



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM MEDICAMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TRANSLACIONAL

RODRIGO BECCO DE SOUZA

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DE CRÂNIOS E
ENVOLTÓRIOS DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À CRANIECTOMIA E
APOSIÇÃO DE MATRIZ DÉRMICA ACELULAR DE PELE DE TILÁPIA

(*Oreochromis niloticus*) SOBRE A DURA-MÁTER

FORTALEZA

2025

RODRIGO BECCO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DE CRÂNIOS E
ENVOLTÓRIOS DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À CRANIECTOMIA E
APOSIÇÃO DE MATRIZ DÉRMICA ACELULAR DE PELE DE TILÁPIA
(*Oreochromis niloticus*) SOBRE A DURA-MÁTER**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Translacional. Área de concentração: Medicina regenerativa e biomateriais.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Koscky Paier.

Coorientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S235a Souza, Rodrigo Becco de.

Avaliação histológica e imuno-histoquímica de crânios e envoltórios de ratos Wistar submetidos à craniectomia e aposição de matriz dérmica acelular de pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) sobre a dura-máter / Rodrigo Becco de Souza. – 2025.

128 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Carlos Roberto Koscky Paier.

Coorientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

1. Dura-máter. 2. Biomaterial. 3. Tilápia do Nilo. 4. Materiais biocompatíveis. 5. Neurocirurgia. I.
Título.

CDD 610

RODRIGO BECCO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DE CRÂNIOS E
ENVOLTÓRIOS DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À CRANIECTOMIA E
APOsiÇÃO DE MATRIZ DÉRMICA ACELULAR DE PELE DE TILÁPIA**

(*Oreochromis niloticus*) SOBRE A DURA-MÁTER

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional, do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Translacional.

Área de concentração: Processos Biológicos e Tecnológicos Aplicados à Saúde.

Aprovada em 17 de outubro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Roberto Koscky Paier (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Eberval Gadelha Figueiredo
Universidade de São Paulo – USP

Prof. Dr. Eduardo Santamaria Carvalhal Ribas
Universidade de São Paulo – USP

Prof. Dr. Carlos Diógenes Pinheiro Neto
New York University – NYU

Prof. Dr. Paulo Ribeiro Nóbrega
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Bernardo Assumpção de Mônaco
West Virginia University – WVU

Dedicatória

Dedico esta pesquisa a todos que trabalham para melhorar algum aspecto da nossa complexa sociedade.

AGRADECIMENTOS

Esta tese é o desfecho de um trabalho desenvolvido no Núcleo de Pesquisa de Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Até chegar a essa instituição, concluí uma série de etapas que construíram minha forma de pensar e de entender a natureza e a sociedade. Devo agradecimentos a todas as pessoas e instituição que me ajudaram na construção de quem sou hoje.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais, que, com amor e paciência, incentivaram-me a sempre estudar, a desenvolver o pensamento crítico e deram-me exemplos diários de respeito às pessoas e à sociedade. Esses ensinamentos e sinais foram tão fortes que influenciaram todos os sete filhos desse resiliente casal. No meu caso, posso dizer que as orientações dos meus pais constituíram a “bússola” que orientou as incontáveis decisões na minha vida que me trouxeram até aqui e que continua a orientar dia após dia.

Os meus irmãos mais velhos (todos os seis, já que sou o mais novo de sete filhos: Assis Filho, Zélia, Andréa, Roberta, Eliseu e Álvaro) acabaram reproduzindo e, por muitas vezes, amplificando as orientações dos nossos pais no tempo e no espaço. Devo agradecimento a todos eles, pois a atitude e presença deles me permitiram o ajuste fino da referida “bússola” ao longo de tantos anos e por tantos lugares por onde passei. Agradeço ainda à minha esposa, Sarah, em quem reconheci esses mesmos valores familiares, e que, agora, ajuda-me a transmitir esses mesmos valores aos nossos filhos.

Reconheço ainda o papel de muitos professores desde a escola, quando fui apresentado às explicações tão fascinantes sobre a humanidade e a natureza, as quais reforçaram minha paixão pelo conhecimento. Durante a graduação em medicina, encontrei amigos, cito um, que hoje é professor, Adilson Costa para representá-los, e muitos professores cujas trajetórias como médicos pesquisadores eram tão inspiradoras quanto suas palavras, como o professor Antônio Carlos Seguro e a professora Lúcia da Conceição Andrade. Durante a residência em neurocirurgia, mantive alguma atenção voltada à pesquisa graças a colegas e professores igualmente entusiasmados com a beleza da neurocirurgia, como o professor Guilherme Brasileiro de Aguiar e o professor José Carlos Esteves Veiga e os brilhantes amigos Dr. Victor Rosseto e Dr. Ulisses Aguiar. Agradeço ao professor Fernando Campos Gomes Pinto, orientador do meu mestrado, bom ouvinte e conselheiro. Agradeço aos professores Carlos Roberto Korscky Paier, Edmar Macedo Maciel e Manoel Odorico de Moraes Filho por favorecerem e orientarem o desenvolvimento deste trabalho.

A admiração por todos esses professores ao longo da vida, e o reconhecimento do papel transformador que eles têm na vida de quem os rodeia fortaleceram minha vontade em também seguir pelo caminho acadêmico.

Quanto às instituições, de forma direta, devo agradecimentos à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por ter favorecido o convívio com profissionais tão brilhantes e apaixonados pela ciência. Devo ainda agradecimento à Santa Casa de São Paulo, onde fui orientado por assistentes altamente qualificados. Agradeço ao IAMSPE, onde concluí o mestrado em Ciências da Saúde. Por conta dessa forte relação com instituições e pessoas do Estado de São Paulo, devo também agradecimento ao povo deste estado, que financia todas essas instituições reconhecidas nacionalmente. Agradeço à UFC e, por conseguinte, ao povo cearense e a todo o povo brasileiro por financiar instituição tão importante para fomentar a assistência à saúde pública e a pesquisa científica de alto nível na nossa região.

RESUMO

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS CRÂNIOS E ENVOLTÓRIOS DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À CRANIECTOMIA E APLICAÇÃO DE MATRIZ DÉRMICA ACELULAR DERIVADA DE PELE DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) SOBRE A DURA-MÁTER

As matrizes comerciais para regeneração da dura-máter apresentam custos elevados, frequentemente excluindo populações de baixa renda dos seus benefícios. Para atender aos critérios de qualidade, novos biomateriais devem passar por testes que comprovem sua eficácia em diferentes aplicações clínico-cirúrgicas e apresentem uma relação custo-benefício favorável para os pacientes. O scaffold dérmico acelular derivado da pele da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) possui grande valor terapêutico, com aplicabilidade em diversas áreas da medicina regenerativa. Este estudo teve como objetivo avaliar os resultados histológicos da craniectomia em ratos Wistar utilizando o scaffold de pele de tilápia, em comparação com o Duragen®, uma matriz de regeneração dural comercializada pela Integra LifeSciences Corporation. Foi realizada craniectomia em 36 ratos Wistar para exposição do espaço epidural, seguida da implantação do scaffold derivado da pele de tilápia (grupo experimental) ou do Duragen® (grupo controle). Ambos os grupos também foram comparados a um grupo sham (controle negativo). Os animais foram observados quanto à capacidade de locomoção e cicatrização da ferida. Foram coletadas biópsias aos 15, 30 e 45 dias após a cirurgia para avaliação da inflamação, deposição de colágeno, presença de fibroblastos e miofibroblastos, neovascularização, e expressão de enolase neurônio-específica (NSE), MDM2 e alfa-actina do músculo liso (α -SMA). O processo inflamatório foi auto-limitado e semelhante entre os grupos. O scaffold de tilápia induziu a formação de tecido conjuntivo semelhante ao do Duragen® abaixo do defeito ósseo. A microscopia eletrônica de varredura revelou fibras de colágeno paralelas e menos poros no scaffold de tilápia em comparação ao Duragen®. Conclusão: o scaffold derivado da tilápia induziu um processo inflamatório auto-limitado e promoveu a formação de tecido conjuntivo consistente sob o defeito ósseo. A evolução clínica foi semelhante entre os grupos.

Palavras-chave: engenharia de tecidos; pele de tilápia; *Oreochromis niloticus*; scaffold; matriz extracelular acelular; biomaterial; duroplastia; dura-máter; inflamação; regeneração tecidual.

ABSTRACT

HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF SKULLS AND ENVELOPES OF WISTAR RATS SUBJECTED TO CRANIECTOMY AND APPLICATION OF AN ACCELLULAR DERMAL MATRIX DERIVED FROM TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) SKIN OVER THE DURA MATER

Commercial dural regeneration matrices present high costs, often excluding low-income populations from the benefits. To meet quality criteria, new biomaterials must undergo tests to prove their efficacy in different clinical-surgical applications and a favorable cost-benefit ratio for patients. Acellular dermal scaffold derived from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin has great therapeutic value, with applicability in various areas of regenerative medicine. This study aimed to evaluate the histological results of craniectomy in Wistar rats using tilapia skin scaffold compared to Duragen®, a dural regeneration matrix obtained from Integra LifeSciences Corporation. A craniectomy was performed in 36 Wistar rats to expose the epidural space, followed by implantation of the tilapia skin-derived scaffold (experimental group) or Duragen® (control group). Both groups were also compared to a sham group. Animals were observed for ambulatory capacity and wound healing. Biopsies were collected at 15, 30, and 45 days post-surgery to assess inflammation, collagen deposition, fibroblast and myofibroblast presence, neovascularization, and expression of neuron-specific enolase, MDM2, and alpha-smooth muscle actin. The inflammatory process was self-limiting and similar among groups. The tilapia scaffold induced the formation of a connective tissue similar to Duragen® below the bone defect. Scanning electron microscopy revealed parallel collagen fibers and fewer pores in the tilapia scaffold compared to Duragen®. In conclusion, the tilapia-derived scaffold induced a self-limiting inflammatory process and the formation of consistent connective tissue under the bone defect. Clinical evolution was similar between groups.

Keywords: tissue engineering; tilapia skin; *Oreochromis niloticus*; scaffold; acellular extracellular matrix; biomaterial; duraplasty, dura mater, inflammation, tissue regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização das meninges do sistema nervoso central (SNC).....	17
Figura 2 – Anatomia da dura-máter.....	20
Figura 3 – Histologia da dura-máter humana (A) e de rato (B).....	23
Figura 4 – Diversidade de fontes de biomateriais e tecidos para realização da duroplastia, divididas em tradicionais (autóloga, alogênica e xenogênica), poliméricas (sintéticos e naturais) e produtos compostos (polímeros com material sintético).	25
Figura 5 – Fases da cicatrização e tipos celulares envolvidos.....	27
Figura 6 – Organização das estruturas formadas pelo colágeno.....	30
Figura 7 – As proteínas FACIT: colágeno XII (a) e colágeno XIV (b).....	31
Figura 8 – Produção da matriz proteica acelular oriunda da pele de tilápia (<i>Orechromis niloticus</i>).....	40
Figura 9 – Neuroanatomia de ratos.....	47
Figura 10 – Etapas do procedimento cirúrgico em animais.....	48
Figura 11 – Médias marginais estimadas.....	56
Figura 12 – Gráfico em barras evidenciando a área de craniectomia dos animais tratados com o <i>scaffold</i> oriundo da pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (<i>sham</i>).....	57
Figura 13 – Espessura da falha óssea (µm) após submissão dos animais a craniectomia e tratamento com o <i>scaffold</i> oriundo da pele de Tilápia, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (controle negativo ou <i>sham</i>)	59
Figura 14 – Imagens utilizando a microscopia eletrônica de varredura, no aumento de 2500X, do <i>scaffold</i> oriundo da pele de tilápia (esquerda) e da matriz comercial Duragen® (direita) utilizados na craniectomia.....	60
Figura 15 – Análise das lâminas	61
Figura 16 – Amostras das lâminas de hematoxilina-eosina (HE) em aumento de 200x após a craniectomia e o tratamento com o <i>scaffold</i> oriundo da pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® (controle positivo) e sem nenhum tratamento (controle negativo).	64
Figura 17 – Perfil do colágeno total (vermelho), do tipo I (amarelo avermelhado) e do tipo III (verde esbranquiçado) em aumento de 200x após submissão a craniectomia e tratamento com o <i>scaffold</i> oriundo da pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (<i>sham</i>).	67

Figura 18 – Gráficos em barras evidenciando os valores de colágeno total, tipo I e tipo III quantificados em cada grupo (controle negativo, Duragen® e tilápia) aos 15 dias de tratamento (T1).....	70
Figura 19 – Gráficos em barras evidenciando os valores de colágeno total, tipo I e tipo III quantificados em cada grupo (controle negativo, Duragen® e tilápia) aos 30 dias de tratamento (T2).....	71
Figura 20 – Gráficos em barras evidenciando os valores de colágeno total (A), tipo I (B) e tipo III (C) quantificados em cada grupo (controle negativo, Duragen® e tilápia) aos 45 dias de tratamento (T3).....	72
Figura 21 – Análise de miofibroblastos utilizando a marcação imuno-histoquímica de MDM2, no aumento de 400X, após submissão dos animais à craniectomia e tratamento com o <i>scaffold</i> oriundo da pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (<i>sham</i>).....	75
Figura 22 – Análise de miofibroblastos com marcação imuno-histoquímica de MDM2 no aumento de 400x.....	76
Figura 23 – Análise de miofibroblastos utilizando a marcação imuno-histoquímica de alfa-actina de músculo liso, no aumento de 400x, após a craniectomia e o tratamento com o <i>scaffold</i> de pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (<i>sham</i>).....	78
Figura 24 – Análise de miofibroblastos utilizando a marcação imuno-histoquímica de alfa-actina de músculo liso, no aumento de 400x, após submissão dos animais à craniectomia e tratamento com o <i>scaffold</i> de pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (<i>sham</i>).....	80
Figura 25 – Gráfico em barras mostrando a contagem de vasos com marcação de alfa-actina de músculo liso (eixo Y) dos grupos <i>scaffold</i> de tilápia, Duragen® e controle negativo, aos 15, 30 e 45 dias após a craniectomia (eixo X).....	81
Figura 26 – Desenho de um crânio de coelho ilustrando o corte e a extensão da calvariectomia circular.....	98
Figura 27 – Desenho de um modelo animal mostrando periósteo infantil no lado de controle e periósteo adulto no lado experimental.....	99
Figura 28 – Imagem superior evidenciando um defeito ósseo (no caso, a sutura frontal em modelo murino, descrita como frontal posterior); imagem do meio evidenciando a liberação de elementos celulares e humorais pela dura-máter; imagem inferior evidenciando a falha óssea fechada por trabeculado ósseo.....	102

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação dos diversos tipos de substitutos durais e exemplos de materiais empregados em sua composição.....	34
Quadro 2 – Resumo dos testes utilizados para análise dos resultados.....	54
Quadro 3 – Resumo com as principais características histológicas.....	66
Quadro 4 – Estudos experimentais de substitutos durais em modelos animais.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparações múltiplas de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner.....	55
Tabela 2 – Área de craniectomia, aferida por paquímetro, nos grupos tratados com o <i>scaffold</i> oriundo da pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (controle negativo ou <i>sham</i>), sacrificados em 15, 30 e 45 dias após o procedimento cirúrgico.....	57
Tabela 3 – Espessura da falha óssea (μm) após submissão dos animais a craniectomia e tratamento com o <i>scaffold</i> oriundo da pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (controle negativo ou <i>sham</i>).	58
Tabela 4 – Análise do processo inflamatório das amostras das lâminas de hematoxilina-eosina (HE) em aumento de 200x após a craniectomia e o tratamento com o <i>scaffold</i> oriundo da pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (<i>sham</i>).	73
Tabela 5 – Análise de miofibroblastos utilizando a marcação imuno-histoquímica MDM2 no aumento de 400x, após a craniectomia e o tratamento com o <i>scaffold</i> oriundo da pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (<i>sham</i>).	74
Tabela 6 – Análise de miofibroblastos utilizando a marcação imuno-histoquímica de alfa-actina de músculo liso, no aumento de 400x, após submissão dos animais à craniectomia e tratamento com o <i>scaffold</i> de pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (<i>sham</i>).	79
Tabela 7 – Análise de neovasos utilizando a marcação imuno-histoquímica de alfa-actina de músculo liso, no aumento de 200x, após submissão dos animais à craniectomia e tratamento com o <i>scaffold</i> oriundo da pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (<i>sham</i>).	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Antes de Cristo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COL	Domínio colágeno
DAB	Diaminobenzidina
DC	Depois de Cristo
FACIT	Fibril-associated collagens with interrupted triple helices
FDA	Food and Drug Administration
FL	Fístula liquórica
FO	Ferida operatória
HE	Hematoxilina-eosina
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IHO	Imuno-histoquímica
IL	Interleucinas
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMP	Metaloproteinase
NC	Domínio não colágeno
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
ORC	celulose oxidada regenerada
PCL	Policaprolactona
PDS	Poli-p-dioxonona
PGA	Ácido poliglicólico
PIC	Pressão intracraniana
PLLA	Poli-L-ácido-lático
RNA	Ácido ribonucleico
RNM	Ressonância nuclear magnética

