (scaffold) da associação BPF- CTMs.

A analise foi feita no Laboratório de Regeneração Nervosa, Instituto de Biociências da UNICAMP, Campinas - SP.

2.6. Delineamento dos tratamentos

Foi realizada avaliação das condições gerais dos ratos, clínica e neurológica, observadas qualquer tipo de anomalias macroscópicas na região da lesão,

comportamento frente à luz do biotério, e os seguintes parâmetros foram monitorados: sensibilidade dolorosa, deiscência, infecção da ferida, consumo de alimento e água e habilidades motoras.

Estabeleceram-se como critério de exclusão: óbito imediato após lesão.

As feridas cirúrgicas foram acompanhadas e avaliadas até os 7 primeiros dias após a cirurgia quanto à presença de secreção purulenta e deiscência. A deiscência da sutura foi avaliada em presente ou ausente assim como a infecção da ferida cirúrgica, pela presença ou não de secreção purulenta no sítio cirúrgico ou abscedação.

Os animais foram avaliados clinicamente quanto, sensibilidade dolorosa e habilidades motoras. A sensibilidade dolorosa foi avaliada mediante a reação do animal ao toque da ferida cirúrgica, atribuindo-se os escores: 0 - quando não existiu qualquer manifestação exacerbada do animal, 1 - retração do corpo associada à forte vocalização. Para avaliar as habilidades motoras, cada animal foi retirado da caixa plástica suspenso pela cauda para logo ser colocado na mesa do biotério por 1 minuto, avaliando o padrão de marcha fora da gaiola, observando-se quaisquer paralisias ou paresias; sendo atribuído os escores: 0 – sem sinal de dificuldade motora, 1 – fraqueza ou tremor durante a suspensão pela cauda ou marcha, 2 – arrastar membros, 3 – animal incapaz de endireitar ou caminhar, seguindo o modelo proposto por Kawai *et al*, 2014 (13) e Da rosa *et al*, 2015 (14).

Durante todo o período do estudo, foi observado o comportamento dos animais e consumo de alimento e água. O consumo de alimento e água foi analisado mediante o acompanhamento da manutenção do biotério 3 vezes por semana, atribuindo-se a diminuição ou não das quantidades.

2.7 Eutanásias dos animais e coleta de tecidos

Para coleta de amostras no análise histológico foram utilizados 8 animais (4 animais 7 dias, 4 animais 28 dias) por cada grupo. Os animais foram anestesiados, sob anestesia profunda por injeção intraperitoneal de ketamina 5% na dose de 180mg/kg e cloridrato de xilazina 2% na dose de 15mg/kg.

Com o fim de facilitar a fixação do tecido cerebral e corte das laminas histológicas, foi realizada perfusão intracardíaca. Para a perfusão intracardíaca uma incisão no átrio direito foi realizada (com tesoura de ponta fina) e uma cânula conectada à um equipo multivia com clamp 2 vias foi inserida no ventrículo esquerdo.

Uma vez que a perfusão foi iniciada com uma solução de cloreto de sódio a 0,9%, facilitou a evacuação de fluidos de perfusão pelo corte no átrio direito (Figura 7).

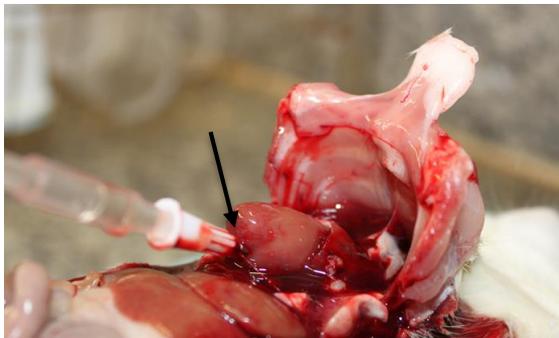


Figura 7. Técnica de perfusão. (Seta preta) cânula inserida no ventrículo esquerdo do coração.

Primeiro foi realizada a perfusão com a solução de cloreto de sódio a 0,9% até ser observada ausência de sangue pelos fluidos de evacuação no átrio direito. Em seguida, a solução de fixação (formol 10%) foi perfundida até a visualização da rigidez no corpo do animal. A extração do tecido cerebral foi por meio de craniectomia total da região dorsal com o auxílio de uma broca troncocônica acoplada a um micromotor odontológico Beltec LB100 e tesoura de ponta curva (Figura 8). Em seguida, o fragmento do tecido onde tinha sido feita a lesão na dura máter (região dorso caudal do hemisfério direito) foram armazenados em formol 10% até posteriores análises.



Figura 8. Craniectomia total da região dorsal.

Para a coleta de amostras para análise proteômica, foram utilizados 12 animais (6 animais 7 dias, 6 animais 28 dias) por cada grupo. Os animais foram anestesiados com sobre dose de xilazina 30mg/kg e ketamina 270mg/kg via intraperitoneal, para decapitação e extração do tecido cerebral (Figura 9) por meio de uma craniectomia total da região dorsal com o auxílio de uma broca troncocônica acoplada a um micromotor odontológico Beltec LB100 e tesoura de ponta curva.

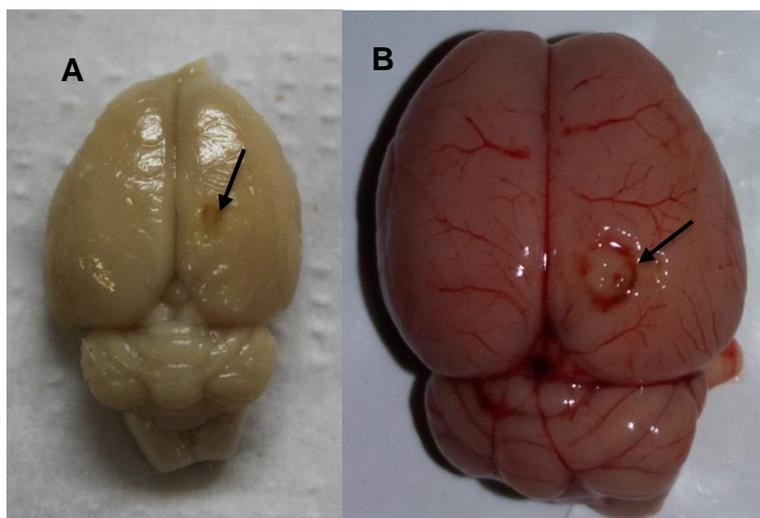


Figura 9. Cérebro de rato submetido a lesão na dura mater. (A) tecido cerebral extraído com ajuda da técnica de perfusão intracardiaca, (Seta preta) Borda da lesão. (B) Cérebro de rato sem perfusão intracardiaca, (Seta preta) Borda da lesão, grupo **BPF**.

Nas amostras destinadas a análise proteômica, o tecido foi extraído o mais rápido possível e imerso em nitrogênio líquido, para evitar qualquer tipo de degradação no tecido após a morte do animal. Em seguida, o fragmento do tecido onde tinha sido feita a lesão na dura mater (região dorso caudal do hemisfério direito) foram armazenados em ultra freezer (-80°C) até posteriores análises.

2.8. Histologia

O fragmento da lesão, foi fixado em formol 10% durante 24 horas, logo após lavado repetidas vezes com água durante 24 horas e processado em soluções crescentes de álcool, diafanizados em xilol e incluído em parafina. Cortes transversais de 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo de rotação e corados em H & E. As lâminas foram fotografadas no aumento de 4x, 10x, 20x e 40x, por microscópio

Leica DM500® acoplado a uma câmera Leica DMC2900®; Software Leica LAS v4.5®; análise histológica foi realizada com base em imagens obtidas, onde avaliou se e graduou em ausente ou presente, quanto à a infiltrado celular, presença de células gigantes, presença de células epiteloideas e interface.

2.9 Analise Proteômica

2.9.1 Extrações de proteínas das amostras de tecido cerebral

A extração de proteínas foi realizada para identificar e quantificar o nível de proteínas expressas ante uma lesão na dura mater tratada ou não com BPF e CTMs, analisando o impacto dos tratamentos após lesão.

Antes da extração proteica, os segmentos cerebrais foram macerados em nitrogênio líquido, formando subdivisão dos grupos (Pool), com 6 animais em cada Pool dependente da data de eutanásia (7 e 28 dias após cirurgia), sendo um total de 12 animais por grupo. Foi utilizada a metade do material cerebral de cada animal, com um peso aproximado de 130mg de tecido cerebral por Pool. O pó cerebral foi homogeneizado com 1ml da solução tampão, inibidor de protease foi adicionado durante a preparação da amostra para evitar degradação.

Após homogeneização de cada Pool, foram levados 2 minutos ao vórtex e centrifugados por 30 minutos (10500rpm, 10110rcf a 4 °C) utilizando uma ultra centrífuga Heal force. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C para posteriores análises.

2.9.2 Quantificações de proteínas pelo método de Bradford

As proteínas presentes nas amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (15), utilizando o kit BioRad® Protein Assay (cod. 500-0001), tendo albumina bovina (BSA), como proteína padrão.

Em triplicatas de amostras de segmentos cerebrais previamente armazenados, foi realizada a leitura de absorvância, com auxílio de um espectrofotômetro (biopectro) ajustado ao comprimento de onda 595nm.

Os valores de absorvância calculados foram utilizados para determinar a concentração de proteínas presentes em ug/ul de amostra.

2.9.3 Eletroforeses unidimensional

O gel unidimensional foi realizado para avaliar a integridade e presença de proteínas.

Amostras aleatórias de 2 subgrupos foram liofilizadas durante uma hora e seus pellets de proteína foram armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os pellets foram redissolvidos em $10\mu\text{L}$ de tampão de amostra, colocadas no vórtex, centrifugadas e aquecidas a 70° durante 5 min.

O perfil proteico do extrato do tecido cerebral foi obtido por meio de uma eletroforese unidimensional em condições redutoras e desnaturantes, utilizando-se poliacrilamida ao 12,5% (m/v), segundo Laemmli, 1970 (16).

2.9.4 Digestão Enzimática das proteínas em solução

Primeiramente, $50\mu\text{g}$ de proteínas totais liofilizadas foram diluídas em $60\mu\text{L}$ de bicarbonato de amônio 50 mM e em seguida, $25\mu\text{L}$ do surfactant Padrao RapiGest SF (código 186001861, Waters) foram adicionados às amostras, as quais foram incubadas à 37°C por 60 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas às etapas de redução e alquilação, utilizando DTT 10 mM e iodoacetamida 45 mM, respectivamente. A digestão enzimática em solução foi realizada por meio da enzima tripsina na concentração 1:100 (enzima: amostra) solubilizada em tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7.8. A hidrólise ocorreu durante 18 horas e foi interrompida com a adição de $10\mu\text{L}$ de ácido fórmico 5% (v/v). As amostras foram encubadas por 90 minutos à temperatura ambiente e posteriormente, centrifugadas à 14.000xg à 6°C por 30 minutos. O sobrenadante foi removido para um tubo novo. Os digestos trípticos contidos em cada amostra foram submetidos às colunas de dessalinização Peptide Cleanup C18 Spin (código 5188-2750 Agilent Technologies) segundo as recomendações do fabricante.