SNC	Sistema nervoso central
TC	Tomografia computadorizada
TGF	Fator de crescimento transformador
TNF	Fator de necrose tumoral
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

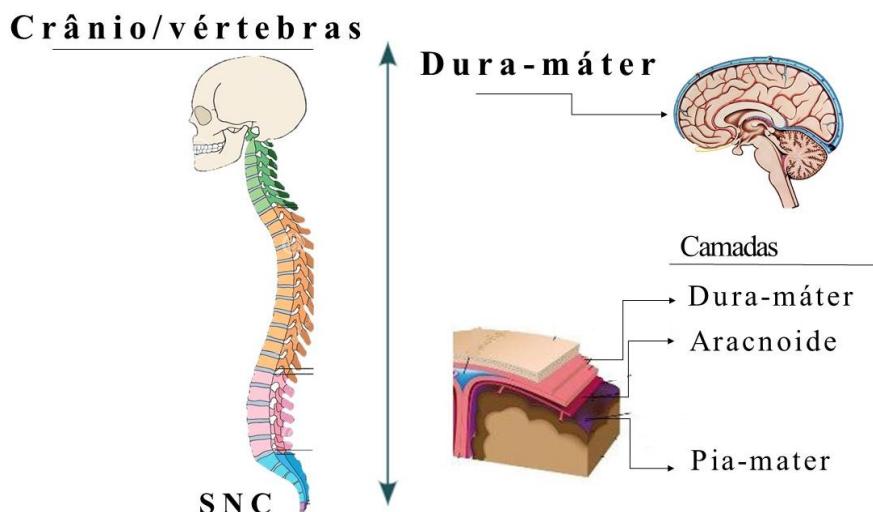
1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	As meninges: dura-máter, aracnoide e pia-máter	19
2.2	Dura-máter em humanos	19
2.2.1	<i>Embriologia</i>	19
2.2.2	<i>Anatomia</i>	19
2.2.3	<i>Vascularização</i>	20
2.2.4	<i>Inervação</i>	20
2.2.5	<i>Histologia</i>	21
2.3	Dura-máter em animais	21
2.4	Lesões da dura-máter: etiologia, patologia e epidemiologia	24
2.5	Reparo cirúrgico da dura-máter	24
2.6	Inflamação e reparo de tecidos	26
2.6.1	<i>Processo inflamatório</i>	26
2.6.2	<i>Reparo tecidual e cicatrização</i>	26
2.6.3	<i>Aspectos específicos da inflamação e do reparo da dura-máter</i>	28
2.7	Biomateriais sintéticos e biológicos utilizados em medicina regenerativa	32
2.7.1	<i>Biomateriais de origem sintética</i>	35
2.7.2	<i>Biomateriais de origem biológica</i>	35
2.8	Colágeno: estrutura e função	
2.8.1	<i>Estrutura do colágeno.....</i>	36
2.9	A pele de tilápia: matéria-prima para biomateriais empregados em medicina regenerativa	37
3	OBJETIVOS	43
3.1	Objetivos específicos	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	Preparo dos scaffolds da pele de tilápia	45
4.2	Análise de efetividade do enxerto tecidual (<i>scaffold</i>) de pele de tilápia em modelos cirúrgicos de craniectomia da dura-máter	45
4.2.1	<i>Animais e grupos experimentais</i>	45
4.2.2	<i>Procedimento cirúrgico</i>	46
4.2.2.1	<i>Monitoramento pós-cirúrgico e avaliação macroscópica</i>	49

4.2.2.2	<i>Avaliação estrutural</i>	49
4.2.2.3	<i>Hematoxilina-eosina</i>	50
4.2.2.4	<i>Imuno-histoquímica</i>	51
4.2.2.5	<i>Picosirius red</i>	52
4.2.2.6	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	53
4.3	Análise estatística	53
5	RESULTADOS	55
5.1	Variação do peso	55
5.2	Área da craniectomia	56
5.3	Espessura da falha óssea (µm)	57
5.3.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	62
5.3.2	<i>Enolase neuroespecífica</i>	62
5.4	Análise histológica pela coloração de hematoxilina-eosina (HE)	62
5.4.1	<i>Scaffold de tilápia</i>	68
5.4.2	<i>Scaffold Duragen®</i>	65
5.4.3	<i>Grupo de controle negativo</i>	66
5.5	Análise histológica pela coloração de picosirius red	67
5.6	Análise do processo inflamatório	72
5.8	Análise imuno-histoquímica	74
5.8.1	<i>Marcador de MDM2 em miofibroblastos</i>	74
5.8.2	<i>Miofibroblastos marcados com alfa-actina de músculo liso</i>	77
5.8.3	<i>Contagem de neovasos marcados com alfa-actina de músculo liso</i>	80
6	DISCUSSÃO	83
6.1	Biocompatibilidade e estudos experimentais	87
6.2	Peso	97
6.3	Área de craniectomia	98
6.4	Fechamento da craniectomia	100
6.5	Microscopia eletrônica	107
6.6	Colágeno	
6.7	Processo inflamatório	110
6.8	Marcadores imuno-histoquímicos	108
7	CONCLUSÃO	113
	REFERÊNCIAS	115

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso central (SNC) é envolvido por três meninges (membranas protetoras): pia-máter, aracnoide e dura-máter (Figura 1) (ADEEB *et al.*, 2012). A pia-máter (membrana mais interna) tem íntimo contato com o tecido nervoso, adentrando sulcos e fissuras, e é seguida pela aracnoide (membrana mais fina, localizada entre as outras duas). Entre essas duas membranas circula o líquido cefalorraquidiano (LCR), no espaço subaracnoide, cuja função é a defesa contra choques mecânicos e agentes infecciosos, além do auxílio na remoção de resíduos e na circulação de nutrientes (ADEEB *et al.*, 2012). Já a membrana dura-máter é mais espessa e externa e, consequentemente, pode ser danificada por trauma, cirurgia ou infiltração tumoral.

Figura 1 – Organização das meninges do sistema nervoso central (SNC).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Quando necessária, a restauração da dura-máter é fundamental para evitar complicações, como fistula liquórica, infecções, pneumoencéfalo e pseudomeningocele. A fistula liquórica é uma complicaçāo cujo risco precisa ser reduzido por técnicas e materiais disponíveis para a equipe médica, pois, além de elevar o custo e o tempo de internação (PIEK *et al.*, 2012; WEBER; PIEK; GUNAWAN, 2015), está associada à maior morbimortalidade. Muito comumente, essa restauração envolve o uso de tecidos autólogos, tais quais pericrānio, gálea e fáscias musculares (BIROLI *et al.*, 2008; OTTO *et al.*, 2013; SNYDERMAN *et al.*, 2007).

A busca por biomateriais que sirvam como substitutos durais para correção da perda de continuidade meníngea tem sido tema de diversos estudos (BARBOLT *et al.*, 2001;

BERMUELLER *et al.*, 2013; BIROLI *et al.*, 2008; RABINOWITZ *et al.*, 2005; ZERRIS *et al.*, 2007). Alguns critérios já foram enunciados para tentar definir um substituto dural ideal: assemelhar-se à dura-máter humana em espessura, flexibilidade e resistência; ser inerte; ter superfície interna lisa, de forma que propicie a proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno; ser de fácil obtenção e de baixo custo; ter possibilidade de esterilização e facilidade de manipulação técnica (KHURANA *et al.*, 2024; NEULEN *et al.*, 2011). Nesse contexto, a razão de se utilizar tecido oriundo da pele de tilápia está em seu grande conteúdo de colágeno, muito similar ao colágeno de mamíferos, além do menor risco de transmissão de zoonoses. Além disso, não há restrições religiosas associadas ao uso da pele de peixes, como é o caso de derivados bovinos e suínos em algumas regiões do mundo (BERMUELLER *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2017).

Uma tarefa árdua para os desenvolvedores de coberturas biológicas cicatrizantes é encontrar ativos que atendam à demanda do mercado consumidor. Em vista disso, optou-se por desenvolver alternativas aos biomateriais ricos em colágeno bovino, como os dispositivos de colágeno da pele da Tilápia-do-Nilo (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2017, 2019). A matriz proteica acelular (*scaffold*) oriunda da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), desenvolvida pelos pesquisadores do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), apresentou biocompatibilidade, segurança e eficácia em testes pré-clínicos *in vivo* (MARTINS, 2023; SILVA, 2023). O termo *scaffold* é utilizado para identificar biopolímeros cuja função é servir de arcabouço para formação tecidual no organismo. O *scaffold* acelular de pele de tilápia possui grande quantidade de colágeno tipo I e é produzido com uma excelente relação de custo-benefício, em parte devida à alta disponibilidade da matéria-prima (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2017, 2019). Por todas essas razões, decidiu-se realizar o estudo experimental em ratos com a matriz descelularizada derivada de pele de tilápia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 As meninges: dura-máter, aracnoide e pia-máter

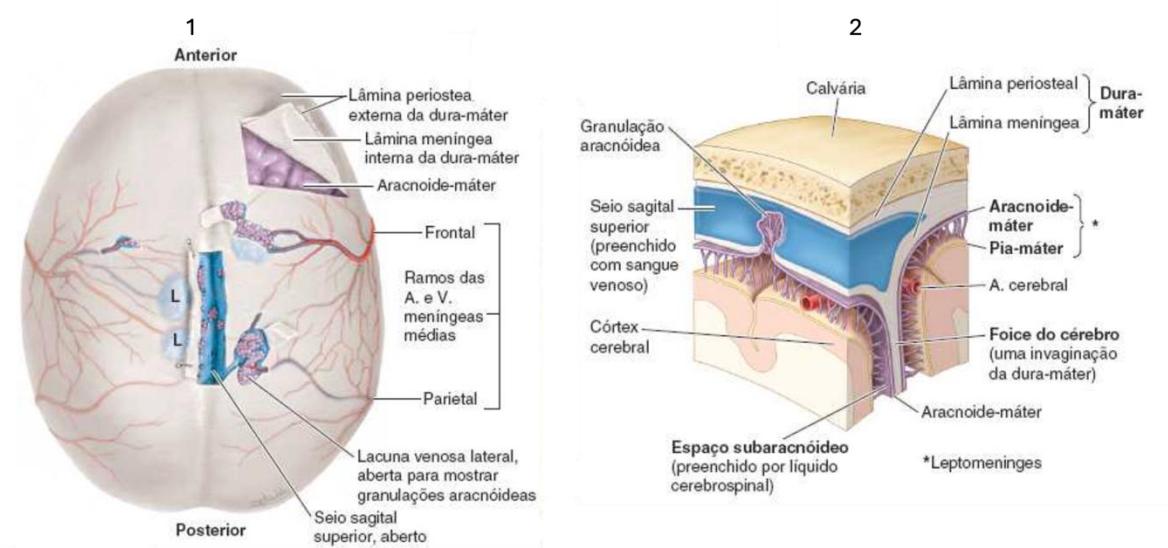
Meninges, singular *meninx*, é um termo grego que significa membrana e foi primeiramente usado por Erasistratus no século III antes de Cristo (AC), para descrever a membrana que recobre o sistema nervoso central (ADEEB *et al.*, 2012). No século II depois de Cristo (DC), Galeno detalhou duas camadas, chamadas *pacheia* e *lepte*. Estas foram posteriormente observadas e traduzidas para o árabe como *umm al-dimagh* (mãe do cérebro), que foi subdividida por Hali Abbas em *umm al-ghalida* (mãe dura) e *umm al-raqiqar* (mãe fina). Esses termos foram traduzidos literalmente para o latim no século XII pelo monge Stephen de Antioch como *dura mater* e *pia mater*. O termo *pia*, aparentemente inadequado (poderia ser *tenuis*), permaneceu. Já o termo aracnoide máter, a membrana existente entre a dura-máter e a pia-máter, foi introduzido por Herophilus no século III AC, que também descreveu sua relação com os ventrículos encefálicos. O termo *mater* deriva de mãe (ADEEB *et al.*, 2012). A dura-máter tem um papel importante de barreira contra traumas mecânicos e infecção, assim como outras funções mais complexas (KINACI *et al.*, 2020).

2.2 Dura-máter em humanos

2.2.1 Anatomia

As meninges consistem em três camadas: dura, aracnoide e pia-máter (Figura 2). A primeira é mais superficial e é composta de três camadas: periosteal (endosteal), meníngea e a de células limitantes (ADEEB *et al.*, 2012). A camada periosteal é bem aderida ao crânio, e, com o aumento da idade, a dura torna-se mais espessa e mais aderida, também à calvária, exceto nas áreas de seio venoso e nos sítios de reflexão dural. As reflexões ou invaginações durais são quatro estruturas com camada dupla de dura-máter: foice do cérebro, tenda do cerebelo, foice do cerebelo e diafragma da sela, enquanto os seios venosos são canais pelos quais o sangue corre, entre as camadas durais endosteal e meníngea. Dentro dos seios e em estruturas venosas (lagos venosos ou de Trolard) formam-se as granulações aracnóideas esféricas ou ovoides, responsáveis por boa parte da absorção do líquido cefalorraquidiano (LCR) circulante no espaço subaracnóideo (ADEEB *et al.*, 2012).

Figura 2 – Anatomia da dura-máter.



Fonte: Moore, Anatomia Orientada para a Clínica (2018).

Legenda: (1) Desenho destacando a dura máter, como envoltório do encéfalo, com vascularização (artéria e veia meníngicas médias), particularidade do seio sagital superior, e secção da dura máter demonstrando a camada periosteal e a camada meníngea. (2) Desenho amplificando a particularidade do seio sagital superior cujas paredes são as lâminas periosteal e meníngea da dura máter, as membranas aracnóide e pia máter.

2.2.2 *Vascularização*

O principal suprimento vascular da dura máter localiza-se na sua camada externa (perioesteal), cujas artérias são derivadas da artéria carótida interna, etmoidal, maxilar, faríngea ascendente, lacrimal, occipital e vertebrais (ADEEB *et al.*, 2012).

2.2.3 *Inervação*

A inervação da dura-máter da fossa posterior e do clivo é feita por ramos dorsais dos três primeiros nervos cervicais, que entram pelo forâmen magno. Já a dura máter occipital, da foice cerebelar, dos seios sigmoide e transverso e do forâmen magno são inervadas por nervos derivados dos ramos ventrais dos dois primeiros nervos cervicais, que entram pelo forâmen jugular ou hipoglosso. É importante salientar também o papel dos nervos trigêmeo e vago na inervação dessas áreas. A inervação da dura supratentorial é derivada principalmente dos nervos etmoidais anterior e posterior e das divisões maxilares e mandibulares do nervo trigêmeo. A foice cerebral e a tenda do cerebelo são inervadas principalmente pela divisão oftálmica do nervo trigêmeo (ADEEB *et al.*, 2012).

2.2.4 Histologia

A camada mais externa da dura é composta de células alongadas e achatadas que estão em um eixo paralelo ao parênquima neural subjacente. Essas células têm um processo de ramificação que as mantém em contato com outras células vizinhas, e a maioria delas tem as mesmas características dos fibroblastos, com núcleo alongado e grau variável de formação fibrilar. Também têm sido reconhecidas células alongadas com núcleo oval, com mais organelas e sem formação fibrilar, que repousam entre uma grande quantidade de colágeno fibrilar extracelular, misturado com uma menor quantidade de microfibrilas e fibras elásticas. A abundância de matriz extracelular (MEC) é responsável pela força da camada mais externa da dura, onde algum osteócito, fibra nervosa e vasos sanguíneos também têm sido encontrados (ADEEB *et al.*, 2012).

Em contraste, a camada meníngea da dura contém mais fibroblastos e menos matriz extracelular, o que a torna mais flexível. A camada mais interna, camada celular da borda dural, consiste em uma ou mais camadas de células achatadas, conectadasumas às outras por aderências maculares (desmossomos), com matriz extracelular preenchida por material não filamentar amorfo, sem colágeno (ADEEB *et al.*, 2012).

A camada periosteal da sela e dos seios cavernosos tem 0,4 mm de espessura, enquanto a camada meníngea tem 4 mm, comparada com 1 mm da dura adjacente (ADEEB *et al.*, 2012). A organização histológica da dura-máter humana pode ser visualizada na Figura 2.

2.3 Dura-máter em animais

A biocompatibilidade, a biodegradação, a viabilidade e a eficácia dos dispositivos médicos, como selantes e substitutos durais, devem ser sempre avaliadas, primeiramente, em modelos *in vitro* e em animais. Apesar de haver características histológicas diferentes entre as membranas de dura-máter de diferentes espécies, por exemplo, espessura, composição e orientação dos fibroblastos, os resultados em animais permitem avaliar o processo inflamatório da dura na presença da matriz descelularizada, assim como a incorporação e a proliferação de fibroblastos no dispositivo exógeno (Figura 3).

A dura-máter humana possui três camadas celulares, conforme informado anteriormente, e uma espessura média de 564 µm (ORTOLANI *et al.*, 2015; ADEEB *et al.*, 2012). A dura humana é a membrana mais espessa entre diversas espécies estudadas, seguida das membranas de outras espécies:

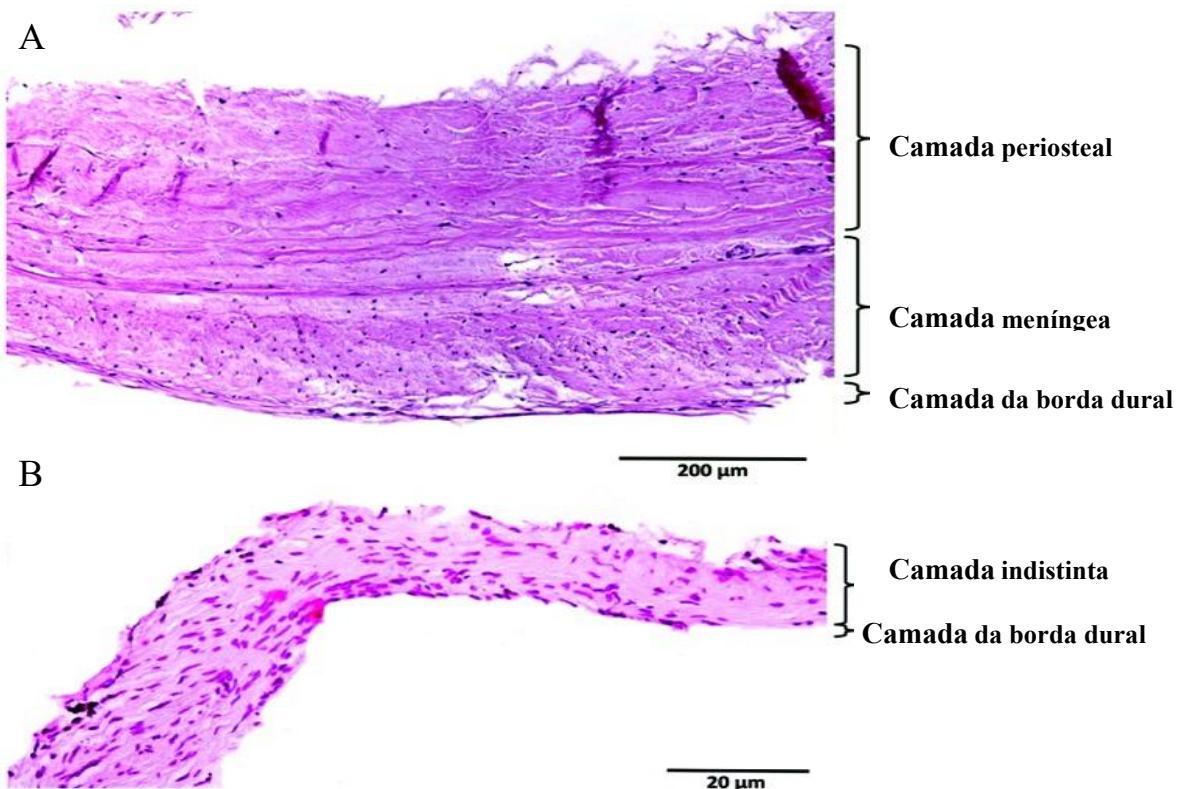
- a) Com três camadas (periosteal, meníngea, camada celular da borda dural): bovinos (311 µm), porcinos (304 µm), caninos (233 µm), felinos (201µm), leporinos (99 µm) e coelhos (99 µm);
- b) Com duas camadas (fibrovascular ou perioesteal e mesotelial ou camada dural limitante): equinos (313 µm), caprinos (284 µm), ovinos (234 µm) e ratos (49 µm).

As semelhanças morfológicas entre as membranas do rato e do homem sugerem similaridades fisiopatológicas, que tornam o referido modelo animal adequado para o estudo da duroplastia com matriz descelularizada de tilápia. Consequentemente, acredita-se que a resposta tecidual ao experimento em ratos se aproxima da possível resposta no ser humano.

No entanto, apesar da diferença entre as espessuras e organização das camadas da dura-máter entre as espécies, existem diversos fatores gerais e específicos semelhantes entre elas. Dentre as características gerais estão o papel de barreira mecânica da dura-máter e sua posição entre o encéfalo e a calota craniana. Entre as características específicas estão a sua composição, principalmente por colágeno e fibroblastos, a presença de vasos sanguíneos na camada fibrovascular e a presença da camada mesotelial (camada de células da borda dural), que, em todas as espécies, possui alta densidade de células em relação ao menor conteúdo de matriz extracelular.

A literatura não dispõe de um modelo *in vivo* ideal para a pesquisa de novos selantes e substitutos durais após durotomia em humanos. Animais de médio porte (cães e porcos) apresentam resultados confiáveis, tendo em vista a anatomia mais propícia a uma técnica cirúrgica similar à utilizada em humanos. Todavia, o uso de animais menores (ratos) é viável, uma vez que são organismos modelo para estudo da biologia humana, e as pesquisas baseiam-se nas semelhanças genéticas e fisiológicas entre as espécies. Os ratos são bons modelos para experimentos que envolvem estudos sistêmicos ou análise de múltiplos tecidos e órgãos, o que é facilmente viabilizado em razão do menor porte desses animais (GREENHALGH, 2005; KARKUCAK *et al.*, 2021; JANOWSKI, 2016).

Figura 3 – Histologia da dura-máter humana (A) e de rato (B).



Fonte: Adaptado de KINACI *et al.* (2020, p. 172-173).

Nota: Imagens obtidas de microscopia: acima, dura-máter humana evidenciando 3 camadas (camada perioestea, camada meníngea camada da borda dural) (A); abaixo, dura-máter de rato composta por duas camadas (camada indistinta e camada da borda dural) (B). Há diferenças quanto a espessura, número de camadas e orientação dos fibroblastos (paralela na humana e casual na do rato).

2.4 Lesões da dura-máter: etiologia, patologia e epidemiologia

O comprometimento da dura-máter pode ocorrer por causas traumáticas, infiltrações tumorais, hipertensão intracraniana ou intervenção cirúrgica no encéfalo. Esse comprometimento pode resultar em fistula liquórica, que, se não tratada em até 7 dias após um trauma cranioencefálico, apresenta 23% de risco de meningite, comparado com 3% de risco em casos de correção da fistula antes de 7 dias (BRODIE, 1997). Outras consequências danosas da descontinuidade meníngea são as herniações cerebrais e aderências corticomeníngicas, que podem originar focos epilépticos.

A presença de fistulas liquóricas em contato com cavidades contaminadas (por exemplo, cavidade nasal) predispõe ao desenvolvimento de infecções. Logo, é necessário que pacientes com meninges comprometidas sejam operados dentro do período ideal (3 a 7 dias) desde o seu diagnóstico, pois as complicações por infecção não são incomuns no ambiente intra-hospitalar (CHUAN *et al.*, 2020).

2.5 Reparo cirúrgico da dura-máter

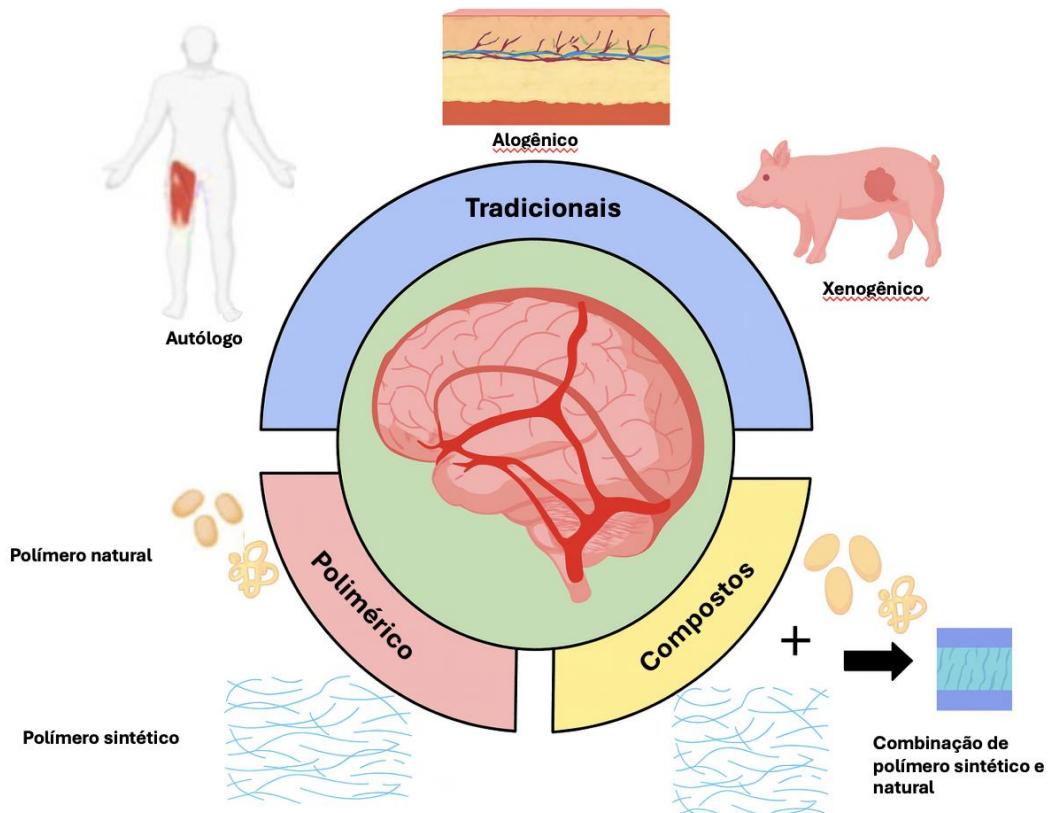
O reparo cirúrgico da dura-máter é previsto em grande parte das abordagens neurocirúrgicas. Muito comumente, utilizam-se tecidos autólogos, como gálea, pericrânio e fáscias de músculos (músculo temporal ou tensor da fáscia lata são frequentemente utilizados). Quando se realizam abordagens endonasais, o reparo é feito sem sutura do material que cobre a falha dural, porém usam-se várias camadas nesse tipo de fechamento: retalho nasosseptal, enxerto de gordura, enxerto de fáscia muscular e substituto dural (PINHEIRO-NETO, 2012; OTTO *et al.*, 2013; PREVEDELLO, 2007; KASSAM, 2011).

O reparo cirúrgico da dura-máter em neurocirurgias convencionais abertas permite que a correção da dura-máter seja realizada com sutura do enxerto utilizado, de forma que o fechamento se torne imediatamente hermético. Gálea e pericrânio são as fontes preferidas para realizar essa correção, por razões muito claras: são autólogos, estão presentes no próprio sítio cirúrgico, podem ser removidos facilmente já no acesso cirúrgico e têm excelente resultado funcional (BERJANO; VINAS; DUJOVNY, 1999).

Entretanto, nem sempre há disponibilidade de material autólogo, como retalho nasosseptal, gálea e pericrânio, para realizar o fechamento da dura-máter. Isso se torna especialmente fácil de observar nos casos de reoperação, em que esses tecidos já foram utilizados na primeira abordagem. Outras situações são a presença de grande

comprometimento dural, por exemplo, tumores infiltrativos da dura-máter, lesões traumáticas com dano ou contaminação tecidual importantes e deformações extensas de base de crânio. Nesses casos, o neurocirurgião precisa ter acesso a biomateriais que tenham estrutura capaz de vedar a passagem de fluidos e tecidos entre os espaços intradural e epidural (BERJANO; VINAS; DUJOVNY, 1999). A Figura 4 resume as origens dos biomateriais comumente utilizados em duroplastias.

Figura 4 – Diversidade de fontes de biomateriais e tecidos para realização da duroplastia, divididas em tradicionais (autólogo, alogênico e xenogênico), poliméricas (sintéticos e naturais) e produtos compostos (polímeros com material sintético).



Fonte: Adaptado de KHURANA *et al.* (2024).

Nota: Ilustração exemplificando tipos de enxertos utilizados em duroplastia, os quais são subdivididos em tradicionais (autólogo, alogênico e xenogênico), poliméricos (polímeros naturais e sintéticos) e polímeros compostos (combinação de polímeros naturais e sintéticos).

2.6 Inflamação e reparo de tecidos

2.6.1 Resposta imune e processo inflamatório

A resposta inflamatória possui três fases principais: a aguda, a subaguda e a crônica. Cada uma delas tem características específicas e envolve diferentes tipos de células e mediadores químicos da inflamação. A resposta imune é composta por dois tipos de respostas: a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do organismo contra agentes invasores, por exemplo, bactérias, vírus e fungos. É mediada por células fagocitárias, como os macrófagos e neutrófilos, capazes de englobar e destruir os agentes invasores. Além disso, envolve a liberação de substâncias químicas, como as citocinas, prostaglandinas, leucotrienos, aminas biogênicas e espécies reativas de oxigênio (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

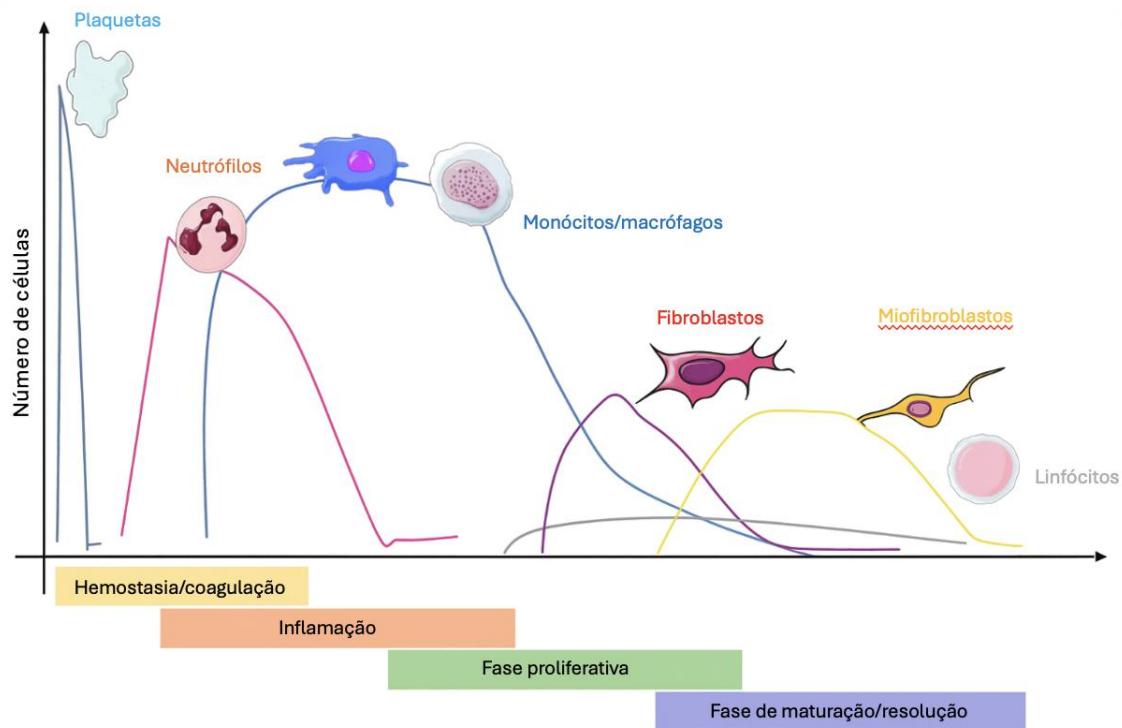
A resposta imune adaptativa é um tipo de resposta do sistema imunológico que ocorre após a exposição a um antígeno específico. Essa resposta é mediada por células e moléculas específicas, produzidas pela própria resposta imune. As células envolvidas incluem linfócitos T e B, que reconhecem e se ligam a um antígeno específico. Os linfócitos T auxiliares (Th CD4+) ajudam a coordenar e ativar outras células do sistema imunológico, enquanto os linfócitos B produzem anticorpos (imunoglobulinas) específicos para reconhecimento e ligação ao antígeno. Os linfócitos T assassinos (Tk CD8+) atuam principalmente no reconhecimento e ataque específico a células estranhas ao organismo, ou infectadas por agentes estranhos (bactérias, vírus), e na produção de fatores citotóxicos diretamente contra esses抗ígenos. Cada um desses tipos celulares possui subpopulações com funções ainda mais especializadas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

2.6.2 Reparo tecidual e cicatrização

Após o dano tecidual, ocorre um evento com várias etapas sobrepostas à resposta inflamatória, chamado de cicatrização (GUILLAMAT-PRATS, 2021). O processo cicatricial de feridas é dinâmico, altamente controlado e coordenado, em que estão envolvidas muitas estruturas e muitos tipos celulares (Figura 5). Para o reparo tecidual ser efetivo, é necessária uma alteração da actina do citoesqueleto das células envolvidas, que também devem secretar proteínas da matriz extracelular, como os receptores de integrinas (MIDWOOD; WILLIAMS; SCHWARZBAUER, 2004). O processo de cicatrização (figura 5) engloba as fases de

hemostasia e coagulação; de inflamação e recrutamento celular; de proliferação; e, por fim, de maturação (GUILLAMAT-PRATS, 2021).