2.9.5 Sequenciamentos peptídico por espectrometria de massas

As análises label free de espectrometria de massas foram realizadas por meio de um equipamento de nanocromatografia líquida Ultimate 3000 LC (Dionex, Germering, Germany) acoplado à um equipamento de espectrometria de massas Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). As fases móveis utilizadas foram: A) ácido fórmico 0,1% [v/v] em água LCMS e B, ácido fórmico 0,1% [v/v] em acetonitrila 80% [v/v]. Os peptídeos foram carregados em uma pré-coluna C18, $30\mu\text{m}$

x 5mm (Código 164649, ThermoFisher Scientific), e desalinizados num gradiente isocrático de 4%B por 3 minutos à um fluxo de 300 nL/min. Em seguida, os peptídeos foram fracionados por uma coluna analítica Reprosil-Pur C18-AQ, 3µm, 120 Å, 105mm, Código 1PCH7515-105H354-NV, PICOCHIP) utilizando um gradiente linear de 4-55%B por 30 min, 55% à 90%B por 1 min, mantido à 90%B por 5 minutos e reequilibrado à 4%B por 20 minutos à um fluxo de 300 nL/min. A ionização foi obtida utilizando uma fonte Nanospray ion source (PICOCHIP). O modo de operação foi ionização positiva utilizando o método DDA. Os espectros MS foram adquiridos de m/z 200 à m/z 2000, resolução de 70.000 e 100 ms de tempo de injeção. A câmara de fragmentação foi condicionada com energia de colisão entre 29 a 35% com resolução de 17.500, 50 ms de tempo de injeção, 4,0 m/z de janela de isolamento e exclusão dinâmica de 10s. Os dados de espectrometria foram adquiridos por meio do software Thermo Xcalibur (versão 4.0.27.19, ThermoFisher Scientific Inc.).

2.9.6 Análises dos dados

As interações de proteína foram submetidas ao software STRING (versão 10.5) com os parâmetros básicos: pontuação de corte de 0,40; rede no modo confidence e valor de enriquecimento de PPI de $<1,0e-16$. Para a obtenção da identificação das proteínas. O parâmetro utilizado nesta ferramenta foi: (taxonomia *Rattus norvegicus*).

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização de células-tronco mesenquimais

O processo de extração foi simples e rápido, apenas as CTMs de ratos aderiram ao plástico do frasco de cultivo. De este primeiro procedimento de extração, resultou um semeado heterogêneo de células arredondadas, não aderidas ao frasco de cultivo. No entanto, após algumas horas foi observado o início da adesão celular.

A confluência foi observada entre 5 a 7 dias após extração, momento no qual foi realizada a primeira passagem. Após a primeira passagem, as células cresceram em ritmo bem mais rápido, aproximadamente 4 dias depois de cada passagem foi observada a confluência.

A troca de meio foi realizada a cada 2 dias, sendo removido todo tipo celular que não estivesse aderido ao frasco de cultivo. Após cada passagem, foi possível ir observando um tipo celular que apresentava morfologia com citoplasma extenso e achatado, um a dois prolongamentos não ramificados e núcleo (Figura 10).

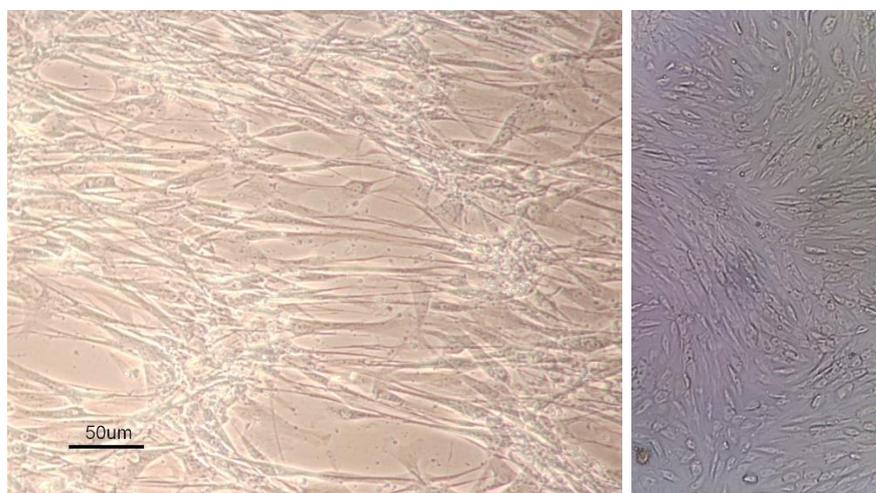


Figura 10. Cultura primária de células tronco mesenquimais aderidas, células confluentes com morfologia fusiforme.

3.1.2 Caracterizações por diferenciações celulares

As CTMs foram capazes de diferenciar *in vitro* em linhagens adipogênica e osteogênica (Figura 11).

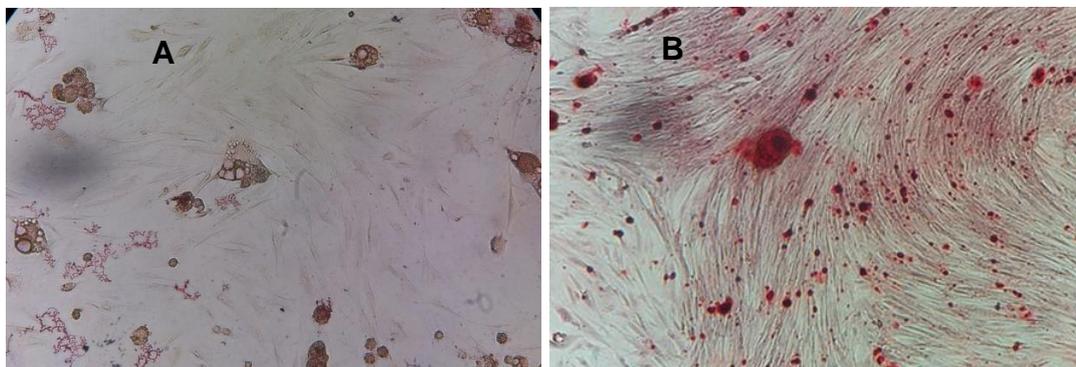


Figura 11. (A) Diferenciação adipogênica de células-tronco mesenquimais. (B) Diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais.

3.2. Técnica cirúrgica

A pesquisa de melhores formas de tratamento de lesões durais exige o desenvolvimento de modelos experimentais, que tentem reproduzir tanto os efeitos causados pela lesão quanto as reações que possam ser produzidas pelo uso dos biomateriais e seu contato com o tecido.

A técnica para a lesão na dura mater foi realizada de igual forma para todos os grupos. Dos 4 grupos de estudo, 3 receberam tratamento (BPF, BPF+CTMs, CTMs) e 1 não recebeu (C) nem um tipo de tratamento sendo utilizado como controle (Figura 12).

O tempo aproximado de cirurgia por animal, no nosso estudo, foi de 40 minutos, tendo-se em conta desde o preparo do animal, até a aplicação de Vetaglós® tópico.

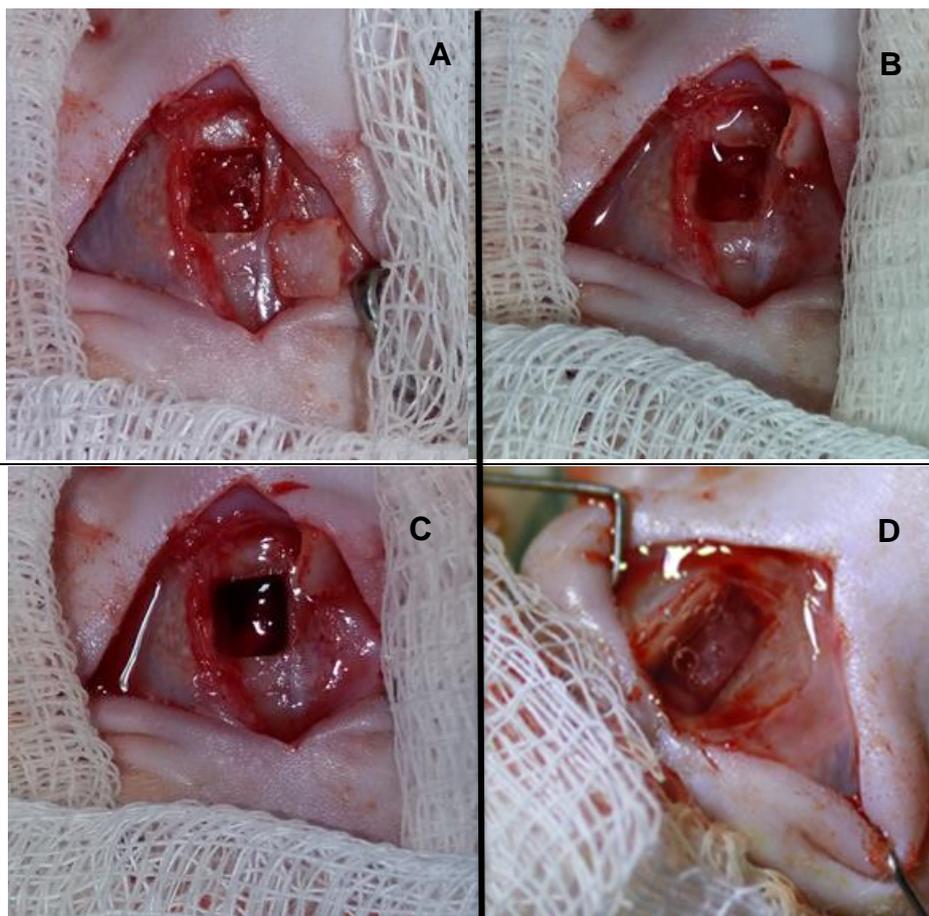


Figura 12. Procedimento cirúrgico para a realização da lesão experimental na dura mater de ratos. A. lesão sem tratamento, grupo C. B. lesão preenchida com CTMs. C. lesão preenchida com BPF+ CTMs. D. lesão preenchida com BPF.

Foi observada maior facilidade para ser reposicionado novamente no lugar da lesão o osso cortical da craniectomia nos grupos onde foi utilizado BPF com ou sem CTMs.

De igual forma foi observado menor sangramento no lugar da lesão, após aplicação do BPF nos grupos **BPF** e **BPF+CTMs**.

Foi possível observar no grupo **BPF + CTMs** em comparação com o grupo CTMs que o coágulo formado pelo BPF favoreceu macroscopicamente para manter as células no lugar da lesão, devido a que o veículo destas (DMEN) era líquido, ou seja, o BPF permitiu um arcabouço biológico e mecânico para as CTMs.

3.3. Imageamento de fluorescência *in vivo* da associação BPF e CTMs

A visualização por imageamento das células marcadas implantadas junto com o BPF como seu arcabouço permitiu a comprovação da permanência das células no lugar da lesão após 6 horas de implantação (Figura 13).

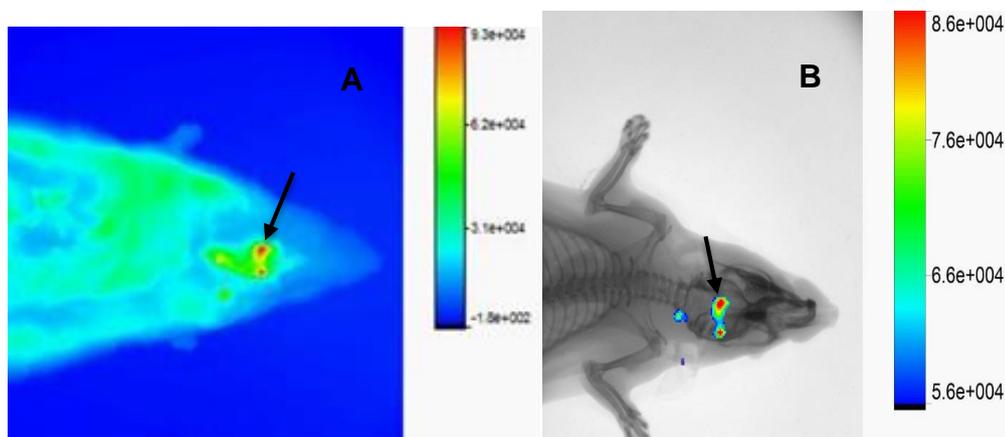


Figura 13. A) Imagem de fluorescência da associação das células marcadas com o nano cristal QTRACKER e BPF; B) Raio x com sobreposição da imagem de fluorescência. (Seta preta) Células marcadas.

3.4. Avaliação clínica

O efeito dos tratamentos empregados foram analisados determinando-se a porcentagem de sobrevivência dos animais, sendo a taxa de sobrevivência total para todos os grupos. Embora o grupo **C** não tenha recebido tratamento algum, todos os animais se mantiveram vivos durante o período de estudo.

O volume de LCR em ratos é tão baixo que foi difícil avaliar o vazamento durante o presente estudo.

Todos os animais dos 4 grupos, respondera normalmente a presença de luz artificial dentro do biotério.

Não foi observada algum tipo de conduta anormal dos animais referente a convulsões ou claudicações, tanto nos grupos tratados quanto o grupo controle.

Todos os animais receberam Tramadol via oral imediatamente terminada a cirurgia e logo após 24 horas, sendo observado no segundo dia no grupo **C** um pouco de desconforto dos animais, manifestado com quietude e posição não relaxada no momento de dormir, sinais que desapareceram logo após a segunda dose de Tramadol via oral.

O parâmetro sensibilidade dolorosa foi observado em 4 animais do grupo **C** e 3 animais do grupo **CTMs**. Já nos grupos **BPF** e **BPF+CTMs**, um animal de cada grupo apresentou sensibilidade dolorosa, no segundo dia após a cirurgia, desaparecendo logo após a segunda dose de Tramadol via oral.

Não foi observada a presença de deiscência ou secreção purulenta em nenhum animal durante todo o experimento.

Foi observado normal consumo de alimento e água em todos os grupos.

Na avaliação das habilidades motoras, não foi observado em nenhum grupo, manifestação de paralisias ou paresias durante todo o estudo, o padrão de marcha fora da gaiola não teve sinal de dificuldade motora, fraqueza ou tremor.

Após duas semanas, em todos os animais foi observado crescimento normal do pelo no lugar da ferida. Nos animais com 28 dias após a lesão, a ferida tinha sido cicatrizada na sua totalidade.

Observou-se que todos os animais tratados e controle, apresentaram evolução clínica satisfatória, sem alterações que pudessem ser atribuídas aos biomateriais BPF e CTMs. Não ocorreu manifestação que demonstrasse reações macroscópicas locais associadas à rejeição dos biomateriais, após aplicação direta na dura-máter, indicativo da característica de biocompatibilidade.

3.5 Análise Histológica

As eutanásias foram feitas aos 7 e 28 dias após cirurgia. Na coleta do material para análise histológica com coloração de H & E, uma zona de demarcação onde a lesão tinha sido realizada, podendo ser facilmente vista em todos os grupos (Figura 9).

No dia 7 após cirurgia, os animais do grupo **C** apresentaram as bordas da lesão como uma descontinuidade das meninges ou aspecto de lacuna (Figura 14 A), sem presença de dano significativo no tecido. As bordas se caracterizaram por estar isentas de células ativas ou congestão.

Aos 28 dias no grupo **C**, a lesão ainda podia ser observada (Figura 14 B). Não encontrou-se presença de neovascularização, nem processo de reparação. Foram observados alguns pontos de hemossiderina, indicativos de destruição de hemácias, expressados pelo depósito de um pigmento amarelo – dourado (Figura 14 B). A hemossiderina é um agregado de ferro, proveniente da liberação pela degradação da hemoglobina, na forma de agregados ou grânulos (17).

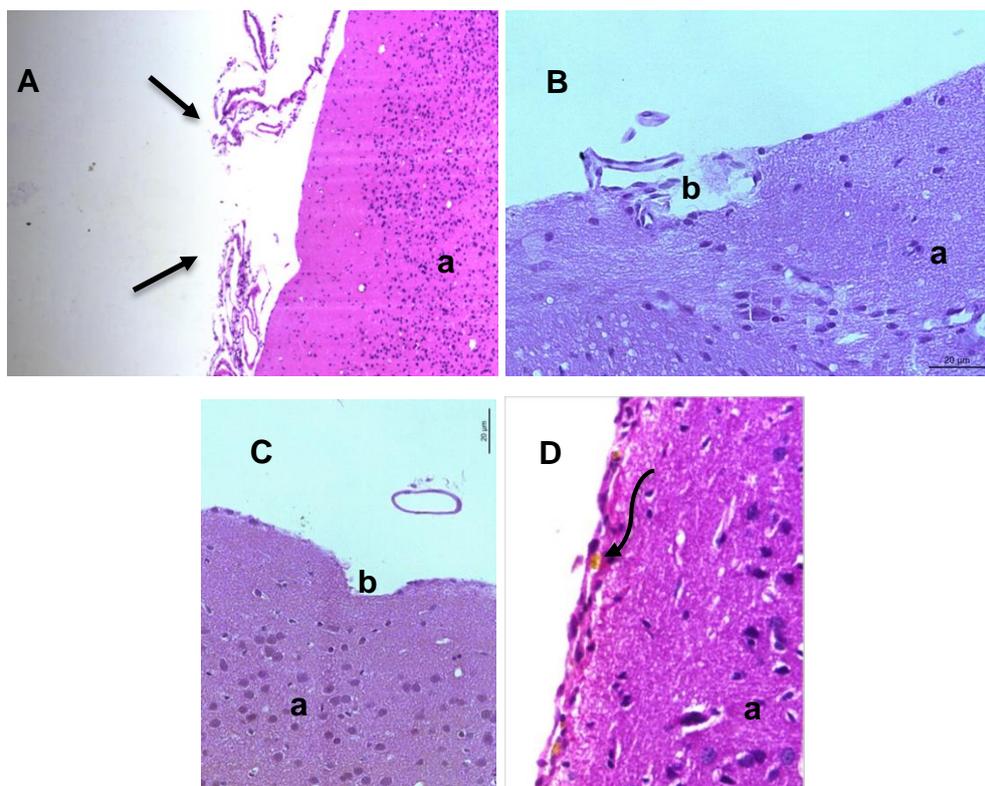


Figura 14. Região da lesão na dura mater de ratos, vista transversal, grupo **C**. A. 7 dias após cirurgia. (a) Cortex cerebral, (seta reta) descontinuidade das meninges. B. 7 dias após cirurgia. (a) Cortex cerebral. (b) Presença de lacuna. C. 28 dias após cirurgia. (a) Cortex cerebral. (b) Presença de lacuna. D. 28 dias após cirurgia. (seta curva) depósito de hemossiderina.

No grupo **BPF**, aos 7 dias foi visível observar algo semelhante a do grupo controle, com as bordas da lesão apresentando-se como uma descontinuidade das meninges ou aspecto de lacuna, sem presença de células ativas, necrose ou congestão (Figura 15 A). Neste grupo e no grupo **BPF + CTMs** teve um maior grau de dificuldade na coleta do tecido cerebral, devido a que o osso rebatido e logo reposicionado apresentava forte adesão no lugar da lesão na dura mater, encontrando-se em alguns animais após levantamento do osso, um material amarelado de consistência pastosa, fortemente aderido ao osso (Figura 16), acreditasse que este material seja o BPF ainda não biodegradado.

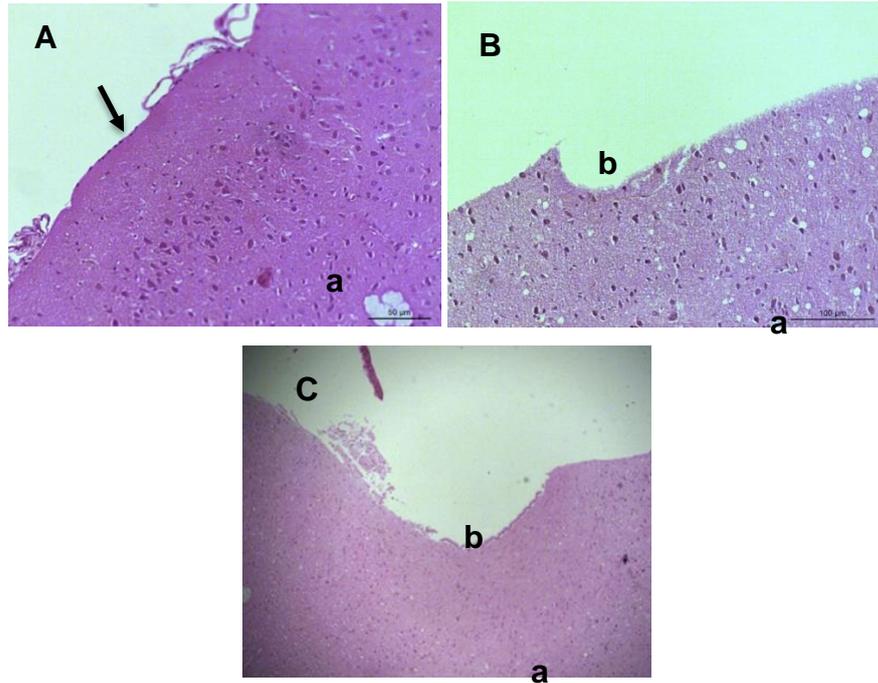


Figura 15. Região da lesão na dura mater de ratos, vista transversal, grupo **BPF**. A. 7 dias após cirurgia. (a) Córtex cerebral, (seta) Descontinuidade nas meninges. B. 7 dias após cirurgia. (a) Córtex cerebral, (b) Presença de lacuna. C. 28 dias após cirurgia. (a) Córtex cerebral, (b) Presença de lacuna.



Figura 16. Coleta do cérebro de rato após eutanásia. Animal 7 dias, grupo **BPF**. (Seta) Presença de BPF aderido ao osso.

Aos 28 dias no grupo **BPF**, a borda da lesão ainda podia ser facilmente delimitada e a lesão se apresentava com aspecto de lacuna (Figura 15 B). Já que estas lacunas também foram observadas no grupo **C**, acreditasse que a presença delas se deva a técnica cirúrgica e não ao bioproduto.

No grupo **BPF** não foi visto em nenhum tempo de estudo, a presença de neovascularização, nem processo de reparação.

Embora foi observado o BPF fortemente aderido ao osso, nas laminae histológicas não evidenciaram a presença do mesmo, nem indícios que demonstrassem ligação dele com o córtex cerebral.

No grupo **BPF**, não foi observada a presença de necrose nem reações adversas dos tecidos hospedeiros aos 7 ou 28 dias após cirurgia, apresentando excelente tolerância tecidual sem reação de corpo estranho ou fibrose extensa.

Grupo **CTMs**, aos 7 dias após cirurgia, foi observado em dois animais a presença de lacuna vazia (tabela 1), já os outros dois apresentaram infiltrado celular com presença de células gliais e hemácias, evidenciando bioatividade para este grupo.

Aos 28 dias no grupo **CTMs**, a atividade celular foi observada só em um animal, com presença de infiltrado inflamatório, hemácias e muitos pontos de hemossiderina. Notou-se também neste grupo, formação de uma interface entre as células ativas provenientes do sítio da lesão e o córtex cerebral (Figura 17), está interface podia ser facilmente indicada e se interiorizava no córtex cerebral. Foram observados neovascularização e indícios de reparação neste animal.

Neste grupo, não foi observada a presença de necrose, nem danos significativos aos tecidos adjacentes aos 7 ou 28 dias.

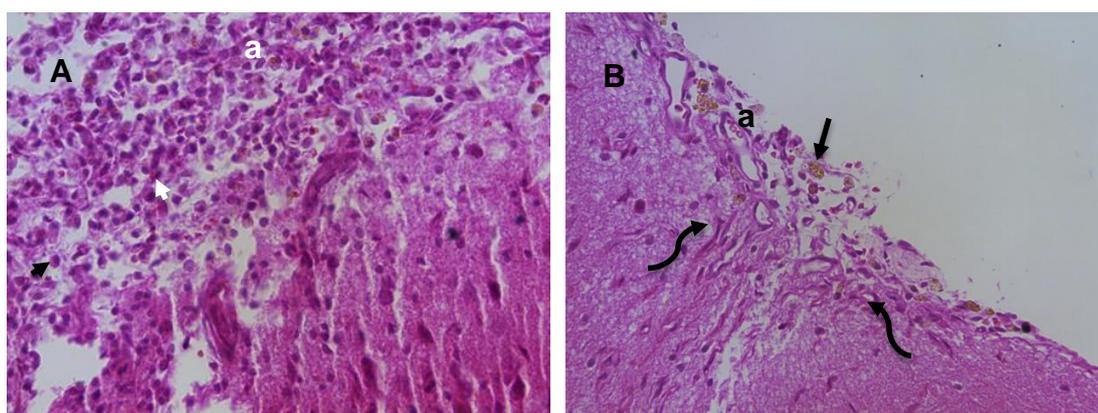


Figura 17. Região da lesão na dura mater de ratos, vista transversal, grupo CTMs. A. 7 dias após cirurgia. (a) Infiltrado celular. (Cabeça da seta preta) linfócito, (Cabeça da seta branca) hemácia. B. 28 dias após cirurgia. (Seta reta) Deposito de hemossiderina, (seta curva) Interface.