Figura 5 – Fases da cicatrização e tipos celulares envolvidos.



Fonte: Adaptado de Guillamat-Prats (2021, p. 2).

Nota: Gráfico esquematizando a quantidade de cada tipo celular (eixo Y) e a fase da cicatrização (eixo X). Eixo Y: ratio of number of cells, proporção do número de células; eixo Y: fases da cicatrização na seguinte ordem cronológica: homeostase/coagulação, inflamação, fase proliferativa, fase de resolução/maturação.

Na primeira etapa, uma matriz provisória é formada por fibrina e fibronectina, desencadeando a ativação das plaquetas e da cascata de coagulação para constituir o trombo ou coágulo no local da ferida (CALEY; MARTINS; O'TOOLE, 2015; KIM *et al.*, 2003). As plaquetas liberam fatores de crescimento e proteínas adesivas que estimulam o processo inflamatório e a migração celular para a ferida (MIDWOOD; WILLIAMS; SCHWARZBAUER, 2004). O recrutamento das células da imunidade inata inicia a fase inflamatória, em que devem ser eliminadas as células danificadas e os patógenos. Para isso, leucócitos e células residentes do tecido inflamado secretam fatores de crescimento, citocinas e enzimas causadoras de edema, rubor, calor e dor no local da ferida, cuja limpeza é realizada por neutrófilos e por macrófagos diferenciados de monócitos (oriundos da circulação sanguínea). Esses fagócitos degradam e fagocitam debris celulares e teciduais (PASTAR *et al.*, 2014; SUETAKE *et al.*, 1996).

Os principais objetivos da fase proliferativa é a cobertura e o preenchimento da ferida, cujas margens começam a se contrair pela ação de fibroblastos ativados e diferenciados em miofibroblastos. Em seguida, o processo de reepitelização se inicia, caracterizado pela produção e liberação de proteínas de matriz extracelular, principalmente a fibronectina e o colágeno (LEAVITT *et al.*, 2016; MIDWOOD; WILLIAMS; SCHWARZBAUER, 2004; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009). Finalmente, na fase de maturação, as fibras de colágeno se reorganizam de tipo III para tipo I e o tecido se remodela, adquirindo força e flexibilidade, concomitantemente ao desenvolvimento do epitélio e à neovascularização (BARON; GLATZ; PROKSCH, 2020; PAKYARI *et al.*, 2013).

A falha na cicatrização está associada a um processo inflamatório contínuo (crônico) e localizado, assim como ao tabagismo, à desnutrição, a medicações e à radiação (EMING *et al.*, 2009). Nesse contexto, as respostas imunes inata e adaptativa são importantes para a resolução da inflamação (EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007). Fibroblastos e miofibroblastos secretam metaloproteinases (MMP), enzimas envolvidas no remodelamento do colágeno tipo III para o tipo I, para fechar a ferida, entre outras importantes conversões. Esse equilíbrio entre síntese e hidrólise de proteínas da matriz extracelular está relacionado à cicatrização tecidual e à resistência mecânica, de forma que quantidades excessivas de colágeno (por aumento de síntese ou por atraso em sua reabsorção) e de outros componentes da MEC podem se acumular na ferida, levando à formação de queloides ou cicatrizes hipertróficas. Muitos órgãos podem sofrer com esse reparo inadequado, como os pulmões (fibrose pulmonar) e o fígado (fibrose hepática), com perda de função ou mesmo falência completa (PASTAR *et al.*, 2014; SUETAKE *et al.*, 1996).

Algumas doenças também estão associadas a um processo de cicatrização inadequada. Entre elas estão o *diabetes mellitus*, a obesidade, a hipertensão arterial sistêmica e as doenças vasculares (GUILLAMAT-PRATS, 2021).

2.6.3 Aspectos específicos da inflamação e do reparo da dura-máter

Conforme abordado anteriormente, a dura-máter humana tem uma camada externa aderida ao crânio e outra interna em contato com as leptomeninges. A primeira é chamada de dura periosteal e é formada por tecido conjuntivo denso; e a segunda, de dura meníngea, composta por tecido conjuntivo fibroso (KHURANA *et al.*, 2024). A reparação tecidual normal da dura-máter ocorre a partir de proliferação de fibroblastos e do desenvolvimento de fibras do tecido conectivo (KHURANA *et al.*, 2024). Todavia, defeitos durais grandes

requerem substitutos durais para conter o conteúdo encefálico e estruturar a reparação dural, de forma que o enxerto é degradado enquanto a dura-máter é restaurada. Os substitutos durais interagem com as células e tecidos adjacentes, induzindo bioatividades locais, que permitem melhorar o crescimento e a proliferação das células no sistema biológico (KHURANA *et al.*, 2024).

Estudos experimentais de biocompatibilidade de biomateriais com a dura-máter consideram como parâmetros para análise de qualidade do *scaffold* a análise histológica, a presença de aderência ao córtex cerebral, o desenvolvimento de fistula liquórica e a incorporação do *scaffold* aos tecidos circunjacentes.

2.7 Colágeno: estrutura e função

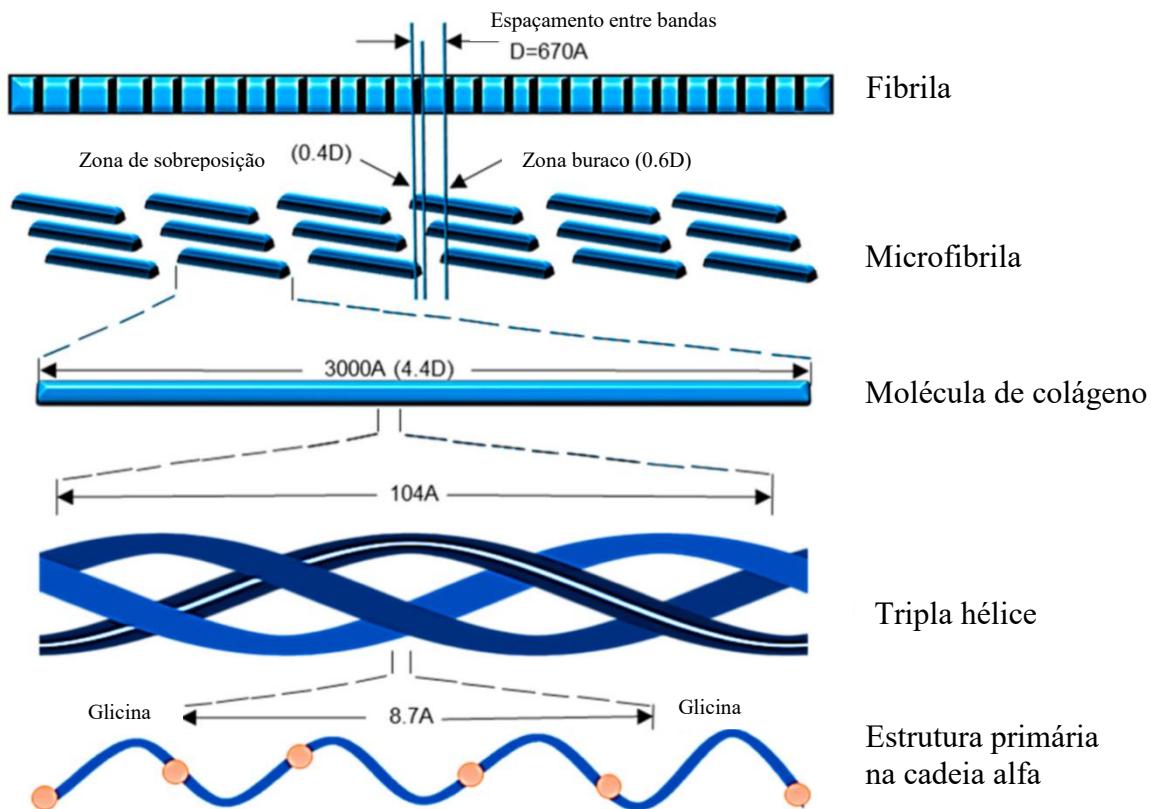
O colágeno é uma estrutura macromolecular de tripla hélice, subdividida em 28 tipos, que pode iniciar e manter a interação entre as células e a matriz extracelular (HOLMES *et al.*, 2018). Os tipos mais comuns são o I, o II e o III. O colágeno tipo I constitui, em elevada proporção, o conteúdo de vasos, pele, tendões, ossos, cápsulas de órgãos, córnea e fáscias (NAOMI; RIDZUAN; BAHARI, 2021). É formado por aproximadamente 1000 aminoácidos, seu comprimento pode chegar a 300 nm e sua largura entre 1 a 5 nm. O colágeno tipo II é menos abundante que os I e III e está presente na cartilagem articular e no disco intervertebral. Já o colágeno tipo III está presente em músculos, vasos sanguíneos, útero e intestino. Em cada tecido onde está presente, o colágeno exerce um papel: fortalece estruturas ósseas, incrementando elasticidade da pele e resistência à tração em ligamentos (RICARD-BLUM, 2011).

2.7.1 Estrutura do colágeno

Em geral, os colágenos são as maiores proteínas da matriz extracelular de tecidos conectivos e seus domínios são geralmente chamados de colágenos (COL) e não colágenos (NC) (MIENALTOWSKI; BIRK, 2014). O número de domínios COL e NC está relacionado a cada tipo específico de colágeno. Entre os genomas dos vertebrados e invertebrados superiores existem 28 glicoproteínas de colágeno distintas (numeradas de I a XXVIII), codificadas por ao menos 45 genes (MIENALTOWSKI; BIRK, 2014). Há também os FACITs, do inglês *fibril-associated collagens with interrupted triple hélices* (colágenos com triplas hélices interrompidas associados a fibras), proteínas semelhantes ao colágeno com

capacidade de associação a fibrilas colagenosas e de interação com proteínas não colagenosas da matriz extracelular (RICARD-BLUM, 2011). Entre os FACITs, pode-se citar como exemplos os colágenos XII e XIV (MIENALTOWSKI; BIRK, 2014). Vide Figuras 6 e 7 para uma melhor compreensão dos níveis de organização estrutural do colágeno e de suas fibrilas.

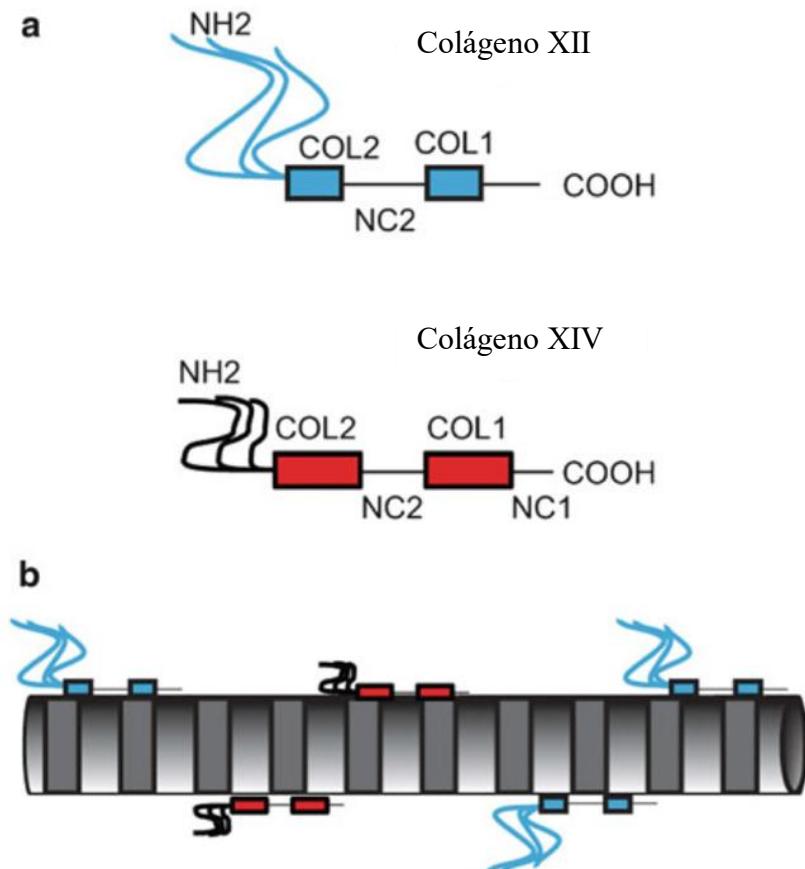
Figura 6 – Organização das estruturas formadas pelo colágeno.



Fonte: Adaptado de Naomi, Ridzuan e Bahari (2021, p. 4).

Nota: Microestrutura do colágeno tipo I, evidenciando a fibrila, a microfibrila (estrutura heterotrimera), a molécula de colágeno, a tripla hélice e a estrutura primária na cadeia alfa.

Figura 7 – As proteínas FACIT: colágeno XII (a) e colágeno XIV (b).



Fonte: Mienaltowski e Birk (2014).

Legenda: a) ilustração de um domínio de uma estrutura de colágeno encontrada em tendões e ligamentos; o colágeno XII pode ter cadeias de aminoglicano ligadas por ligação covalente; b) os colágenos FACIT associam-se à superfície da fibrila de colágeno (formada por moléculas de colágeno agregadas).

O colágeno pode ser homotrimérico, composto por três cadeias alfa idênticas, ou heterotrimérico, formado por cadeias alfa diferentes. Os tipos de colágeno podem ser agrupados conforme a organização superestrutural, a exemplo dos tipos I, II e III, que formam fibrilas, e são compostos por um longo domínio de tripla hélice (300 nm), com periodicidade de 67 nanômetros (MIENALTOWSKI; BIRK, 2014). Os colágenos formadores de fibrila são os mais abundantes nos vertebrados: o tipo I é o predominante em ligamentos e tendões, o tipo II compõe as regiões fibrocartilaginosas da entese de tendões e ligamentos, e o tipo III é mais abundante durante o desenvolvimento embrionário, reduzindo sua quantidade durante o desenvolvimento (BIRK; MAYNE, 1997).

A síntese de colágeno tipo I (COL-I) é complexa e inclui uma ampla gama de genes transcritos para a formação de estruturas heterotriméricas e fibrilas, compreendendo as etapas de transcrição, tradução, modificação pós-traducional, formação de tripla hélice e secreção do colágeno I (NAOMI; RIDZUAN; BAHARI, 2021). A sequência das cadeias

polipeptídicas do domínio triplo-helicoidal é formada por repetições G-X-Y, em que G é glicina e X e Y qualquer outro aminoácido, normalmente prolina e hidroxiprolina (BOU-GHARIOS; ABRAHAM; CROMBRUGGHE, 2020; HENRIKSEN; KARSDAL, 2016). A glicina na terceira posição é fundamental para garantir a estrutura helicoidal, e, em um estágio tardio, essa sequência de três resíduos de aminoácidos será empacotada em um formato hexagonal para formar o colágeno fibrilar alongado (HENRIKSEN; KARSDAL, 2016).

As moléculas presentes no COL-I, sob certas condições, têm capacidade de automontagem em fibras macroscópicas, fibrilas microscópicas e feixes de fibrilas (KUBYSHKIN, 2019). O COL-I é codificado por 2 genes: *COL1A1*, localizado no braço longo do cromossomo 17, 17q21.3-q22, e *COL1A2*, localizado no braço longo do cromossomo 7, 7q21.3-22.1 (KUBYSHKIN, 2019).

As principais fontes de colágeno tipo I são tecidos de bois, porcos, aves e peixes. O COL-I bovino carece de alguns aminoácidos, ademais, 3% da população humana tem alergia a ele. Outro problema que eleva o risco da sua utilização é a doença priônica, como a encefalopatia espongiforme (SORUSHANOVA *et al.*, 2019). Por outro lado, o colágeno de aves tem sido limitado por causa da gripe aviária, enquanto o de porco tem alto risco de transmissão de zoonoses. O colágeno derivado de medusas (especialmente as da espécie *Rhopilema esculentum*) tem uma boa perspectiva de uso, pela pureza e pelo bom custo-efetividade, assim como o de ovinos, que não está relacionado à transmissão de doenças (SORUSHANOVA *et al.*, 2019).

O colágeno tipo I extraído de peixes exibe uma alta solubilidade em ácido diluído, em comparação com o equivalente extraído de mamíferos e aves. Também é mais resistente à desnaturação térmica. Ele exibe alto grau de similaridade entre cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$, em relação a colágenos do mesmo tipo em outras espécies (LEÓN-LÓPEZ *et al.*, 2019).

2.8 Biomateriais utilizados em medicina regenerativa

Um biomaterial para substituição da dura-máter deve ter propriedades mecânicas (força e flexibilidade) semelhantes à dura-máter humana saudável. Nesse sentido, deve permitir um fechamento dural hermético; ter baixa antigenicidade e toxicidade tecidual; ser livre de qualquer tipo de infecção conhecida; ser fácil de manusear e estar prontamente disponível quando necessário (BERJANO; VINAS; DUJOVNY, 1999).