No grupo **BPF + CTMs**, aos 7 dias, as observações foram algo semelhante a do grupo **CTMs**, com grande presença de infiltrado celular e interfaces em três animais. No entanto, ao comparar o grupo **BPF + CTMs** com o grupo **CTMs** nesta data, notou-se mais intensa atividade celular evidente na presença do BPF, o que demonstra que o BPF auxiliou as CTMs para seu depósito no lugar da lesão.

Nas observações aos 7 dias no grupo **BPF + CTMs**, foi possível visualizar em um animal dos três que tinham infiltrado celular ativo, a presença de células epiteloideas (Tabela 1) envolta de um grande aglomerado de infiltrado celular, astrócitos, hemossiderina e algumas células gigantes de tipo Langhans (Figura 18). Astrócitos reativos são acreditados para ter ambos efeitos, tanto positivos como efeitos negativos, dependendo da sua intensidade (18).

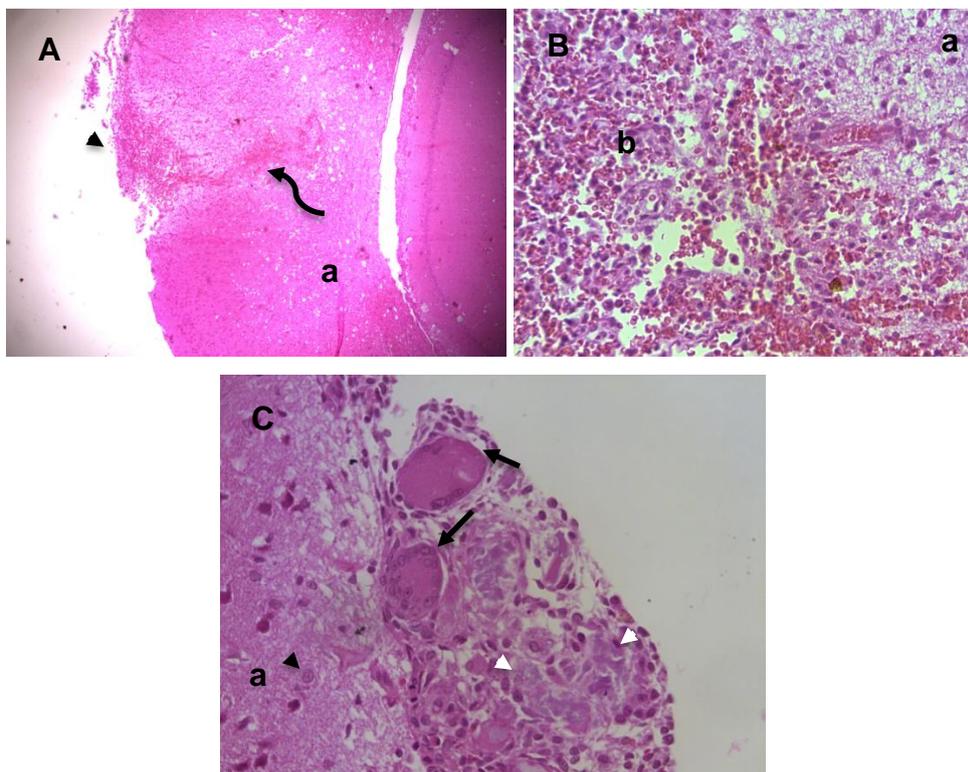


Figura 18. Região da lesão na dura mater de ratos, vista transversal, grupo **BPF + CTMs**. 7 dias após cirurgia. A. (a) Córtex cerebral, (Cabeça da seta preta) região da lesão, (seta curva) Interface. B. (a) Córtex cerebral, (b) Infiltrado celular. C. (Cabeça da seta branca) Células epiteloideas. (Seta reta) Células gigantes de tipo Langhans. (Cabeça da seta preta) astrócito.

No grupo **BPF + CTMs**, aos 28 dias, três animais mostraram presença de infiltrado celular e uma intensa quantidade de depósitos de hemossiderina. Ainda, em

um animal, parte do infiltrado celular mostrou-se composto por células gigantes e visualizado no lugar da lesão um granuloma (Figura 19).

Dessa forma no grupo **BPF+CTMs** observou-se, um padrão de infiltrado celular diferente, como resultado uma resposta inflamatória diferente quando comparado com os anteriores grupos. O grupo **BPF+CTMs**, apresentou maior bioatividade, comparado ao grupo **CTMs**, associada a uma reação inflamatória excessiva e adversa no SNC, para seu uso em lesões na dura mater de ratos.

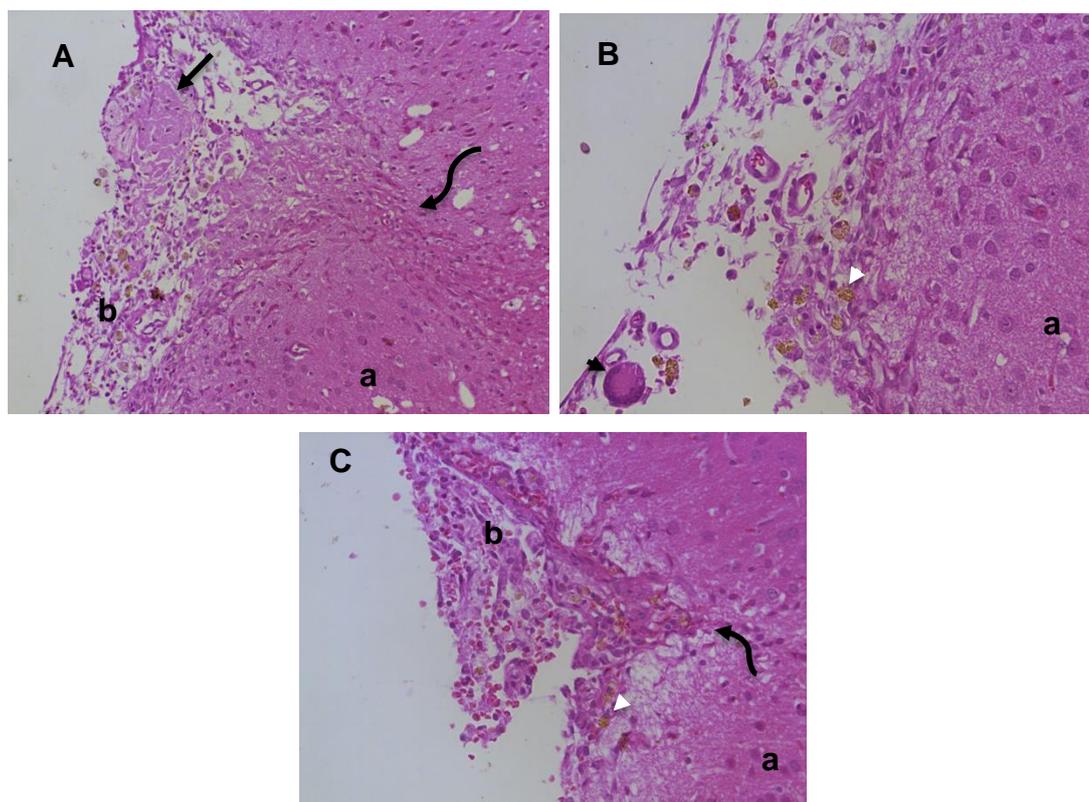


Figura 19. Região da lesão na dura mater de ratos, vista transversal, grupo BPF + CTMs 28 dias após cirurgia. A. (a) Córtex cerebral, (b) Infiltrado celular, (seta curva) Interface. (Seta reta) Granuloma. B. (a) Córtex cerebral, (Cabeça da seta branca) Hemossiderina, (Cabeça da seta preta) Células gigantes de tipo Langhans. C. (a) Córtex cerebral, (b) Infiltrado celular, (seta curva) Interface, (Cabeça da seta branca) Hemossiderina.

Tabela 01. Análise descritivo, comparando os quatro grupos de estudo em relação a infiltrado celular, presença de células gigantes, presença de células epiteloideas e interface por cada tempo de estudo.

7 dias / 28 dias	Infiltrado celular	Células gigantes	Células epiteloideas	Interface
C	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
BPF	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
CTMs	2 / 1	0 / 0	0 / 0	2 / 1
BPF+CTMs	3 / 3	1 / 1	1 / 1	3 / 3
Total por data	5 / 4	1 / 1	1 / 1	5 / 4

3.6 Análise proteômica

Foram incluídas ao estudo as amostras dos 4 grupos experimentais (**C**, **BPF**, **BPF+CTMs**, **CTMs**).

Análises de espectrometria de massas realizada do segmento de tecido cerebral no grupo **C**, identificaram um perfil de proteínas expressas para este grupo e as quais foram caracterizadas segundo sua provável função neste tipo de amostra biológica e interações (Figura 20). As proteínas foram identificadas relacionadas a processos biológicos, sendo observados entre eles: 36 proteínas relacionadas a processos celulares, 19 a desenvolvimento de sistema, 22 proteínas relacionadas a resposta a estímulos, 21 a processos de desenvolvimento, 16 a desenvolvimento do sistema nervoso, 13 a neurogênese, 11 a respostas ao estresse, 4 a regeneração, 2 a proliferação de células gliais. A análise evidenciou que a presença da proteína (PENK) para este grupo.

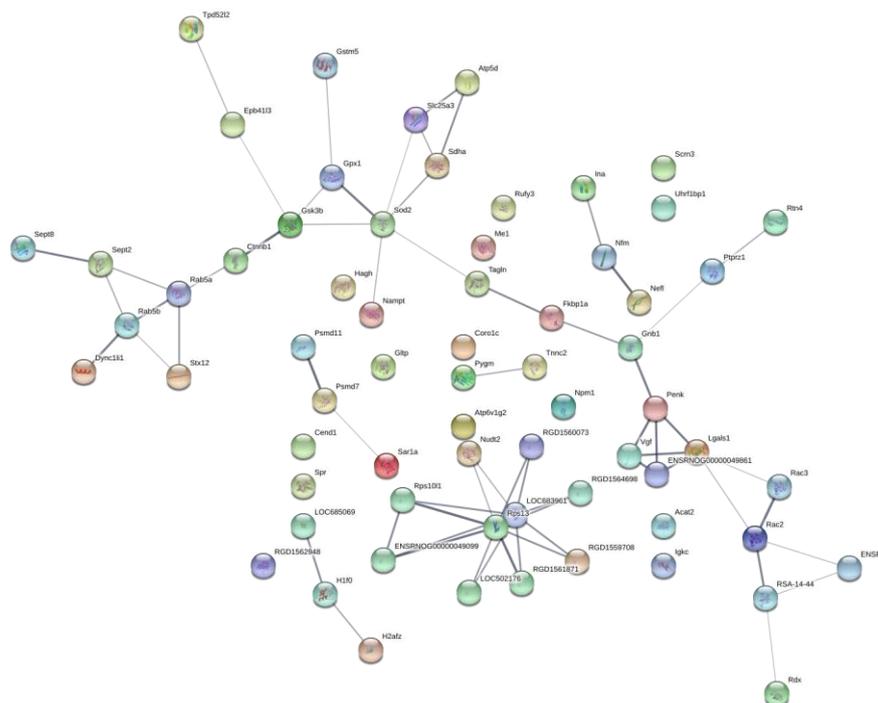


Figura 20. Gráfico de rede de interação do software STRING (versão 10.5), proteínas identificadas grupo **C**.

Para a análises de espectrometria de massas realizada do segmento de tecido cerebral no grupo **BPF**, as proteínas identificadas para este grupo foram caracterizadas segundo sua provável função neste tipo de amostra biológica e interações (Figura 21). As proteínas foram identificadas relacionadas a processos biológicos, sendo mencionados 10 destes processos: 36 proteínas relacionadas a resposta ao estímulo, 19 a resposta ao produto químico, 17 a resposta ao estresse, 15 a desenvolvimento do sistema nervoso, 12 a resposta a estímulo abiótico, 11 a resposta celular ao estímulo endógeno, 8 a processo metabólico de drogas, 6 a geração de metabólitos precursores e energia, 5 a regulação da resposta imune, 4 a processo catabólico de drogas, 2 a endocitose mediada por caveolina.

a processo celular, 46 a resposta ao estímulo, 39 a organização de componentes celulares ou biogênese, 26 a desenvolvimento do sistema nervoso, 22 a diferenciação celular , 21 a comunicação celular , 18 a neurogênese, 18 a resposta ao estresse, 17 a geração de neurônios, 17 a resposta ao medicamento, 13 a diferenciação neuronal, 13 a regulação do processo de modificação de proteínas, 10 a processo metabólico de drogas, 10 a desenvolvimento de neurônios, , 10 a regulação negativa do processo apoptótico, 7 a regulação do crescimento celular, 6 a regeneração, 2 a proliferação de células gliais. A análises evidenciou que a proteína (PENK), se expressou com exclusividade para este grupo e o grupo **C**.

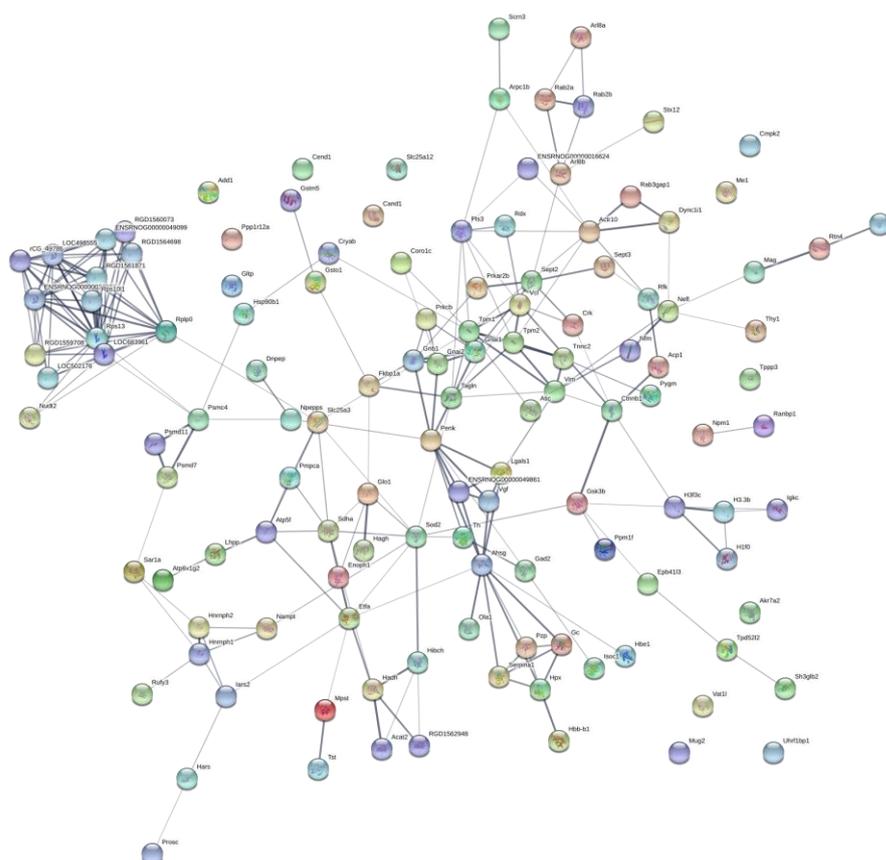


Figura 22. Gráfico de rede de interação do software STRING (versão 10.5), proteínas identificadas grupo **CTMs**.

Para a análises de espectrometria de massas realizada do segmento de tecido cerebral no grupo **BPF+CTMs**, as proteínas identificadas para este grupo foram caracterizadas segundo sua provável função neste tipo de amostra biológica e interações (Figura 23). As proteínas foram identificadas relacionadas a processos biológicos, sendo mencionados alguns destes processos: 27 a resposta ao estímulo,

18 a comunicação celular, 17 a resposta ao estresse, 13 a desenvolvimento do sistema nervoso, 12 a transporte intracelular, 6 a autofosforilação de proteínas, 6 regulações positiva da migração celular, 6 a processo apoptótico, 2 a endocitose mediada por caveolina, 2 a regulação da migração de células mononucleares, 2 a interação com o hospedeiro.

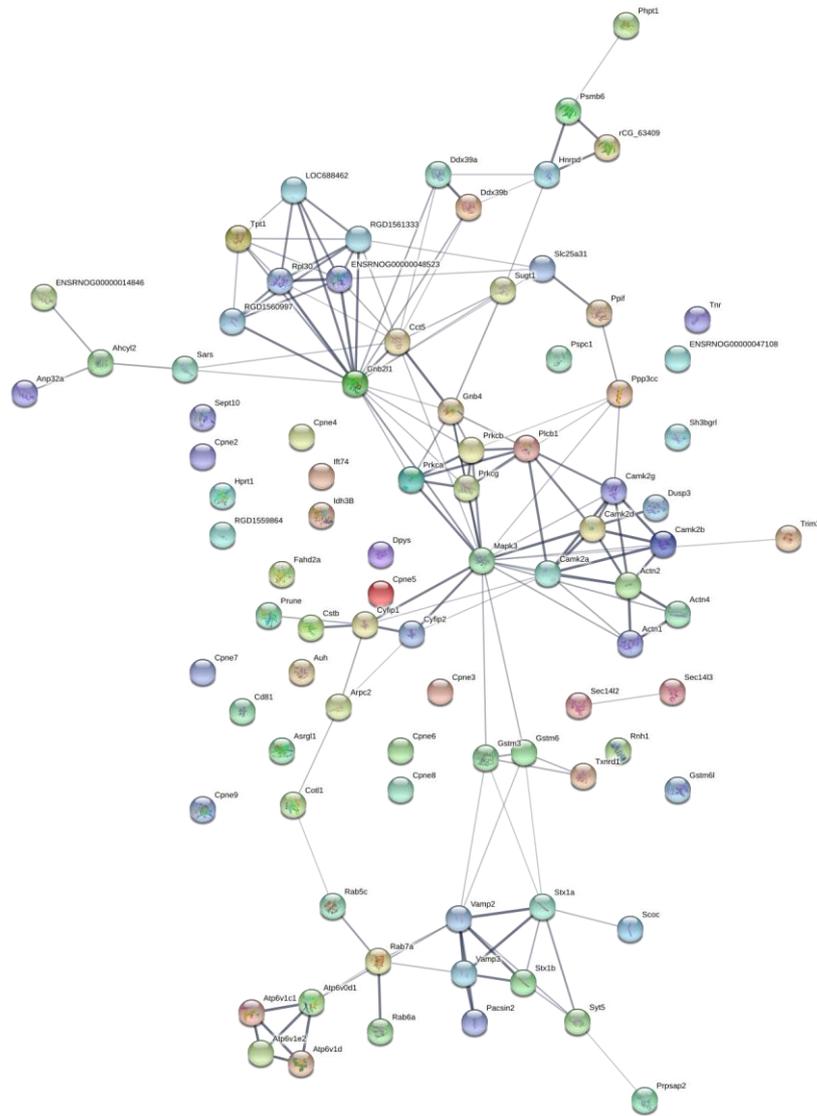


Figura 23. Gráfico de rede de interação do software STRING (versão 10.5), proteínas identificadas grupo **BPF+CTMs**.

4. DISCUSSÃO

O processo de extração de CTMs pode ter variações. Entre algumas destas variações podemos citar as diferentes regiões de onde podem ser isoladas (medula óssea, tecido adiposo, periósteo, tecido muscular e os órgãos parenquimatosos) (19), e o uso ou não de diferentes tipos de gradientes de extração. No nosso estudo este processo de extração a partir de medula óssea de rato, foi simples e rápido, comparado com os outros processos, não sendo necessário fazer gradiente de Percoll (11) ou gradiente de ficoll (20), uma vez que apenas as CTMs de ratos aderiram ao plástico do frasco de cultivo.

A confluência do cultivo de CTMs foi observada entre 5 a 7 dias após extração, momento no qual foi realizada a primeira passagem. Após a primeira passagem, as células cresceram em ritmo bem mais rápido, aproximadamente 4 dias depois de cada passagem foi observada a confluência. Já outros autores apresentaram resultados diferentes ao isolar CTMs do tecido adiposo de cães, um rápido crescimento inicial, aproximadamente de 72 horas seguido por fase regular (exponencial) (21).

Para o análises de caracterização por citometria de fluxo nosso ensaio com três cores (apêndice I e II), concorda com Dominici *et al*, 2006 (12) ao falar que um ensaio citométrico de fluxo deveria utilizar análises multicolor (isto é, coloração dupla, coloração tripla, etc.), para demonstrar que as células individuais co-expressam marcadores CTMs e falta Ag hematopoiético.

Nosso estudo corroborou o que Dominici *et al*, 2006 (12) chamo como a propriedade biológica que mais singularmente identifica as CTMs, e é a sua capacidade de diferenciação. Demonstrando que nossos resultados de caracterização celular, mostraram condições adequadas de cultivo e concordando com NARDI & MEIRELLES, 2006 (22), que afirmaram que em culturas e em condições adequadas de cultivo, as CTMs exibem morfologia fibroblastoide, adesão em substrato plástico, autorrenovação e diferenciação em tipos celulares distintos.

Muitos modelos experimentais têm sido utilizados para reproduzir a lesão dural, entre eles coelhos (23,24), cães (13, 25), porcos (26) primatas (27) e ratos (14, 28,29, 30, 31, 32,33). No entanto, no nosso estudo como primeiro contato em lesões durais com o uso de BPF produzido no CEVAP, decidimos usar o rato como modelo experimental, devido à sua fácil disponibilidade, menor custo e manutenção e facilidade de obtenção de ninhadas com peso e idade controladas.

A região cranial foi escolhida para realizar a técnica cirúrgica pelo contato próximo dos biomateriais com o tecido cerebral, brindando uma ideia mais clara da biocompatibilidade do bioproduto, devido a importância do tecido cerebral no controle e regulação do organismo, permitindo poder ser identificadas mais facilmente possíveis lesões, rejeição ou intolerância aos bioprodutos. Outros autores também optaram pela escolha desta região (29, 30, 31,32,33). Embora, também podemos encontrar estudos feitos nas regiões medulares (14, 28).

Contrário ao observado por Biscola *et al.*, 2017 (34) como uma das vantagens no uso do BPF é a redução do tempo de cirurgia, no nosso trabalho o tempo de cirurgia se manteve igual para todos os grupos que receberam tratamento, sendo menor só para o grupo **C** controle. O reparo dural aumenta o tempo total de cirurgia em aproximadamente 20 a 30 minutos (35), por isso a técnica adequada deve ser de rápida e de fácil aplicação (2).

Foi observado que o BPF permitiu um arcabouço biológico e mecânico para as CTMs. Acreditando-se que o fato da ausência de atividade celular em 2 animais do grupo **CTMs** aos 7 dias, deva-se à dificuldade por si só das CTMs de permanecerem no lugar da lesão. Nossos resultados corroboraram Rosso *et al*, 2005 (36) que enaltecem a importância dos arcabouços na engenharia de tecidos, para permitir a promoção da adesão celular. No nosso estudo, isto ocorreu devido à maleabilidade do BPF, formando uma rede densa durante a estabilização do coágulo (9).