Os enxertos autólogos, como fáscia lata e pericrânio, são bastante utilizados em neurocirurgia por não serem tóxicos, serem vascularizados e não imunogênicos (KHURANA,

2024). No entanto, em algumas situações, tais quais reoperações, falhas durais grandes e cirurgias endoscópicas endonasais, a extração de enxertos pode não ser satisfatória. No caso das endoscopias endonasais, a utilização do retalho nasosseptal reduziu de 20% para 5% a frequência de complicações relacionadas à abertura do assoalho selar, como a fistula liquórica (OTTO *et al.*, 2013; PINHEIRO-NETO, 2012). Um problema da extração do retalho nasosseptal é a possível ocorrência de perfurações septais (PINHEIRO-NETO, 2012). Entretanto, estudos com matriz de colágeno para reparo de septo nasal em ratos têm demonstrado redução na incidência dessa perfuração, pois, entre outras razões, a matriz proteica favorece a aderência de condrócitos e a produção de matriz extracelular colagenosa, que preenche a descontinuidade da zona doadora de autoenxerto (BERMUELLER, *et al.*, 2013).

Mesmo em casos em que se pode utilizar enxertos autólogos, a manipulação do sítio cirúrgico doador é inconveniente, pois eleva a chance de complicações, tais quais infecção e dor em área não relacionada ao procedimento principal. Por isso, diversos estudos têm avaliado diferentes tipos de substitutos durais, os quais podem também ser classificados em enxertos tradicionais e poliméricos (KHURANA *et al.*, 2024).

Os enxertos tradicionais são os autólogos, os alogênicos e os xenogênicos (KHURANA, 2024). Enxertos autólogos são aqueles originados do próprio paciente, como os de gálea, de pericrânio ou de fáscia muscular, comumente usados em neurocirurgia. Os alogênicos são os derivados de outro indivíduo da mesma espécie, por exemplo, membrana amniótica e derme acelular. Já os xenogênicos originam-se de indivíduos de espécies diferentes, como o pericárdio bovino e porcino. Diversos materiais já foram testados para substituir a dura-máter, como materiais sintéticos e matrizes de colágeno de origem animal. O custo deles, contudo, onera significativamente o sistema de saúde (WEBER; PIEK; GUNAWAN, 2015).

Os enxertos poliméricos, por sua vez, podem ser ainda subdivididos em naturais e sintéticos. São exemplos de polímeros naturais o colágeno, a fibroína da seda, a quitosana e a celulose, e de polímeros sintéticos a policaprolactona (PCL), o ácido poliglicólico (PGA), o poliuretano e o poli-L-ácido-lático (PLLA) (SNYDERMAN *et al.*, 2007; KHURANA, 2024). No Quadro 1 são apresentadas as características de alguns substitutos durais.

Quadro 1 – Classificação dos diversos tipos de substitutos durais e exemplos de materiais empregados em sua composição.

TIPO	NOME	ORIGEM DO MATERIAL
Tradicional		
<i>Autólogo</i>	Pericrânio, fáscia lata	Tecido do próprio indivíduo
<i>Alogênico</i>	Matriz dérmica	Derme humana acelular
<i>Xenogênico</i>	Biodesign® Heart®	Submucosa de intestino delgado de porco Pericárdio equino
Polímeros naturais		
	Duragen®	Colágeno do tendão bovino
	Dura-guard®	Colágeno do pericárdio bovino
	Durapair®	Colágeno da pele de feto bovino
	TissuDura®	Colágeno de tendão de Aquiles equino
	BCM (<i>Bacterial Cellulose Membrane</i>)	Celulose bacteriana
Polímeros sintéticos		
	PCL	Policaprolactona
	PLLA	Ácido poli-L-lático
	PGA	Ácido poliglicólico
	Neuro Patch®	Poliuretano

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os *scaffolds* também são classificados como suturáveis e não suturáveis, a depender de suas estruturas, que podem permitir ou não a sutura em tecidos adjacentes. As membranas suturáveis são *scaffolds* com tecidos mais densos e resistentes à tração, enquanto as não suturáveis são mais friáveis. São exemplos de enxertos suturáveis comercializados e, portanto, com aprovação dos órgãos reguladores Food and Drug Administration (FDA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): o Dura-Guard, derivado de pericárdio bovino e fabricado pela empresa Synovis Life Technologies, e o Durepair, derivado de tecido fetal bovino e fabricado pela empresa Medtronic (dados dos fabricantes).

Um exemplo de enxerto dural não suturável é o Duragen®, uma matriz de colágeno proveniente do tendão de Aquiles de bovinos, produzida pela empresa Integra. Essa membrana já foi submetida a diversos estudos e é aprovada pelo FDA e pela ANVISA, sendo amplamente utilizada em neurocirurgia dentro e fora do Brasil (dados do fabricante). Por esse motivo, foi usada como referência para o nosso estudo.

A matriz de colágeno Duragen® está disponível no mercado brasileiro, registrada na ANVISA sob o número 10306840037, bem como nos mercados norte-americano e europeu.

Está indicada para uso no fechamento de falha dural em qualquer localidade do sistema nervoso central. É um material de alto custo para o sistema de saúde brasileiro, o que torna inviável sua utilização em neurocirurgias de rotina nos hospitais públicos e privados.

Apesar de haver grande variação na composição dos materiais usados em duroplastia, influenciando aspectos como manejo operatório do material e resposta biológica, aqueles baseados em matriz de colágeno têm sua eficácia consistentemente comprovada em diversos ensaios experimentais (ZERRIS *et al.*, 2007).

2.8.1 Biomateriais de origem sintética

As matrizes sintéticas apresentaram-se como um biomaterial viável na qualidade de substituto biológico da dura-máter craniana. Dentre os substitutos sintéticos de dura incluem-se, em sua maioria, colágeno purificado, uretano de poliéster altamente purificado e politetrafluoretileno (BARBOLT *et al.*, 2001; DENG *et al.*, 2016). Todavia, esse tipo de material não é tão biologicamente dinâmico quanto o ambiente da MEC de origem natural.

Diversos materiais foram utilizados no reparo da dura-máter, iniciando-se com os metais: ouro, prata, platina, alumínio, níquel e aço (BERJANO; VINAS; DUJOVNY, 1999). Contudo, a maioria deles sofre encapsulação e forte formação adesiva, motivo pelo qual foram abandonados em favor das membranas orgânicas (BERJANO; VINAS; DUJOVNY, 1999). A utilização de enxertos sintéticos tem sido investigada desde os anos 1970, incluindo o uso de polivinil, polietileno, orlon, vinion, silicone, dácron e polidimetilsiloxano. Posteriormente, novos materiais biossintéticos, como vicril, polidioxanone, celulose biossintética e politetrafluoretileno, foram introduzidos no reparo de dura-máter. O objetivo da utilização desses substitutos é promover a proteção do encéfalo e reduzir a chance de fistula liquórica (BERJANO; VINAS; DUJOVNY, 1999). A principal vantagem dos materiais sintéticos está na segurança quanto a doenças priônicas (doença de Creutzfeldt-Jakob), pois não oferecem risco de desenvolvimento das encefalopatias relacionadas (DENG *et al.*, 2016). Esta é uma preocupação a que sempre se deve estar atento, principalmente quando se utilizam derivados biológicos bovinos (DENG *et al.*, 2016).

2.8.2 Biomateriais de origem biológica

Diferentes aloenxertos de membranas biológicas foram sugeridos para o reparo dural (músculo, pele, pericrânio, peritônio e membrana amniótica); a maioria deles, entretanto,

produz adesão entre a dura e o encéfalo (BERJANO; VINAS; DUJOVNY, 1999). Apesar de dura-máter, pericárdio bovino e fáscia lata provocarem inflamação branda e pouca adesão com o encéfalo, a preocupação com a doença de Creutzfeldt-Jakob e com outras doenças priônicas limitaram o uso desses tecidos pelos neurocirurgiões (THADANI *et al.*, 1988).

Os biomateriais durais de matriz de colágeno animal processado estão sendo utilizados há algumas décadas, com comprovação de benefício tal qual redução das complicações já mencionadas (BIROLI *et al.*, 2008; ZERRIS *et al.*, 2007), assim como de toxicidade tecidual e biocompatibilidade (RABONOWITZ *et al.*, 2005). Em cirurgias endoscópicas, o enxerto é posicionado intraduralmente (*inlay*), extrapolando a margem dural em 1 cm (SNYDERMAN *et al.*, 2007) em contato com a aracnoide, sem sutura, seguido pela sobreposição de cola biológica e pelo retalho nasosseptal (BIROLI *et al.*, 2008). As matrizes de colágeno podem ser divididas em dois grupos: suturáveis (chamadas de “filmes”) e não suturáveis (chamadas de “esponjas”). Essa divisão está relacionada à técnica cirúrgica que pode ser empregada na sua utilização, porém a escolha da técnica está ligada às características biofísicas da membrana.

As membranas com colágeno mais denso são mais resistentes à tração e, portanto, são adequadas à sutura. Estas devem ser utilizadas entre as bordas de dura-máter, preenchendo o espaço entre elas, e ser suturadas com ponto contínuo, usando fio prolene 4-0 ou 5-0. São exemplos dessas membranas: Dura-Guard (SYNOVIS LIFE TECHNOLOGIE), Durapair (Medtronic) e Neuro-Patch (Aesculap), que têm a vantagem de permitir um fechamento hermético, fundamental para uma cirurgia em que a pressão liquórica exerce alta pressão sobre as falhas durais, como a fossa posterior. A desvantagem é que o fechamento leva um pouco mais de tempo (informações dos fabricantes).

As membranas de colágeno menos densas, mais porosas, são mais friáveis e não suportam sutura, pois são laceradas pela passagem da agulha e do fio de sutura. São utilizadas sobrepostas à falha dural, de forma que recubram, além da falha, alguma extensão de borda da dura-máter. A vantagem é sua utilização possibilitar um fechamento mais rápido em relação às membranas suturáveis, e a desvantagem consiste em não suportar o fechamento onde a pressão liquórica é grande sobre as falhas durais (KHURANA *et al.*, 2024).

As correções durais na convexidade encefálica são ainda mais comuns. Nelas, mesmo quando há possibilidade de utilização de enxerto autólogo, pode haver necessidade de reforçar o fechamento com uma matriz de colágeno. Os arcabouços teciduais de origem natural propiciam uma estrutura indutora de reparo, até que o tecido regenerado os degrade,

absorva e substitua, favorecendo o remodelamento tecidual, com alta biocompatibilidade e baixa imunogenicidade (KHURANA *et al.*, 2024).

2.9 A pele de tilápia: matéria-prima para biomateriais empregados em medicina regenerativa

A tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) pertence à família dos ciclídeos e é oriunda da bacia do rio Nilo, estando amplamente disseminada nas regiões tropicais e subtropicais. Sua pele é um subproduto de descarte da indústria de pescados, e apenas 1% é usado para artesanatos. Os primeiros estudos sobre a pele de tilápia iniciaram-se em 2015 no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da UFC, pelos pesquisadores Dr. Edmar Maciel Lima Júnior, Dr. Manoel Odorico de Moraes, Dr. Felipe Augusto Rocha Rodrigues e Dr. Carlos Roberto Koscky Paier.

Uma tarefa árdua para os desenvolvedores de coberturas cicatrizantes é encontrar ativos que atendam à demanda do mercado consumidor. Posto isso, optou-se por desenvolver alternativas às coberturas biológicas ricas em colágeno bovino, e dentre elas está o curativo de pele da tilápia (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2017, 2019). Os derivados da pele de tilápia têm sido estudados extensivamente como biomateriais indutores de regeneração tecidual, por serem ricos em colágeno semelhante ao de mamíferos, com menor risco de transmissão de zoonoses e sem restrições religiosas associadas. De fato, biomateriais derivados de tecidos bovinos e suínos sofrem restrições religiosas em algumas regiões do mundo (YAMADA *et al.*, 2014).

Estudos histológicos da pele de tilápia mostraram uma epiderme revestida por um epitélio pavimentoso estratificado, seguido de extensas camadas de colágeno (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2017, 2019). A pele de tilápia tem morfologia microscópica e propriedades biomecânicas semelhantes às da pele humana, com predominância de colágeno tipo I (ALVES *et al.*, 2015). O colágeno tipo III também compõe sua estrutura, entremeando o colágeno tipo I, dando-lhe maior elasticidade (ALVES *et al.*, 2015).

Os primeiros produtos desenvolvidos a partir da pele de tilápia foram o curativo biológico conservado em glicerol e o liofilizado, usados com sucesso em várias aplicações médicas: cirurgias plásticas (tratamento de queimados e síndrome de Apert), ginecológicas (reconstrução e redesignação vaginal) e tratamento de feridas diversas (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2017, 2019; MONTE *et al.*, 2022; RODRÍGUEZ *et al.*, 2020). A alta biocompatibilidade, a baixa relação custo-benefício e a reproduzibilidade da aplicação clínica do curativo tornaram-no uma significativa inovação na medicina regenerativa. Esse primeiro sucesso proporcionou

um aprofundamento dos estudos das propriedades terapêuticas da pele da tilápia, resultando em uma nova etapa da pesquisa: o desenvolvimento da matriz proteica acelular (*scaffold*), oriunda de pele de tilápia, para uso em cirurgias internas e reconstrutivas.

A pele de tilápia liofilizada não pôde ser utilizada como substituto dural pela abundância de antígenos presente nas células da epiderme, o que poderia causar uma reação inflamatória acentuada. Em contrapartida, a estrutura da matriz extracelular pôde ser processada para retirada seletiva de células, por meio de diversas técnicas, como tratamentos com produtos de ação detergente, ácidos, alcalinos, proteolíticos e nucleásicos (dados não publicados).

É reconhecido o valor terapêutico da matriz proteica acelular (*scaffold*) derivada de pele de tilápia, desenvolvida pelos pesquisadores do NPDM-UFC, com alta biocompatibilidade, segurança e eficácia nos testes pré-clínicos (MENDONZA HERNANDÉZ, 2020; MARTINS, 2023; SILVA, 2023). Ela possui alta quantidade de colágeno tipo III, alta disponibilidade da matéria-prima e é produzida com uma excelente relação custo-benefício (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2017, 2018). Comparativamente, os biomateriais derivados de bovinos também são utilizados na função de xenoxertos, mas possuem alto custo (APRILE; LETOURNEUR; SIMON-YARZA, 2020; HERFORD *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2011; ORTOLANI *et al.*, 2015). Logo, a pele de tilápia apresenta-se como uma fonte alternativa de colágeno na regeneração tecidual (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2017, 2019).

O *scaffold* é um arcabouço constituído principalmente por colágeno, cuja estrutura facilita a migração e a integração de diferentes tipos celulares que produzem fibras colágenas, fibras elásticas e glicoproteínas durante a fase de reconstrução dural (KHURANA, 2024). Nos estudos de Lima Verde *et al.* (2021), o colágeno com alto nível de hidrólise, isolado de pele de tilápia, promoveu a diferenciação osteoblástica em um estudo de regeneração óssea de mandíbulas de ratos, em função da sua grande quantidade de colágeno tipo I.

É importante ressaltar que o colágeno tipo I, o principal constituinte da MEC, é também responsável pela resistência e pela elasticidade tecidual. A presença dessa proteína em abundância no biomaterial agrega propriedades satisfatórias, favorecendo ainda mais o processo regenerativo. A matriz proteica acelular da pele de tilápia, rica em COL-I, deve possuir estas propriedades:

- a) Biocompatibilidade: o biomaterial é compatível com o tecido ou órgão no qual será implantado, para evitar respostas inflamatórias ou rejeições;

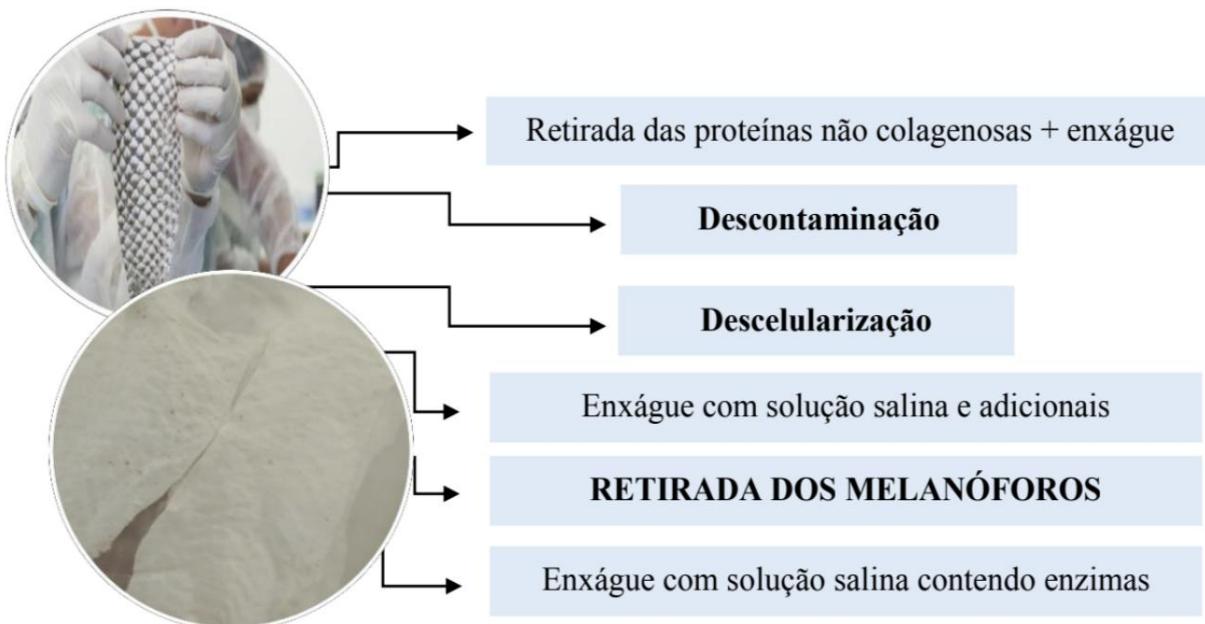
- b) Biodegradabilidade: o biomaterial pode ser degradado absorvido pelo organismo ao longo do tempo, sem deixar resíduos tóxicos ou prejudiciais;
- c) Estabilidade: o biomaterial é estável na sua forma e composição química, para evitar a liberação de substâncias tóxicas ou prejudiciais ao organismo;
- d) Resistência mecânica: o biomaterial suporta as cargas e os movimentos do tecido ou órgão no qual será implantado;
- e) Hipoalergenicidade: o biomaterial não causa reações alérgicas no organismo;
- f) Esterilização: o biomaterial é passível de esterilização para evitar a contaminação por microrganismos que possam causar infecções; e
- g) Segurança toxicológica: o biomaterial é testado para garantir que não possui efeitos tóxicos ou carcinogênicos no organismo (MARTINS, 2023; SILVA, 2023).

Essas propriedades já haviam sido alcançadas pela pele de tilápia liofilizada, desenvolvida para uso externo. O desafio atual é a criação de um material que detenha as mesmas propriedades, mas seja indicado para uso interno, em contato com tecidos e órgãos. No caso dos substitutos durais do presente estudo, o biomaterial deve entrar em contato com meninges, encéfalo, calota craniana, músculo e subcutâneo e manter as referidas propriedades. Nesse contexto, desenvolveu-se uma matriz extracelular descelularizada, derivada da pele de tilápia (MENDONZA HERNANDÉZ, 2020; MARTINS, 2023; SILVA, 2023).

Os eventos neurocirúrgicos são situações de quebra de barreira hematoencefálica e, portanto, deve-se atentar de maneira redobrada a situações de inflamação e infecção. A presença abundante de colágeno tipo I e, em menor quantidade, tipo III na pele de tilápia, que são semelhantes ao padrão de arranjo espacial das fibras de colágeno humanas, garantiria a conformação desejada do produto. O desafio, no entanto, é padronizar a sequência de reagentes de descelularização da pele de tilápia sem alterar as conhecidas características biológicas do tecido original.

A produção da matriz descelularizada (*scaffold*) inclui a retirada mecânica das peles dos peixes, lavagem em água corrente, descontaminação microbiológica, descelularização, detoxificação e retirada dos melanóforos, seguida de lavagens sucessivas com solução salina contendo nucleases, congelamento a -80°C, liofilização e esterilização (MENDONZA HERNANDÉZ, 2020; SILVA, 2023), conforme a Figura 8. As análises histológicas do *scaffold* demonstraram a organização fibrilar do colágeno, alto nível de descelularização, ausência de toxicidade *in vitro* e excelente biocompatibilidade *in vivo* (SILVA, 2023).

Figura 8 – Produção da matriz proteica acelular oriunda da pele de tilápia (*Orechromis niloticus*).



Fonte: Dados do experimento.

Estudos *in vivo* em neurocirurgia possibilitarão elucidar o comportamento biológico da matriz proteica acelular da pele de tilápia em duroplastias, e outros grupos de estudo já estão investigando-a em modelos animais de outras áreas médicas (urologia, oftalmologia, cardiologia, ortopedia e cirurgia geral). Nessas pesquisas, a análise do potencial inflamatório do biomaterial é de suma importância para avaliar a aplicação do dispositivo médico em práticas clínico-cirúrgicas.

O uso do *scaffold* da pele de tilápia como substituto dural proporcionaria o acesso dos pacientes aos benefícios auferidos pelo produto, mas é necessário estudar o efeito da cicatrização produzida por esse material, essencialmente, em modelos animais. A cicatrização ou regeneração da dura-máter é um evento complexo, visto que existem vários tipos de células envolvidas, cada uma desempenhando um papel diferente, em momentos distintos, durante o processo de cura. A importância e a necessidade de usar modelos animais nos estudos iniciais reside em obter um modelo de análise mimético do ambiente do processo de cicatrização humana (GREENHALGH, 2005), para avaliação de potenciais danos às células do sistema nervoso ou às células dos tecidos adjacentes ao sistema nervoso (membrana dural, osso e pele).

O uso do *scaffold* da pele de tilápia como substituto dural tem o potencial de reduzir significativamente o custo dos procedimentos neurocirúrgicos que necessitem de

substitutos durais, levando em consideração o elevado preço dos materiais disponíveis comercialmente na atualidade.

3 OBJETIVOS

Avaliar a intensidade do processo inflamatório, a absorção do biomaterial ao longo do tempo e a sua substituição por tecido conjuntivo sobre o encéfalo de ratos submetidos à craniectomia e ao implante de matriz dérmica acelular de pele de tilápia (MDAPT) em espaço epidural. Análise ultra estrutural das membranas de Duragen e da matriz dérmica acelular de pele de tilápia por microscopia eletrônica de varredura.

3.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

a) No pós-operatório:

- Avaliar se os animais apresentam algum sinal neurológico após a cirurgia;
- Avaliar se apresentam alguma síndrome infecciosa;
- Avaliar se apresentam fistula liquórica aberta (saída de líquor pela ferida operatória);
- Avaliar se apresentam fistula contida no momento do sacrifício (presença de líquor sob a ferida operatória).

b) Nas análises histológicas comparativas:

- Avaliar se apresentam processo inflamatório em torno da membrana implantada;
- Avaliar se os biomateriais empregados foram infiltrados por fibroblastos e se foram degradados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados os materiais e métodos utilizados durante a pesquisa.

4.1 Preparo da matriz dérmica acelular de pele de tilápia (MDAPT)

Por se tratar de um processo contido em depósito de patente em avaliação, o protocolo será descrito brevemente. As peles de tilápia foram retiradas mecanicamente dos peixes na piscicultura, lavadas em água corrente, armazenadas em recipientes plásticos estéreis e em gelo. As peles foram então transportadas sob refrigeração ao laboratório (sala limpa), onde foram raspadas para retirada de restos de músculos, lavadas em soro fisiológico estéril e congeladas para armazenamento. Posteriormente, foram descongeladas e adicionadas a soluções oxidantes para garantir a descontaminação microbiológica, incubadas em soluções de surfactantes para a sua descelularização e processadas em soluções que garantem a retirada de melanóforos e a detoxificação. A seguir, as peles foram submetidas a lavagens sucessivas com tampão fisiológico salino contendo nucleases. No fluxograma estão descritas sucintamente as sete etapas do protocolo com duração de aproximadamente 40 h (Figura 6). O processo é finalizado com a matriz dérmica acelular congelada a -80°C e, em seguida, lyophilizada, embalada a vácuo em duplo invólucro plástico e irradiada no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

4.2 Análise de efetividade do enxerto tecidual (*scaffold*) de pele de tilápia na indução de regeneração em modelos cirúrgicos de craniectomia da dura-máter

4.2.1 *Animais e grupos experimentais*

O protocolo foi desenvolvido em ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, adultos (entre 4 e 8 semanas de vida) e com peso entre 100 e 300 gramas. No total, 29 animais foram distribuídos em 3 grupos da seguinte forma:

- a) grupo de controle negativo (N), também chamado de *sham* – procedimento cirúrgico sem implantação de biomaterial realizado em 8 animais, dos quais 3 foram sacrificados em 15 dias, 3 em 30 dias e 2 em 45 dias (3+3+3);

- b) grupo de controle positivo (P) – procedimento cirúrgico com implantação da matriz comercial Duragen® realizado em 10 animais (3+3+4);
- c) grupo experimental – procedimento cirúrgico com implantação do *scaffold* oriundo da pele de tilápia realizado em 10 animais (3+3+4).

Cada grupo teve animais sacrificados em 15, 30 e 45 dias, e, após o sacrifício, os crânios foram removidos e guardados em frascos de formol.

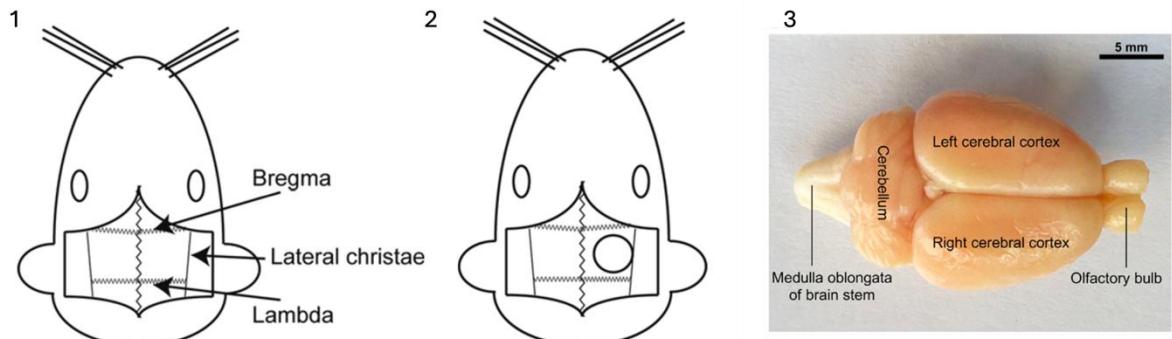
Todos os procedimentos foram realizados de forma racional, respeitando as melhores práticas de bioética e objetivando a minimização do sofrimento de cada animal e o sacrifício da menor quantidade de ratos para obtenção de dados científicos confiáveis. Os procedimentos e cuidados foram feitos em conformidade com as orientações e normativas do Conselho Nacional de Experimentos Animais.

Os animais foram mantidos no laboratório de cirurgia experimental do Biotério da UFC, alojados em gaiolas de dimensões 46 x 34 x 9 cm, em ciclos de claro/escuro (12/12h), com acesso livre a água e alimentos. O presente protocolo foi realizado respeitando os princípios éticos de experimentação animal, após aprovação (parecer nº 14170919-0) pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), credenciado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2.2 Procedimento cirúrgico

A cirurgia foi realizada tendo como referência a neuroanatomia dos ratos, conforme as ilustrações da figura a seguir (JANOWSKI, 2016; ABOGHAZLEH *et al.*, 2023).

Figura 9 – Neuroanatomia de ratos.

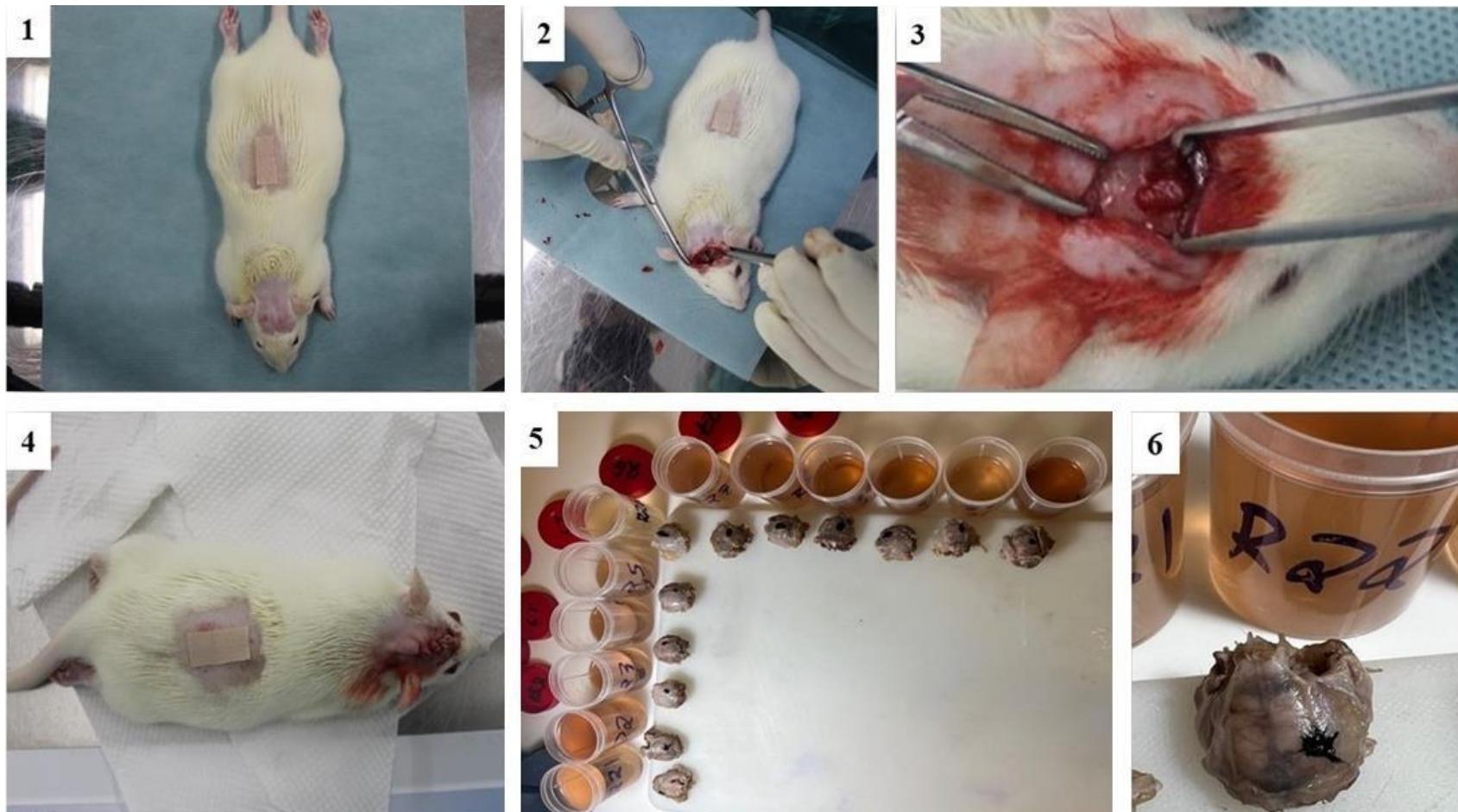


Fonte: (1) e (2) Adaptado de Janowski (2016); (3) Aboghazleh *et al.* (2023).

Legenda: (1) Desenho ilustrando a exposição da calota craniana do rato após incisão em linha média. (2) Desenho evidenciando o local da craniectomia (círculo), entre o bregma, a linha média, o lambda e a crista lateral (um centímetro posterior ao globo ocular e 3 mm da linha média). (3) Fotografia de um encéfalo dissecado; o local da craniectomia está anatomicamente relacionado ao córtex cerebral direito, mais posteriormente.

Seguem as etapas antes e após o procedimento cirúrgico nos animais (Figura 10).

Figura 10 – Etapas do procedimento cirúrgico em animais.



Fonte: Dados do experimento.

Legenda: (1) Tricotomia da cabeça e do dorso. No dorso, visualizamos o adesivo de buprenorfina colado para já promover analgesia. (2) O animal está sob anestesia, tricotomizado em crânio e dorso. Sob a pele do dorso, observamos um adesivo de buprenorfina para analgesia. A incisão linear em linha média do crânio permite a exposição de calota craniana, na qual foi realizada uma craniectomia em hemicrânio à direita. (3) Visualização de craniectomia, realizada em formato retangular, localizada em hemicrânio à direita com membrana já inserida. (4) Pós-operatório do animal com a ferida suturada em crânio e adesivo com buprenorfina (analgésico) colado no dorso tricotomizado. (5) Fotografia dos 12 crânios, com os defeitos cranianos corados em nanquim. Cada crânio está à frente do seu respectivo frasco com formol. (6) Fotografia do crânio do espécime número 22, com o defeito craniano corado em nanquim, à frente do seu respectivo frasco com formol.

Os animais participantes do protocolo experimental foram anestesiados por injeção intraperitoneal de Cetamina (1,0 mg/kg) e Xilazina (0,8 mg/kg). Em seguida foram tricotomizados no dorso e no crânio por tração manual para assepsia com iodopovidona 1% e álcool etílico a 70%.

Primeiramente, foi realizada uma incisão em linha média do crânio de aproximadamente 2,0 cm com o auxílio de um bisturi (nº 15), com exposição da calota craniana e realização de uma trepanação na região parietal direita. A craniectomia foi iniciada a 1 cm da órbita direita e a 3 mm da linha média – medidas realizadas com um paquímetro –, ampliando-se a trepanação no sentido anterior e, depois, lateral, com um *kelly*.