No momento da cirurgia o BPF mostrou propriedades adesivas no segmento osso da craniectomia, permitindo uma maior facilidade para ser reposicionado novamente no lugar da lesão no osso cortical da craniectomia, comprovando sua adesividade tecidual (37), que é comum aos selantes ou colas de fibrina. De igual forma o BPF também auxiliou no menor sangramento no lugar da lesão, após sua aplicação nos grupos **BPF** e **BPF+CTMs**. Uma análise anterior demonstrou que os SF reduziram a perda de sangue ou reduziram o tempo para alcançar a hemostasia (38). Isto concorda com outros autores (39,40), explicando que o SF baseia-se na reprodução do estágio final da cascata da coagulação, formando os coágulos estáveis.

A taxa de sobrevivência foi total para todos os grupos após lesão na dura mater; Neurologicamente os animais se apresentaram aparentemente normais durante todo o estudo e nenhuma convulsão foi observada. Resultados similares aos obtidos em cães submetidos a lesão na dura mater, sem uso de tratamento e também com o uso

de SF, selante de gelatina ou polietilenoglicol (PEG), onde a sobrevida foi total para todos os animais, sem nenhuma observação clínica ou neurológica relacionada aos tratamentos (13). Estes resultados são de suma importância, já que o SNC está integrado aos outros sistemas, comandando, executando, enviando e recebendo estímulos (41).

A importância da ausência de deiscência ou secreção purulenta durante todo o experimento é devido a que estas podem ser interpretadas como possível incompatibilidade de um material ou infecção. Já tem sido descrita em outros estudos a ausência de infecção em ratos submetidos a reparação da dura-máter com SF (28).

Percepção do desconforto corporal é algo complexo e tem influência de estímulos nocivos, o SNC é capaz de modular e controlar essa percepção, como forma de reduzir seu impacto sobre o organismo, prevenindo e/ou minimizando os sintomas (42). No nosso estudo foi observado algum desconforto no segundo dia após cirurgia no grupo **C**, manifestado com quietude e posição não relaxada no momento de dormir. Além, o parâmetro sensibilidade dolorosa foi observado em 4 animais do grupo **C** e 3 animais do grupo **CTMs**. Estas observações clínicas foram acompanhadas pela presença exclusiva da expressão da proencefalina *penk* nestes dois grupos, componente importante depois de sofrer lesões, aumentando a liberação de glutamato na região (43). Sabe-se que os neuropeptídeos opioides derivados de *Penk* influenciam as cefaleias (44). Produzindo sintomas relacionados à enxaqueca, incluindo comportamento aversivo à luz, (45). Este resultado está de acordo com relatos de associação entre enxaqueca e aumento da transmissão de glutamato (46). O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do cérebro de mamíferos, tendo interferência na dor neuropática (47).

Qualquer lesão nos tecidos nervosos leva a alterações endógenas, sendo rapidamente ativados logo após a lesão. Os gânglios trigêmeos do sistema nervoso que inervam a dura-máter, podem ser ativados mediante lesões e estar associados à enxaqueca crônica e à percepção da dor (48). Este resultado confirma a participação do sistema trigeminovascular, neuropeptídeos e citocinas inflamatórias nos processos moleculares da enxaqueca (45).

Os SF têm sido relatados como uma ferramenta cirúrgica útil em cirurgias de acesso ao SNC para evitar o vazamento de LCR durante o período pós-operatório. Já foi relatado que o vazamento de LCR ocorreu no pós-operatório em apenas 5% de 83

pacientes tratados com SF (49). Em nosso estudo, observou-se que ocorreu o efeito selante nos grupos que receberam o BPF, pois houve a diminuição da sensibilidade dolorosa nestes animais, que baseado na literatura já é sabido que as lesões na dura-máter com extravasamento de LCR podem levar à complicação como dores de cabeça e aprisionamento da raiz nervosa (50).

Os mecanismos ao início da dor de cabeça são mediados pela ativação e aumento da mecanosensibilidade (ou seja, sensibilização) de aferentes nociceptivos trigeminais que inervam meninges cranianas e seus vasos sanguíneos grandes relacionados (51).

Foi realizada apenas profilaxia antibiótica tópica, pois o objetivo deste estudo foi avaliar as possíveis respostas aos biomateriais. Tendo-se em conta que, a profilaxia antibiótica em cirurgia deve ser indicada nas intervenções com alta probabilidade de infecção da ferida cirúrgica (52) como em diérese de trato respiratório, gastrointestinal e urogenital, em feridas e locais contaminados e em cirurgias que durem mais que noventa minutos (53), ou seja, a antibioticoterapia terapêutica deve ser estabelecida em procedimentos classificados como contaminados ou infectados ou quando ocorre contaminação em procedimentos limpo-contaminado (52).

A ausência de dano significativo no tecido, células ativas ou congestão, nas laminais histológicas do grupo **C**, também foi relatada por outros autores, onde o grupo não tratado apresentou na sua maioria de laminais histológicas, ausência de infiltrado celular (28).

Histologicamente o grupo **BPF** não mostrou infiltrado celular nem vantagens no processo de reparação. Resultados similares a BARCELOS *et al.*, 2008 (28) ao dizer que a reparação com SF não apresentou vantagens significativas em relação à lesão sem reparo, na dura-máter de ratos. Embora o grupo **BPF** apresentou excelente tolerância tecidual, mostrando-se ao igual que o SF um bioproduto seguro (29, 54).

Diferente do grupo **BPF** o grupo **BPF + CTMs** mostrou forte infiltrado celular. Estas observações se dão, provavelmente, pela associação dos bioprodutos, dando a possibilidade de adesão e permanência das CTMs no lugar da lesão. Sabe-se que o BPF tem se mostrado como uma estrutura tridimensional que é capaz de manter células no lugar (9). Dessa forma no grupo **BPF+CTMs** observou-se, um padrão de infiltrado celular diferente, como resultado uma resposta inflamatória diferente quando comparado com os grupos anteriores.

Embora os grupos **CTMs** e **BPF+CTMs**, apresentaram infiltrado celular e bioatividade; O grupo **BPF+CTMs** mostrou-se com maior bioatividade, associado a uma reação inflamatória excessiva e adversa no SNC, para seu uso em lesões na dura mater de ratos. Contrário à Chen *et al*, 2010 (55), que minimizaram a chance de formação de tumor, após serem misturadas as CTMs com SF no espaço subdural, mas não diretamente injetado no córtex cerebral. Além disso, esta mistura de CTMs e SF transplantado subduralmente, promoveu a neuroproteção diminuindo a inflamação.

Foi observado o BPF, fortemente aderido ao osso no lugar da lesão. Kawai *et al*, 2014 (13) também confirmaram histologicamente, que o SF, o selante de gelatina e o polietilenoglicol (PEG), todos estavam firmemente aderidos às amostras de lesões na dura mater. O desempenho dos selantes depende da propriedade de impermeabilidade do próprio selante e qualidade de adesão do selante com a dura-máter (13). De fato, no nosso estudo, isso poderia ajudar a explicar a menor manifestação de sensibilidade dolorosa, nos grupos tratados com BPF.

Não foi observada nas lâminas histológicas integração do BPF com o tecido cerebral, devido à esta ausência de integração, o BPF se apresentou nas análises histológicas com a característica de bionerte para seu uso em lesões durais de ratos. O material ideal de duraplastia deve ser imunologicamente inerte, não tóxico e incapaz de disseminar doenças infecciosas (56). O BPF mostrou-se compatível com este ambiente fisiológico nos resultados histológicos. Isto poderia ser comparado com os resultados de PREUL *et al.*, 2007 (57) ao observarem que o PEG que é um produto sintético usado para evitar o extravasamento de LCR persiste como um espaço de enchimento e separa os tecidos, enquanto eles cicatrizam de forma independente. Esta separação pode proporcionar a preservação do plano cirúrgico entre a dura-máter e os tecidos circundantes, enquanto bloqueia a migração de células inflamatórias através de uma barreira de hidrogel.

Autores relatam que o hidrogel de PEG, persiste como um preenchimento do espaço inerte e separa os tecidos enquanto eles se curam independentemente, essa separação poderia proporcionar a preservação do plano cirúrgico, bloqueando a inflamação, sem ser associado com neurotoxicidade ou atraso na cicatrização e alterações degenerativas do tecido neural do rato (30), podendo inclusive atuar como uma barreira biocompatível (58). Outros autores já relatam que em análises histológicas comparando o uso do SF com o PEG, mostrou-se que o PEG inibiu o

processo de cicatrização normal do tecido e o estímulo a formação de abscessos e granulações, sendo que os resultados foram melhorados pelo uso de SF (24).

A terapia celular é uma estratégia que tem revelado mediante evidências experimentares, poder fornecer neuroproteção, angiogênese, imunomodulação e neuroplasticidade (59). Além de poder induzir as demais células presentes no nicho tecidual a secretarem outros fatores solúveis que estimulam a diferenciação dessas células indiferenciadas, favorecendo o processo de reparação (60).

Em geral, o mecanismo de reparo das CTMs consiste no potencial para se desenvolver em muitos tipos de células (servindo assim como um sistema de reparo para o corpo) e o potencial para liberar fatores tróficos que reparam e regulam outros mecanismos compensatórios na área danificada (61). As CTMs secretam uma grande variedade de citocinas pró e anti-inflamatórias e fatores de crescimento e, por meio dessas moléculas bioativas, proporcionam a modulação da resposta inflamatória e o restabelecimento do suprimento vascular (60).

Entre as células encontradas no infiltrado celular, estavam as células da glia. As células da glia sustentam e podem participar da atividade neuronal ou da defesa (62). No SNC, essas células são os astrócitos, os oligodendrócitos, as células da micróglia (63). Astrócitos reativos exercem diversas funções complexas em resposta a diferentes formas de danos no SNC, podendo ser regulados por diferentes sinais moleculares (18). Além, participam da recuperação após doenças neurológicas ou traumatismo cranioencefálico (64).

Uma grande lista de substâncias estranhas pode penetrar e causar uma resposta de corpo estranho. Histopatologicamente, a maioria dessas substâncias podem induzir um granuloma de corpo estranho, incluindo células epitelióides, células gigantes multinucleadas derivadas de histiócitos e variáveis números de outras células inflamatórias (65).

Há consenso que a inflamação tem tanto efeitos benéficos quanto prejudiciais aos tecidos (66), dependendo de sua intensidade e tempo de duração. Ambos os efeitos benéficos e nocivos têm sido atribuídos à presença e ativação de microglia/macrófagos, linfócitos, produção de anticorpos e citocinas (67).

A inflamação granulomatosa é caracterizada pelo acúmulo focal de macrófagos ativados, que geralmente desenvolvem uma aparência epitelióide (semelhante ao epitélio). Podendo ser de dois tipos: granuloma de corpo estranho ou granuloma imune (68).

A característica essencial dos granulomas de corpo estranho é a presença de exógenos ou de material endógeno que tenha sido alterado de alguma forma para que o corpo o identifique como estranho (65).

Os granulomas de corpo estranho são caracterizados pela presença de células gigantes multinucleadas (20), estando envolvidas em processos de reparação (69). Estas células gigantes são frequentemente do tipo corpo estranho, com núcleos espalhados irregularmente por todo o citoplasma; mas as células gigantes de Langhan também são vistas (65). É assim que é possível identificar granulomas de tipo corpo estranho com abundantes células de Langhans (20). As células gigantes de Langhans são grandes, formadas pela fusão de células epitelióides (macrófagos ativados) contendo vários núcleos dispostos na periferia com forma de ferradura.

Quando o material estranho resiste à degradação, os macrófagos contendo o material de corpo estranho dentro do seu citoplasma, secretam diferentes citocinas que atraem macrófagos adicionais para o foco inflamatório, o resultado é a formação de um granuloma em torno do corpo estranho, que tenta isolar o resto do corpo do material sequestrado (65).