Após a craniectomia, realizamos a introdução do biomaterial com aproximadamente 5 mm de lado (grupo de controle positivo e experimental) entre a duramáter e a calota craniana. A incisão permitiu a exposição de ambos os lados do crânio, onde foi realizada uma craniectomia. Em seguida, foi feita a sutura simples com *mononylon* 3-0.

No grupo de controle negativo (N), foi realizado o mesmo procedimento de craniectomia, porém sem introdução de *scaffold*. Para o controle de dor no pós-operatório, os animais receberam adesivo de Buprenorfina 0,5 mg/kg/dia por 7 dias com aplicação transdérmica. Depois do sacrifício, os crânios dos animais foram removidos e guardados em frascos de formol e, posteriormente, foram seccionados em corte coronal para preparação de lâminas para estudo histológico.

4.2.2.1 Monitoramento pós-cirúrgico e avaliação macroscópica

Os animais foram submetidos à avaliação diária do ferimento, com verificação de infecção local ou deiscência de ferida. Também foram monitorados até o dia do seu sacrifício, sendo divididos em subgrupos a partir do dia do sacrifício após procedimento: 15 (T1), 30 (T2) e 45 dias (T3). O sacrifício foi realizado com Xilazina (30 mg/kg) e Cetamina (270 mg/kg), por via intraperitoneal. Os sinais vitais foram avaliados, a seguir, para a confirmação da morte do animal: ausência de movimentos respiratórios (apneia), ausência de batimentos cardíacos (assistolia) e mucosas pálidas.

4.2.2.2 Avaliação estrutural

Após o sacrifício dos animais, o local onde foi realizada a craniectomia foi seccionado para elaboração de lâminas para estudos histológicos, para avaliação de edema e

de infiltração de leucócitos, de mastócitos íntegros e de granulação, de proliferação de fibroblastos (fibroplasia), de reepitelização e de síntese de fibras colágenas. Também foram feitas as colorações imuno-histoquímicas com alfa-actina de músculo liso e MDM2, para identificação e contagem de vasos e miofibroblastos. A marcação de enolase neuroespecífica foi utilizada para a avaliação de possíveis danos cerebrais e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a análise estrutural do colágeno. A avaliação histológica também permitiu uma análise da espessura do tecido conjuntivo formado sobre os *scaffolds* de colágeno.

Nas análises, foram ainda avaliados o remodelamento do tecido ósseo, a inflamação e a constituição de colágeno da MEC no local da craniectomia em cada grupo. Ainda foi possível observar se houve degradação dos biomateriais. Os materiais obtidos foram enviados para o processamento histológico no Laboratório de Histopatologia do NPDM e do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC, para a obtenção dos blocos de parafina. Os cortes histológicos foram feitos a partir desses blocos e corados pelas técnicas de hematoxilina-eosina (HE) e *picrosírius red*, de acordo com os protocolos descritos a seguir.

4.2.2.3 Hematoxilina-eosina

A coloração é realizada em duas etapas: primeiro hematoxilina, um corante básico nuclear, e depois eosina, um corante citoplasmático ácido (ácido xantêmico). Após a eutanásia dos animais, os fragmentos do crânio foram guardados em frascos com formol e, posteriormente, identificou-se o local da falha óssea com nanquim e iniciou-se o processo de descalcificação do crânio. Os fragmentos dos crânios dos animais foram analisados macroscopicamente e submetidos à desidratação em série alcoólica crescente, diafanização em xanol, impregnação em parafina fundida a 60°C e inclusão dos fragmentos. A produção dos blocos foi realizada à temperatura ambiente, além de terem sido feitos cortes de 4 µm de espessura para confecção de lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina. Para observação dos tecidos, foi utilizado um microscópio óptico para captura de 5 campos em um aumento de 200x com uso de câmera acoplada ao microscópio.

Essa técnica permitiu avaliar por microscopia óptica:

- a) A integridade do encéfalo adjacente à falha óssea;
- b) O grau de processo inflamatório avaliado em 5 ou mais diferentes campos, nos quais foram feitas contagem das células inflamatórias e, posteriormente, médias aritméticas simples entre os campos avaliados. O grau de inflamação

foi classificado em ausente (0); discreto (1), quando teve menos de 24 células; moderado (2), quando teve entre 25 e 124 células; e intenso (3), quando teve mais de 125 células (DENG *et al.*, 2016; MITTAL; CHANDRA; CHANDRA, 1995; ARIGBEDE; ADEYEMI; FEMI-AKINLOSOTU, 2017);

- c) A distância entre as extremidades ósseas da craniectomia (comprimento da falha óssea);

Após a identificação da área de interesse, isto é, a região da falha óssea no local da craniectomia, os fragmentos fixados em parafina foram novamente seccionados para preparar as lâminas para estudo imuno-histoquímico.

4.2.2.4 Imuno-histoquímica

Por meio das técnicas de imuno-histoquímica, é possível avaliar a fenotipagem da reação inflamatória e a neoformação óssea no local da craniectomia. As seguintes colorações foram usadas: MDM2, alfa-actina de músculo liso e enolase neuroespecífica.

A reação de imuno-histoquímica foi realizada em cortes histológicos de 5 mm de espessura, dispostos em lâminas microscópicas sinalizadas, a partir de blocos parafinados, seguindo-se a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase. As etapas compreendidas desde a desparafinação até a recuperação por calor do epítopo foram feitas com a solução EZ Prep (Roche) por 30 minutos. Os anticorpos primários utilizados foram alfa-actina de músculo liso 1A4 (DakoCytomation®), proteína MDM2 SMP14 (DakoCytomation®) e enolase neuroespecífica BBS/NE/VI-H14 (DakoCytomation®) nas seguintes diluições: alfa-actina de músculo liso com diluição de 1:1500, MDM2 com diluição de 1:100 e enolase neuroespecífica com diluição de 1:300. Foi utilizado o sistema de automação pelo método de marcação BENCHMARK™ XT IHC/ISH VENTANA/ROCHE, sendo a imunoperoxidase indireta detectada pelo sistema XT Ultraview DAB v3 e a revelação da reação com diaminobenzidina (DAB). Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer.

Dessa forma, a alfa-actina de músculo liso foi usada para mensuração do endotélio vascular e de fibroblastos precursores de vasos e miofibroblastos. Além disso, o marcador MDM2, presente nos miofibroblastos e no endotélio, tornou-se parâmetro para avaliação da proliferação celular; e a enolase neuroespecífica, para diagnóstico de lesões neuronais (diagnóstico e prognóstico em acidente vascular cerebral isquêmico, hemorragia cerebral, convulsão e entre outros), segundo Rech, Vieira e Brauner (2006).

A avaliação dos resultados foi realizada primeiramente pela seleção de 5 campos das lâminas utilizadas em um aumento de 200X ou 400X, os quais foram fotografados com uso

de câmera DFC 295, acoplada ao Microscópio Leica® DM 2000, e foi seguida pelas análises das fotomicrografias pelo *software* Image J® (RSB). As fotomicrografias foram tomadas em luz convencional, e células com marcação citoplasmática, membranosa e nuclear e sem marcação foram contadas por meio da ferramenta Cell Counter do *software* Image J®, para cálculo do percentual médio de células imunopositivas para cada marcador.

4.2.2.5 *Picosirius red*

Lâminas foram preparadas em cortes de 3 µm dos blocos parafinados selecionados. Foi realizada a desparafinação em estufa a 60°C por 3 h, seguida de três banhos de 5 minutos em xanol, reidratação em solução de etanol decrescente (90%, 85% e 70%) com posterior lavagem com água, incubação em solução de *picrosírius* (ScyTek®) por 30 minutos e realização de dois banhos de ácido clorídrico a 5%. A contracoloração dos espécimes foi feita com hematoxilina de Harris por 45 segundos e, em seguida, foi feita montagem com Enthellan®.

A avaliação dos resultados foi realizada primeiramente pela seleção de 5 campos das lâminas em um aumento de 400x, os quais foram fotografados com uso de câmera DFC 295, acoplada ao Microscópio Leica® DM 2000, e foi seguida pelas análises das fotomicrografias pelo *software* Image J® (RSB). As fotomicrografias foram tomadas em luz convencional e em luz polarizada em cada campo no maior aumento (400x). Após a tomada da fotomicrografia em luz convencional, realizou-se a calibração das imagens.

A coloração por *picrosírius red* foi utilizada para quantificar a presença de colágeno total tipos I e III no local da intervenção cirúrgica. Depois da calibração, as imagens obtidas no microscópio de luz polarizada foram convertidas para a escala de cor de 8 bits e mensuradas pela porcentagem de área de colágeno marcado em vermelho (Analyse>AnalyseParticles). As imagens em luz polarizada seguiram o mesmo protocolo na função RGB para vermelho, verde e azul. Após ajuste, as imagens foram convertidas para a escala de cor de 8 bits e medidas por meio da porcentagem de área de colágeno com birrefringência amarelo-vermelhada (compatível com colágeno tipo I). Em seguida, do total da área marcada em vermelho, foi separado um percentual da região ocupada somente pela birrefringência amarelo-vermelhada. A área verde-esbranquiçada, que representa o colágeno

tipo III, foi obtida pela subtração da região total marcada em vermelho e do percentual marcado unicamente pela cor amarelo-avermelhada.

4.2.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para realizar a MEV, as amostras foram enviadas para a Central Analítica da Universidade Federal do Ceará. As amostras foram fixadas em 1% OsO₄ por 2 h e desidratadas através de uma série de álcool e óxido de propileno, antes da incorporação na Epon 812. Secções ultrafinas foram cortadas com um ultramicrótomo (8800 Ultratome III, LKB, Bromma, Suécia), contracoradas com acetato de uranila e citrato de chumbo e estudadas com um microscópio eletrônico Philips 301 (Philips, Eindhoven, Holanda). Para cada condição experimental, pelo menos cinco campos foram examinados, triplicados a uma magnificação de 80.000X e avaliados por três observadores (FISCHER *et al.*, 2012).

4.3 Análise estatística

As variáveis quantitativas, contínuas e discretas foram verificadas pelo teste de normalidade da distribuição. Para a estatística descritiva foram calculados a média e o desvio padrão. As comparações entre três ou mais grupos foram feitas pela análise de variância para um fator de classificação (*one-way* ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos e os pares de um fator com pós-teste de Bonferroni (nível de significância de 5%). Já o teste de Kruskal-Wallis foi realizado na comparação de mais de três grupos de amostras não paramétricas, tenho sido usado o teste de Dunn como pós-teste.

Comparações entre duas variáveis foram realizadas por teste t para amostras independentes. A análise de variação do peso foi realizada por teste *post hoc* e o gráfico por médias marginais estimadas. Em todas as análises, foi estabelecido o nível de significância em 0,05 (5%). O software GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows® (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2007) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos quanto para a elaboração dos gráficos. Um resumo está presente no Quadro 2.

Quadro 2 – Resumo dos testes utilizados para análise dos resultados.

	Paramétrico	Não paramétrico
>ou = 3 amostras	ANOVA (teste F) um critério	Kruskal-Wallis (valor H)
	ANOVA (teste F) dois critérios	
Mesmo grupo em 3 mais tempos	ANOVA de medida repetida	Friedman
Post hoc	Tukey (diferença verdadeiramente significante) k é número de grupos	Teste de Dunn (teste Q)
	Student-Newman-Keuls (k é número de médias)	Wilcoxon
	Bonferroni (comparação múltipla de Dunn)	Dwass-Steel-Critchlow-Fligner

Fonte: Elaborada pelo autor.

5 RESULTADOS

Foram operados 38 animais, dos quais 4 foram excluídos em razão de a secção histológica ter ficado inadequada, e 6 morreram no ato anestésico. A avaliação clínica e as análises histológicas foram realizadas nos 28 animais restantes.

Nenhum dos 28 animais apresentou alteração do aspecto da ferida operatória (sinais flogísticos ou desordem de ferida), nem saída de secreção ou líquor pela ferida. Também não observamos alteração do padrão comportamental do animal nem da marcha. Já no pós operatório imediato, todos os animais ingeriram água e alimento.

5.1 Variação do peso

Houve diferença significativa entre os pesos iniciais dos animais em cada grupo no momento da cirurgia, pelo teste Kruskal-Wallis, com $p = 0,002$, conforme Tabela 1. A avaliação entre os grupos, pela comparação múltipla de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner, evidenciou que o grupo controle se apresentou diferente do grupo da matriz acelular de pele de tilápia ($p = 0,001$) e do Duragen® ($p = 0,024$). Já o peso médio inicial do último grupo não indicou diferença significativa em relação ao da tilápia ($p=0,961$). Portanto, o peso médio do grupo controle no momento da cirurgia foi significativamente menor que o dos outros dois grupos.

Tabela 1 – Comparações múltiplas de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner.

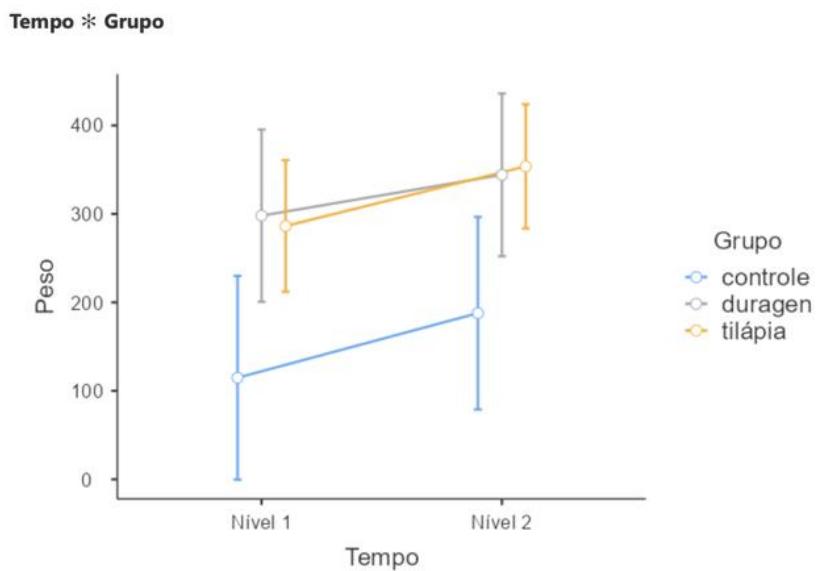
		W	P
Controle	Duragen®	3,70	0,024
Controle	Tilápia	4,96	0,001
Duragen®	Tilápia	0,38	0,961

Fonte: Dados do experimento.

Nota: Comparação entre os pesos dos animais no momento da cirurgia (tempo inicial). O grupo controle negativo tem um peso significativamente diferente do grupo Duragen® ($p = 0,024$) e do Tilápia ($p = 0,001$). Já o grupo Duragen® não é significativamente diferente do grupo Tilápia ($p = 0,961$).

Já a variação de peso dos animais nos grupos, ainda que tenha sido maior no grupo controle, não foi significativamente diferente ($p = 0,428$) entre os instantes inicial (dia da cirurgia) e final (dia do sacrifício, aos 15, 30 e 45 dias), conforme ilustrado no gráfico abaixo (Figura 11).

Figura 11 – Médias marginais estimadas.



Fonte: Dados do experimento.

Legenda: No eixo X estão expressos o instante inicial (momento da cirurgia) do experimento em cada grupo, denominado de Nível 1, e o instante final (momento do sacrifício, nos tempos de 15, 30 e 45 dias após cirurgia), denominado de Nível 2. No eixo Y estão os pesos dos animais expressos em gramas. Em azul: grupo controle negativo; em roxo, grupo Duragen®; em laranja, grupo Tilápia.

5.2 Área da craniectomia

Entre os grupos sacrificados aos 15 dias após a cirurgia, o grupo Duragen® apresentou a maior média de área de craniectomia. O grupo Duragen® foi diferente dos grupos Tilápia e controle negativo ($p = 0,002$). Nos grupos sacrificados em 30 e 45 dias, o grupo controle negativo apresentou as maiores áreas de craniectomia, com $p = 0,034$ e $0,021$ respectivamente. Não houve diferença entre as áreas de craniectomia dos grupos Tilápia e Duragen® aos 30 e 45 dias (Tabela 2 e Figura 12).