Um estudo sobre granulomas intracranianos de material estranho após cirurgia craniana, publicado no 2018, mostrou que o (75%) dos casos apresentavam sinais clínicos e sintomas relacionados aos granulomas de corpo estranho, enquanto o (25%) não o fizeram. Nos pacientes assintomáticos, as lesões cranianas foram diagnosticadas incidentalmente (70).

Alguns produtos anteriormente utilizados para duroplastia, como por exemplo o PEG também indicou que pode causar dano cortical indiretamente via formação de granuloma na superfície do cérebro (24). Nos casos de materiais que são sintéticos, encontrasse a desvantagem de ser inabsorvível, relatando complicações, incluindo rejeição, irritação do córtex cerebral, formação excessiva de cicatrizes, meningite e hemorragia (56).

Embora deixar tais substâncias em locais cirúrgicos seja considerado seguro, em geral, o granuloma de corpo estranho pode ocorrer meses ou anos após a cirurgia intracraniana. Assim, relativamente pouco se sabe sobre o tratamento e o resultado de tais lesões. A patogênese do granuloma de corpo estranho ainda precisa de mais esclarecimentos (70).

É possível que o microambiente proporcionado pelo BPF tenha alterado as propriedades das CTMs, gerando um ambiente predominantemente pró-inflamatório

(71). Pode-se inferir que os resultados da atividade celular, encontrados no grupo **BPF +CTMs**, sejam em consequência da presença das CTMs. De um modo geral, os presentes dados demonstram que a terapia com CTMs pode ser de neuroregeneração e, quando associada a BPF, desloca a resposta imune para um perfil pró-inflamatório como também foi sugerido por Spejo *et al.*, 2018 (71), ou seja, a resposta das CTMs é o resultado dos estímulos brindados pelo microambiente onde elas estejam.

Um dos fatores mais importantes que afetam a qualidade e resultado de um estudo proteômico, são a coleta e preparação da amostra (72). Metodologias baseadas em proteômica podem ser aplicadas dependendo do contexto clínico específico de uso (73). Extração proteômica baseada em protocolos com detergente, são as melhores ferramentas de preparação de amostras para tecido nervoso central (SNC) (72).

Várias metodologias proteômica tornam possível identificar, caracterizar e quantificar comparativamente o nível de expressão de centenas de proteínas em um determinado tecido (74). A possibilidade para localizar ou seguir as mudanças nos organismos é de primordial importância para desvendar os caminhos bioquímicos e desenvolver novos tratamentos e drogas (75).

Técnicas de espectrometria de massa podem fornecer ferramentas altamente valiosas para pesquisa clínica, podendo entregar biomarcadores clinicamente aplicáveis, um biomarcador é definido como “uma molécula detectada no corpo associados a um processo especial (normal ou anormal) (73).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições deste experimento e com base nos resultados obtidos pode-se considerar:

Sendo o primeiro estudo com o uso do BPF para lesão durais, este apresentou-se seguro para tecido cerebral, verificando sua biocompatibilidade apresentando-se bioinerte, além da confirmação de sua capacidade como arcabouço para CTMs.

Pela forte adesão no lugar de implantação somado à diminuição da sensibilidade dolorosa e a não presença da proteína *PENK* nos grupos tratados com BPF, pode-se acreditar eficiência do BPF na selagem para diminuição do extravasamento de LCR.

6. CONCLUSÕES

Nas análises do impacto dos tratamentos após lesões na dura-máter:

- ❖ A sobrevivência dos ratos e sua resposta clínica e neurológica, após lesão na dura-máter e implantação do BPF, CTMs e BPF+CTMs foi satisfatória.
- ❖ O BPF apresentou-se como bioinerte para as análises histológicas.
- ❖ Os grupos com presença de CTMs apresentaram bioatividade e presença de infiltrado celular e interface através da histopatologia.
- ❖ A associação de BPF + CTMs mostrou uma resposta exacerbada de inflamação glanulomatosa com presença de infiltrado celular, células gigantes, células epiteloideas e interface através de histopatologia.
- ❖ A associação do desconforto e aumento da sensibilidade dolorosa foi confirmada pela expressão da proencefalina *penk*.

Conclui-se portanto que o Biopolímero de Fibrina pode ser utilizado com segurança na reparação de lesões de dura mater, além de ser um excelente *scaffold* para células tronco.

7. REFERÊNCIAS

1. Kawai h, nakagawa i, nishimura f, motoyama y, park y, nakamura m, nakase h, suzuki s, ikada y. effectiveness of a new gelatin sealant system for dural closure. *neurological research* .2014 (36), 886-872.
2. Bosacco sj, gardner mj, guille jt. evaluation and treatment of dural tears in lumbar spine surgery: a review. *clin orthop relat res*, 2001,(389):238-47.
3. Montanari t; *histologia - texto, atlas e roteiro de aulas práticas - série graduação – 2006* (2), 155.
4. Esposito f, angileri ff, kruse p, cavallo lm, solari d, esposito v, francesco t, cappabianca p. fibrin sealants in dura sealing: a systematic literature review. *plos one*. 2016, 11(4).
5. Barros lc, ferreira rs, barraviera srcs, stolf ho, thomazini-santos ia, giannini m. a new fibrin sealant from *crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine. *j toxicol environ health b critrev*. 2009;12:553–71.
6. Leite c.v.s; naresse l.e; arantes h.j; lopes a.f; thomazini-santos i.a; giannini m.j.s; mercadante m.c; barraviera b; kobayasi s. an evaluation by rat colon anastomosis of the efficacy of fibrin glue derived from snake venom. *journal of venomous animals and toxins*. 2000, 6.
7. Giraldi, a. toxina como adesivo. *revista de pesquisa medica*, 2014.
8. ellis d.a., pelau sa e.d. fibrin glue in facial plastic and reconstructive surgery. *j. otholaryngol*. 1988, 17,74-7.
9. Gasparotto v, landim-alvarenga fc, oliveira alr, simões gf, lima-neto jf, barraviera b, ferreira junior, rs. a new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. *stem cell res ther*. 2014,5(3):78.
10. Sarugaser, r.; lickorish, d.; baksh, d.; hosseini, m.m.; davies, j.e. human umbilical cord perivascular (hucpv) cells: a source of mesenchymal progenitors. *stem cells*, 2005, (23) 220-229.
11. Caplan, a.i. new era of cell-based orthopedic therapies. *tissue engin.:* part b, 2009, (15),195-200.
12. Dominici m, blanc, mueller i, slaper-cortenbach i, marini f, krause d, deans r, keating a, prockopd, horwitz. minimal criteria for defining multipotente mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. *cytotherapy*. 2006, (8), 315 317.

13. Kawai h, nakagawa i, nishimura f, motoyama y, park y, nakamura m, nakase h, suzuki s, ikada y. effectiveness of a new gelatin sealant system for dural closure. *neurological research* .2014 (36), 886-872.
14. Da rosa f, pohl p, mader a, de paiva c, dos santos a, bianco b, rodrigues l. histological analysis of the repair of dural lesions with silicone mesh in rats subjected to experimental lesions, *einstein*. 2015, 13(4):567-73.
15. Bradford, m.m. rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *analytical biochemistry*, 1976, 72, 248-254.
16. Laemmli u. cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *nature*, 1970, 680-685.
17. Crudo c, erramouspe b, sueldo e, arias m. tinción de hierro medular. coloración de perls perls iron stain, *hematología*. 2016, (20), 2: 243 – 246.
18. Hea m, shia x, yanga m, yanga t, lia t, chenaj . mesenchymal stem cells-derived il-6 activates ampk/mtor signaling to inhibit the proliferation of reactive astrocytes induced by hypoxic-ischemic brain damage. *experimental neurology* . 2019, 15–32.
19. Zucconi e., vieira n.m, bueno d.f, secco m, jazedje t, ambrosio c.e, bueno m.p, miglino m, zatz m. mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein – a novel source for cell therapy studies. *stem cells and development*, 2009, 19, 395-402.
20. Lima s, wodewotzky t, lima-neto j, beltrão-braga p, alvarenga f. diferenciação in vitro de células-tronco mesenquimais da medula óssea de cães em precursores osteogênicos1. *pesq. vet. bras*. 2012, 32(5):463-469.
21. Patricio l, rebelatto c, brofman p, maciel b, beltrame o, brito h, locatelli-dittrich r. isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *3arq. bras. med. vet. zotec*. 2013, (4), 946-954, 2013.
22. Nardi, n.b; meirelles, l.s. isolation, in vitro expansion and characterization. *handbook of experimental pharmacology, mesenchymal stem cells* . 2006, (174), 249-282.
23. Sakas de, charnvises k, borges lf, zervas nt. biologically inert synthetic dural substitutes. appraisal of a medical-grade aliphatic polyurethane and a polysiloxane-carbonate block copolymer. *j. neurosurg*. 1990;73(6):936-41.

24. Kiyoshi i, tetsuyoshi h, kiyomitsu o, tetsuo n, kazuhiko h. comparative study of fibrin and chemical synthetic sealant on dural regeneration and brain damage. *j neurosurg spine* . 2013, 19:736–743.
25. Maurer p, mcdonald j. vicryl (polyglactin 910) mesh as a dural substitute, *neurosurg*. 1985, 63:448-452.
26. Haq i, cruz-almeida y, siqueira eb, norenberg m, green ba, levi ad. postoperative fibrosis after surgical treatment of the porcine spinal cord: a comparison of dural substitutes. invited submission from the joint section meeting on disorders of the spine and peripheral nerves, march 2004. *j neurosurg spine*. 2005;2(1):50-4.
27. Narotam p, josé s, nathoo n, taylon c, vora y. p63. collagen matrix (duragen) in spinal durotomy: technique appraisal and clinical results. *spine j*. 2003;3(5):147-8.
28. Barcelos fc, garcia meo, mendonça ab, oliveira rp. análise histopatológica das alterações medulares observadas na reparação da dura-máter com cola de fibrina em ratos wistar. *coluna/columna*. 2008, 7(4)309-314.
29. Ozisik p,t, soylemezoglu f, orhan h, ozgen t. comparative dural closure techniques: a safety study in rats. *surgical neurology* . 2006, (65) 42–47.
30. Bakar b, kose ea, balci m, ou pa, karat bs, alhan a, kilinc k, kil isk. evaluation of the neurotoxicity of the polyethylene glycol hydrogel dural sealant. *turkish neurosurgery*. 2013, 23, (1), 16-24.
31. Xu f, wang y ,sun s, ho a, lee d , kiang k, zhang x, lui w, liu b, wu w, leung g. comparison between self-assembling peptide nanofiber scaffold (sapns) and fi brin sealant in neurosurgical hemostasis. *clin trans sci* 2015, (8), 490–494.
32. Pereira k, lima v, conegero c, chopard r. histomorfometria das meninges encefálicas de ratos wistar em diferentes faixas etárias. *pesq. vet. bras*. 2010, (11):996-1002.
33. Rouxa a, mullera l, jacksona s, posta j, baldwina k, hoffere b, balaband c, barbaccic d, albert j, goutyb s,cox b, woods a. neurosciencemass spectrometry imaging of rat brain lipid profile changes overtime following traumatic brain injury. *journal of neuroscience methods*. 2016, 14.
34. Biscola np, cartarozzi lp, ulian-benitez s, barbizan r, castro mv, espejo ab, ferreira r, barraviera b, oliveira a. multiple uses of fibrin sealant for nervous system treatment following injury and disease. *j venom anim toxins incl trop dis*. 2017;23:13.

35. Wang jc, bohlman hh, riew kd. dural tears secondary to operations on the lumbar spine: management and results after a two-year-minimum follow-up of eighty-eight patients. *j bone joint surg.* 1998, (80)1728-1732.
36. Rosso f, marino g, giordano a, barbarisi m, parmeggiani d, barbarisi a: smart materials as scaffolds for tissue engineering [review]. *j cell physiol.* 2005, 203:465.
37. Mankad p.s., codisponi m. the role of fibrin sealants in hemostasis. *american journal of surgery.* 2001, 182, 21-18.
38. Carless pa, henry da, anthony dm. fibrin sealant use for minimising peri-operative allogeneic blood transfusion. *cochrane database syst rev.* 2003.
39. Gosk j., knakiewicz m., wiacek r., reichert p., the use of the fibrin glue in the periplievalneves reconstructions. *polim med.* 2006, 36, 11-15.
40. Farrag t. y., lehar m, verhaegen p., carson k.a., byrne p.j., effect of platelet rich plasma of fibrin sealant of facial nerve regeneration in a rat model. *laryngoscope.*2007, 117, 65-157.
41. Liborio neto, adail orrith. histologia do sistema nervoso: diversidade celular e suas localizações. *revista científica multidisciplinar núcleo do conhecimento.* 2017, (05), 74-93.
42. Silva, p. a. m.; vieira, w. h. b. variações do repertório cinético-postural e da tensão/desconforto corporal percebidos em um grupo de acadêmicos do curso de fisioterapia da ufrn. monografia de graduação em fisioterapia. natal. universidade federal do rio grande do norte. 2001.
43. Bernay b, gaillard m, guryča v, emadali a, kuhn l, bertrand a, detraz i, carcenac c, savasta m, brouillet e, garin j, elalouf j. discovering new bioactive neuropeptides in the striatum secretome using in vivo microdialysis and versatile proteomics. *molecular & cellular proteomics* 8.5. 2009 (8) 8:946 –958.
44. Packard, r. c., and ham, l. p. (1997). pathogenesis of posttraumatic headache and migraine: a common headache pathway? *headache j. head face pain .* 1997, (37) 142–152.
45. Farajdokht, f., babri, s., karimi, p., alipour, m. r., bughchechi, r., and mohaddes, g. chronic ghrelin treatment reduced photophobia and anxiety-like behaviors in nitroglycerin- induced migraine: role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *eur. j. neurosci.* 2017. 45, 763–772.

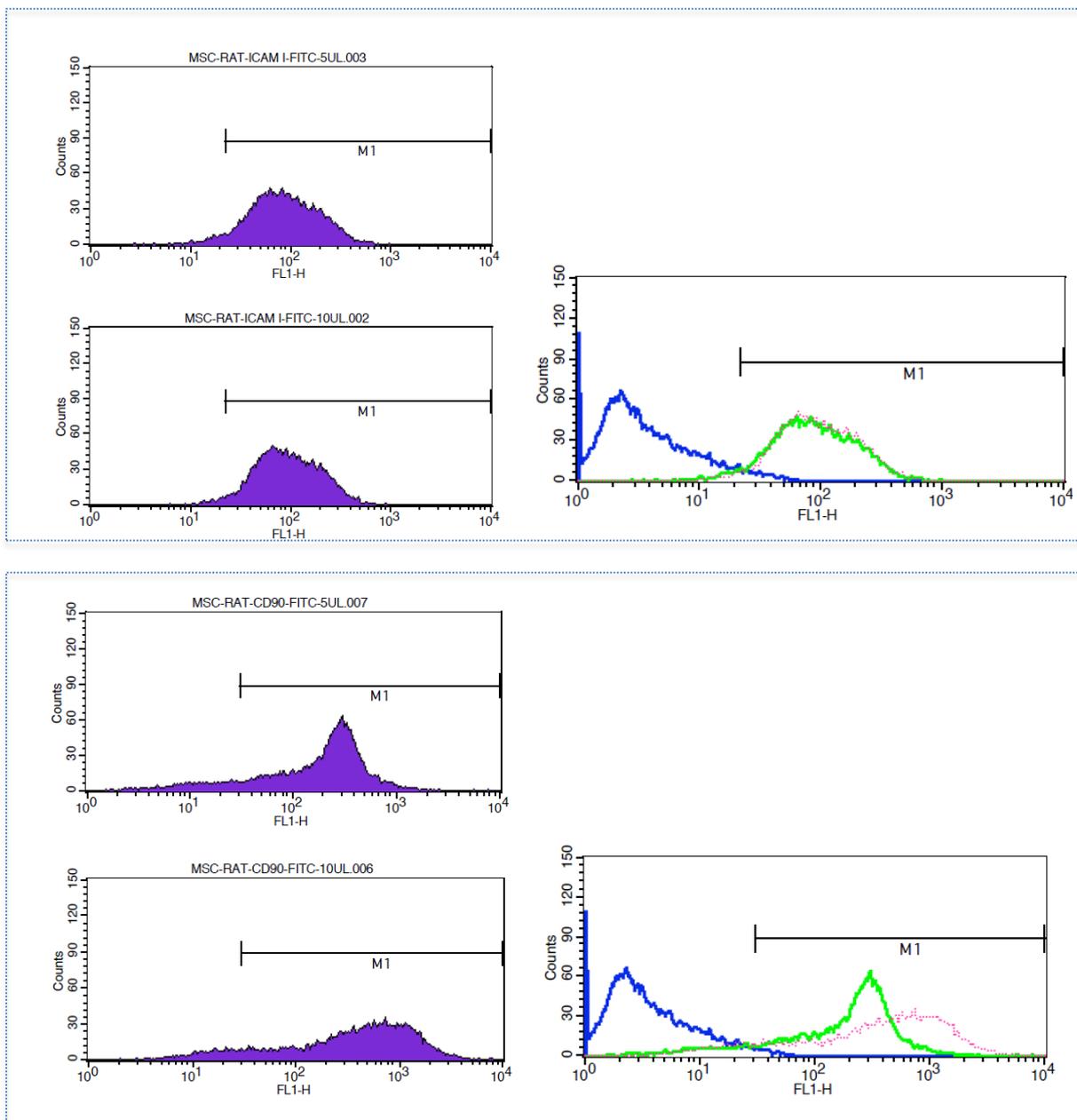
46. Van dongen, r. m., zielman, r., noga, m., dekkers, o. m., hankemeier, t., van den maagdenberg, a. m. migraine biomarkers in cerebrospinal fluid: a systematic review and meta-analysis. *cephalalgia*. 2017. 37, 49–63.
47. Carobrez a. transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade glutamatergic neurotransmission as molecular target in anxiety. *rev bras psiquiatr* 2003;25:52-8.
48. Schwartz, n., temkin, p., jurado, s., lim, b. k., heifets, b. d., polepalli, j. s. chronic pain. decreased motivation during chronic pain requires long-term depression in the nucleus accumbens. *science*. 2014, 345, 535–542.
49. Shaffrey ci, spotnitz wd, shaffrey me, jane ja: neurosurgical applications of fibrin glue: augmentation of dural closure in 134 patients. *neurosurgery*. 1990, 26:207–210.
50. Bernardo l, bernardo wm, shu ebs, da roz lm, de almeida cc, de monaco ba, figueiredo eg, sanders fh, neto hs, teixeira mj. does the use of duraseal in head and spinal surgeries reduce the risk of cerebrospinal fluid leaks and complications when compared to conventional methods of dura mater closure?. *rev assoc med bras*. 2012, 58(4):402-403.
51. Levy d, labastida-ramirez a, maassenvandenbrink a. current understanding of meningeal and cerebral vascular function underlying migraine headache, cephalalgia international headache society . 2018, 0(0) 1–17.
52. Roush, j. k. controle de infecção. in: harari, j. *cirurgia de pequenos animais*.: williams & wilkins. 1999, 43-53.
53. Silva, a. r. c. pontos (e cuidados) a ponderar. *cães & gatos*. 2000, (14), 31-34, 2000.
54. Kassam a, nemoto e , balzer j , rao g , welch wc , kuwabara h , boada f , horowitz m . effects of tisseel fi brin glue on the central nervous system of nonhuman primates . *ear, nose, throat j*. 2004, 83 : 246 – 248 , 250, 252.
55. Chen s, chang c, tsai s, chang, shih-jie. functional improvement of focal cerebral ischemia injury by subdural transplantation of induced pluripotent stem cells with fibrin glue. *stem cells and development*. 2010, (19).
56. Tomita t, hayashi n. new dried human amniotic membrane is useful as a substitute for dural repair after skull base surgery. *j neurol surg b*. 2012;1:302–7.
57. Preul mc, campbell pk, bichard wd, spetzler rf: application of a hydrogel sealant improves watertight closures of duraplasty onlay grafts in a canine craniotomy model. *j neurosurg* . 2007, 107: 642-650.

58. Bjugstad kb, lampe k, kern ds, mahoney m: biocompatibility of poly(ethylene glycol)-based hydrogels in the brain: an analysis of the glial response across space and time. *j biomed mater res a*. 2010, 95: 79-91.
59. Vu q, xie k, eckert m, zhao w, cramer s. meta-analysis of preclinical studies of mesenchymal stromal cells for ischemic stroke, *neurology*. 2014, 1277–1286.
60. Monteiroi b, neto n, del carlo r. mesenchymal stem cell, *ciência rural, santa maria*, online. 2009, 28.09.
61. Kerkis, i.; haddad, m.s.; valverde, c.w.; glosman, s. neural and mesenchymal stem cells in animal models of huntington’s disease: past experiences and future challenges. *stem cell res. ther*. 2015, 6, 232.
62. Sofroniew, m.v. molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *trends neurosci*. 2009, 32, 638–647.
63. Junqueira & carneiro, *histologia básica - texto & atlas*. 2013,(12), 150, 157-160.
64. Verkhratsky, a., sofroniew, m.v., messing, a., delanerolle, n.c., rempe, d., rodríguez, j.j., nedergaard, m. neurological diseases as primary gliopathies: a reassessment of neurocentrism. *asn neuro*, 2012,4.
65. Molina-ruiz a, requena l. foreign body granulomas. *dermatol clin*. 2015, 497–523.
66. Zhu, h., jiang, l., qiao, l.x., huang, l., zhu, l.h., zhang, z.h. observation on hippocampus proliferation following hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *j. southeast univ*. 2007, 26, 177–180.
67. Donnell d, phillip g, popovich. inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *experimental neurology*. 2008, 378-388.
68. Robbins & cotran. *patologia - bases patológicas das doenças*. 2015, 7ª edição.
69. Kumar v, abbas ak, aster jc. *inflammation and repair*. 2013.
70. Al-afif s, majernik g, hermann e, esmaeilzadeh m, hartmann c, krauss j. intracranial foreign material granulomas after cranial surgery, *acta neurochirurgica*. 2018, (160), 2069–2075.
71. Spejo a, chiarotto, ferreira2, gomes, ferreira jr, barraviera b, de oliveira a. neuroprotection and immunomodulation following intraspinal axotomy of motoneurons by treatment with adult mesenchymal stem cells. *journal of neuroinflammation* .2018, 15:230.

72. Shevchenko g, musunuri s, wetterhall m, bergquist j. comparison of extraction methods for the comprehensive analysis of mouse brain proteome using shotgun-based mass spectrometry. *j. proteome res.* 2012, 11, 2441–2451.
73. Frantzi m, bhat a, latosinska a. clinical proteomic biomarkers: relevant issues on study design & technical considerations in biomarker development. *clinical and translational medicine* 2014, 3:7.
74. Lavoie c, paiement j. topology of molecular machines of the endoplasmic reticulum: a compilation of proteomics and cytological data. *histochem cell biol.* 2008, 129(2):117–128.
75. Rohner tc, staab d, stoekli m. maldi mass spectrometric imaging of biological tissue sections. *mech ageing dev .* 2005, 126(1):177–185.

APÊNDICES

APÊNDICE I - Valor de interesse foi sempre o resultado de M1, representando o limite necessário para a expressão positiva. Azul controle, verde menor concentração e rosa maior concentração. Marcadores positivos: ICAM e CD90.



APÊNDICE II- Valor de interesse foi sempre o resultado de M1, representando o limite necessário para a expressão positiva. Azul controle, verde menor concentração e rosa maior concentração. Marcadores negativos: (a) CD34, CD45, CD11b. (b) População celular analisada.