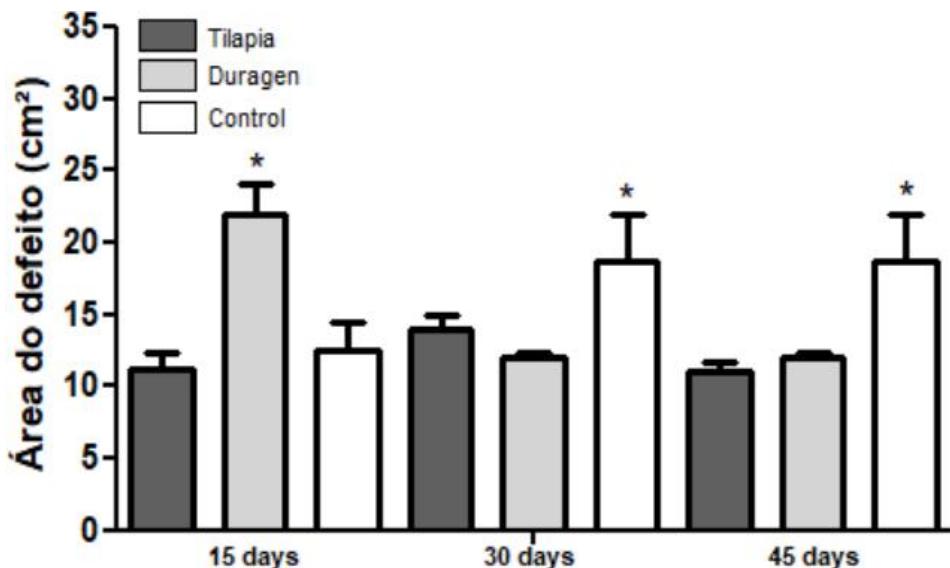
Tabela 2 – Área de craniectomia, aferida por paquímetro, nos grupos tratados com o *scaffold* oriundo da pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (controle negativo ou *sham*), sacrificados em 15, 30 e 45 dias após o procedimento cirúrgico.

Grupos	ÁREA DA CRANIECTOMIA			p-valor
	15 dias	30 dias	45 dias	
<i>Tilápis</i>	11,25 ± 2,87	14,00 ± 2,31	11,00 ± 1,55	0,074
<i>Duragen®</i>	22,00 ± 5,20*†	12,00 ± 1,00	12,00 ± 1,00	0,000
<i>Sham</i>	12,50 ± 4,95	18,75 ± 7,76*	18,75 ± 7,76*	0,231
p-Valor	0,002	0,034	0,021	

Fonte: Dados do experimento.

Nota: Análise estatística pelo teste ANOVA/Bonferroni com média ± EPM com *p < 0,05, versus demais grupos no mesmo dia; †p < 0,05, versus demais dias no mesmo grupo.

Figura 12 – Gráfico em barras evidenciando a área de craniectomia dos animais tratados com o *scaffold* oriundo da pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (*sham*).



Fonte: Dados do experimento.

Nota: Análise estatística pelo teste ANOVA/Bonferroni com média ± EPM com *p < 0,05, versus demais grupos no mesmo dia; †p < 0,05, versus demais dias no mesmo grupo. Entre os animais sacrificados em 15 dias, a média da área de craniectomia foi maior no grupo Duragen, já entre animais sacrificados em 30 e 45 dias, a área média de craniectomia foi maior no grupo controle negativo (*sham*). Os níveis de significância estão descritos no texto.

5.3 Espessura da falha óssea (μm)

Definimos como espessura da falha óssea a distância entre as extremidades ósseas da craniectomia avaliada por microscopia óptica. É importante destacar que esse comprimento

foi aferido em micrômetros (μm), enquanto a área da craniectomia inicial foi em milímetros quadrados (mm^2), por análise macroscópica com paquímetro. A lâmina foi preparada por secção coronal do crânio no local da pequena falha óssea, muitas das quais não eram visualizadas a olho nu. Em alguns casos via-se uma pequena depressão do osso, o qual foi corado por nanquim para destacar o local operado. Desse local corado com nanquim é que foram feitas secções coronais do crânio de forma a contemplar todos os tecidos envolvidos no processo de cicatrização.

A medida da espessura, ou comprimento, da falha óssea foi realizada na escala de micrômetros (μm) entre as extremidades ósseas, sob as quais o biomaterial foi interposto nos grupos teste (Tabela 3). A falha óssea representa a lacuna da calota craniana que ainda não havia sido regenerada no momento do sacrifício dos animais.

Tabela 3 – Espessura da falha óssea (μm) após submissão dos animais a craniectomia e tratamento com o *scaffold* oriundo da pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (controle negativo ou *sham*).

ESPESSURA DA FALHA ÓSSEA (μm) DO DEFEITO CRANIANO NO PONTO FINAL DO EXPERIMENTO

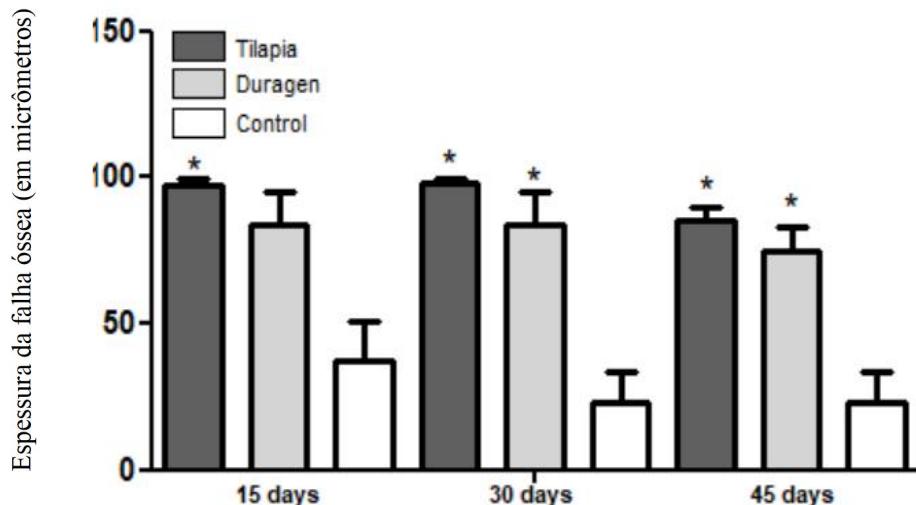
Grupos	15 dias	30 dias	45 dias	p-valor
Tilápia	$97,50 \pm 5,00$	$97,67 \pm 4,04$	$85,00 \pm 12,45^\dagger$	0,024
Duragen®	$83,67 \pm 11,55$	$83,67 \pm 28,29$	$75,00 \pm 20,00$	0,808
Sham	$37,50 \pm 31,82^*$	$22,67 \pm 25,97^*$	$20,37 \pm 20,10^*$	0,483
p-Valor	0,002	0,000	0,000	

Fonte: Dados do experimento.

Nota: Grupos: *scaffold* oriundo da pele de Ttilápia, membrana comercial Duragen® e *sham* (sem inserção de nenhum biomaterial). Análise estatística pelo teste ANOVA/Bonferroni com média \pm EPM com * $p < 0,05$, versus demais grupos no mesmo dia; † $p < 0,05$, versus demais dias no mesmo grupo. O grupo *sham* apresentou menores valores de espessura da falha óssea em todos os tempos. Não houve diferença significativa entre os grupos Tilápia e Duragen em nenhum período avaliado. Em 45 dias, o grupo Tilápia apresentou valor significativamente menor que nos outros tempos avaliados (15 e 30 dias), com $p=0,024$.

Foi observado que o grupo sem inserção de nenhum biomaterial apresentou a menor espessura de falha óssea em todos os tempos (sendo $p = 0,002$ no grupo sacrificado em 15 dias e $p < 0,001$ no grupo sacrificado em 30 e 45 dias) (Tabela 3). A espessura da falha óssea no grupo Tilápia foi maior que a do grupo Duragen® nos períodos avaliados, entretanto, essa diferença não foi significativa nos tempos de sacrifício de 15, 30 e 45 dias, como se observa na tabela acima e no gráfico em barras abaixo (Figura 13).

Figura 13 – Espessura da falha óssea (μm) após submissão dos animais a craniectomia e tratamento com o *scaffold* oriundo da pele de Tilápis, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (controle negativo ou *sham*).



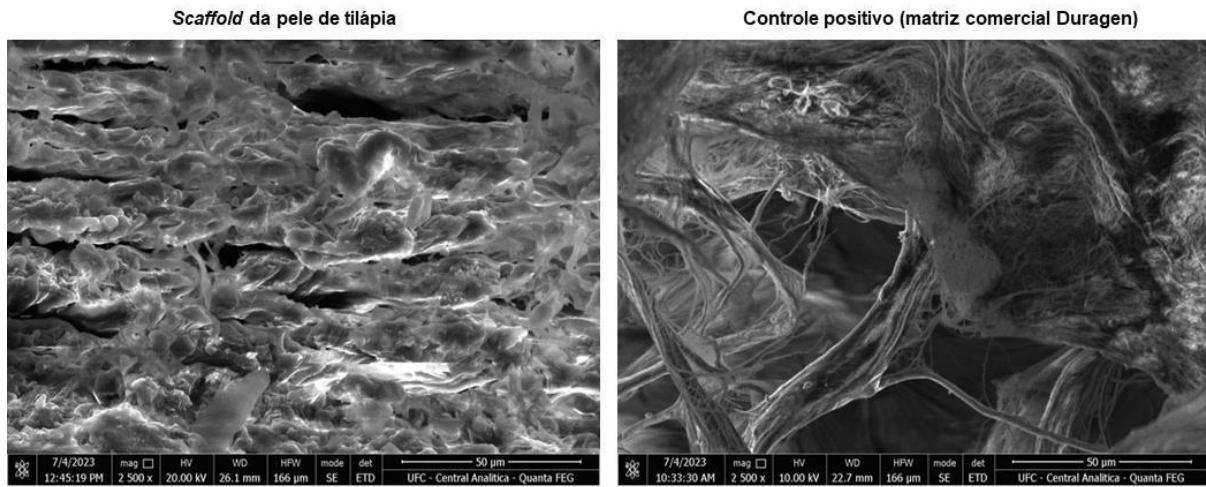
Fonte: Dados do experimento.

Nota: Análise estatística pelo teste ANOVA/Bonferroni com média \pm EPM com * $p < 0,05$, versus demais grupos no mesmo dia; † $p < 0,05$, versus demais dias no mesmo grupo. O grupo de controle negativo apresentou menores valores de espessura da falha óssea em todos os tempos, com diferença significativa para os outros grupos.

5.3.1 Microscopia eletrônica de varredura

As estruturas da MDAPT (*scaffold* de pele de tilápis) e de Duragen® foram avaliadas por microscopia eletrônica com ampliação de 2500x (Figura 14). As cadeias de colágeno da MDAPT são espessas, unidireccionais, alinhadas, justapostas, com poucos e pequenos poros. No grupo Duragen®, por sua vez, as fibras são delgadas, multidireccionais, desalinhadas, com muitos e grandes poros.

Figura 14 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura, no aumento de 2500x, da MDAPT, o *scaffold* oriundo da pele de tilápia (esquerda) e da matriz comercial Duragen® (direita) utilizados na craniectomia.



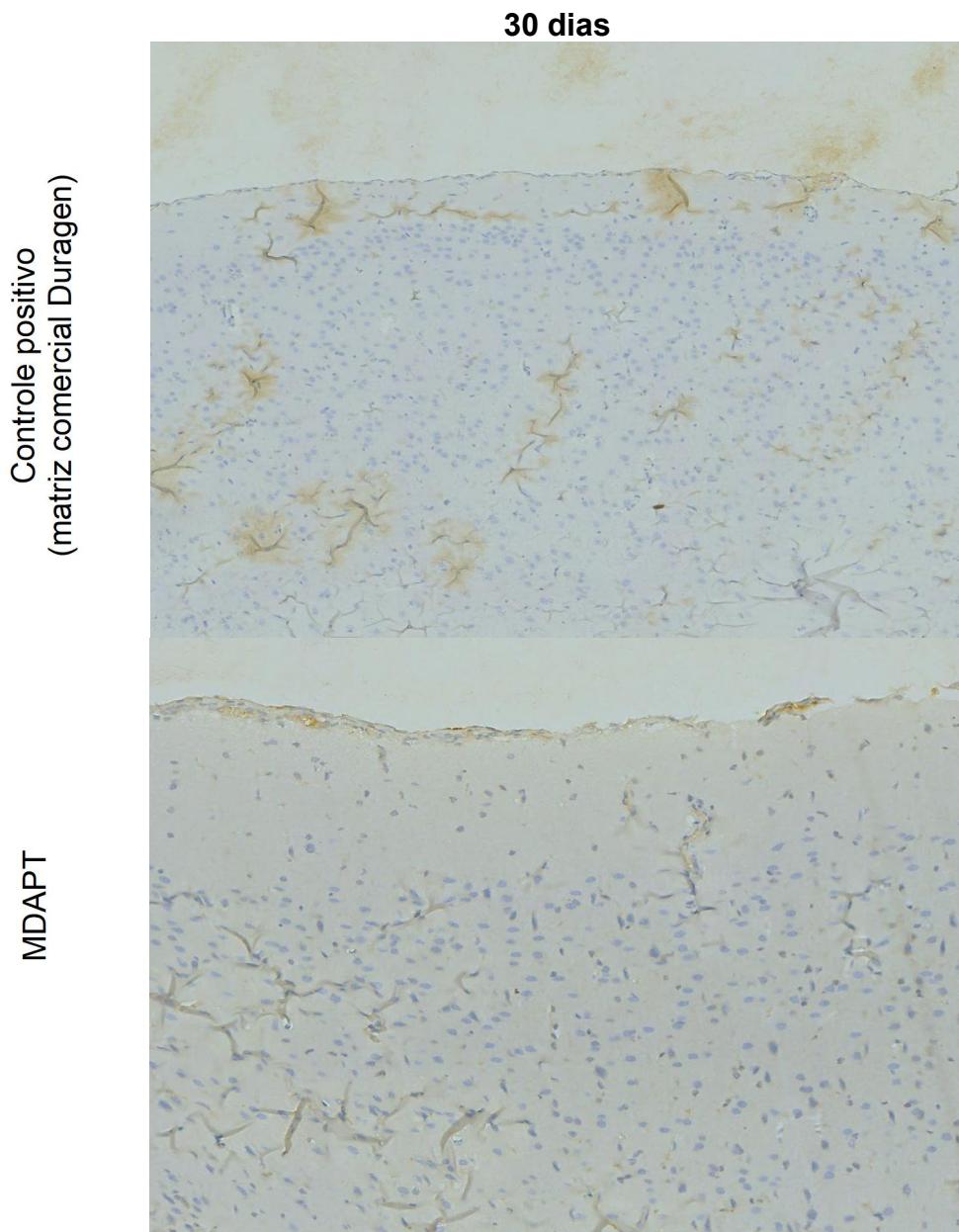
Fonte: Dados do experimento.

Legenda: Micrografia da MDAPT (esquerda) e da matriz comercial Duragen® (direita).

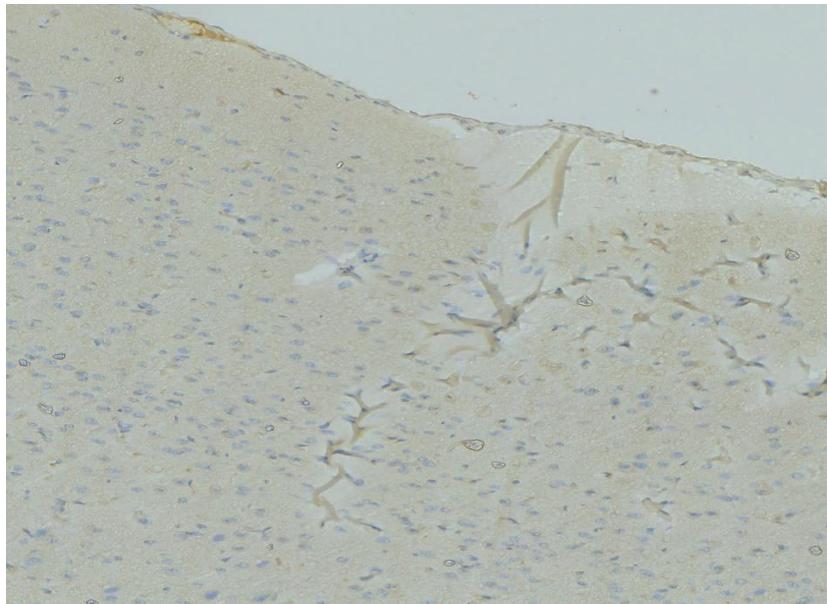
5.3.2 Enolase neuroespecífica

As análises de lâminas com marcação imuno-histoquímica de enolase neuroespecífica não revelaram danos neuronais em nenhum dos grupos experimentais, demonstrando o sucesso da craniectomia em todos os casos (Figura 15).

Figura 15 – Análise das lâminas



Controle negativo
(sem inserção de biomaterial)



Fonte: Dados do experimento.

Nota: Não foram observados danos cerebrais em nenhum dos grupos. Exemplificamos com imagens de cada grupo (*sham*, MDAPT e Duragen) no período de 30 dias.

5.4 Análise histológica pela coloração de hematoxilina-eosina (HE)

Analisaram-se as biópsias dos grupos da MPAPT, da matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (*sham*) aos 15, 30 e 45 dias após a craniectomia (Figura 11).

Em 15 dias, observou-se a adesão das células à superfície da matriz acelular de tilápia e infiltração de células na matriz Duragen®. Notou-se, aos 30 dias, que células haviam se infiltrado entre as fibras de colágeno da MDAPT e colágeno residual, com tecido conjuntivo em formação. Em 45 dias, constatamos um tecido conjuntivo bem evidente no grupo de tilápia e no grupo Duragen®.

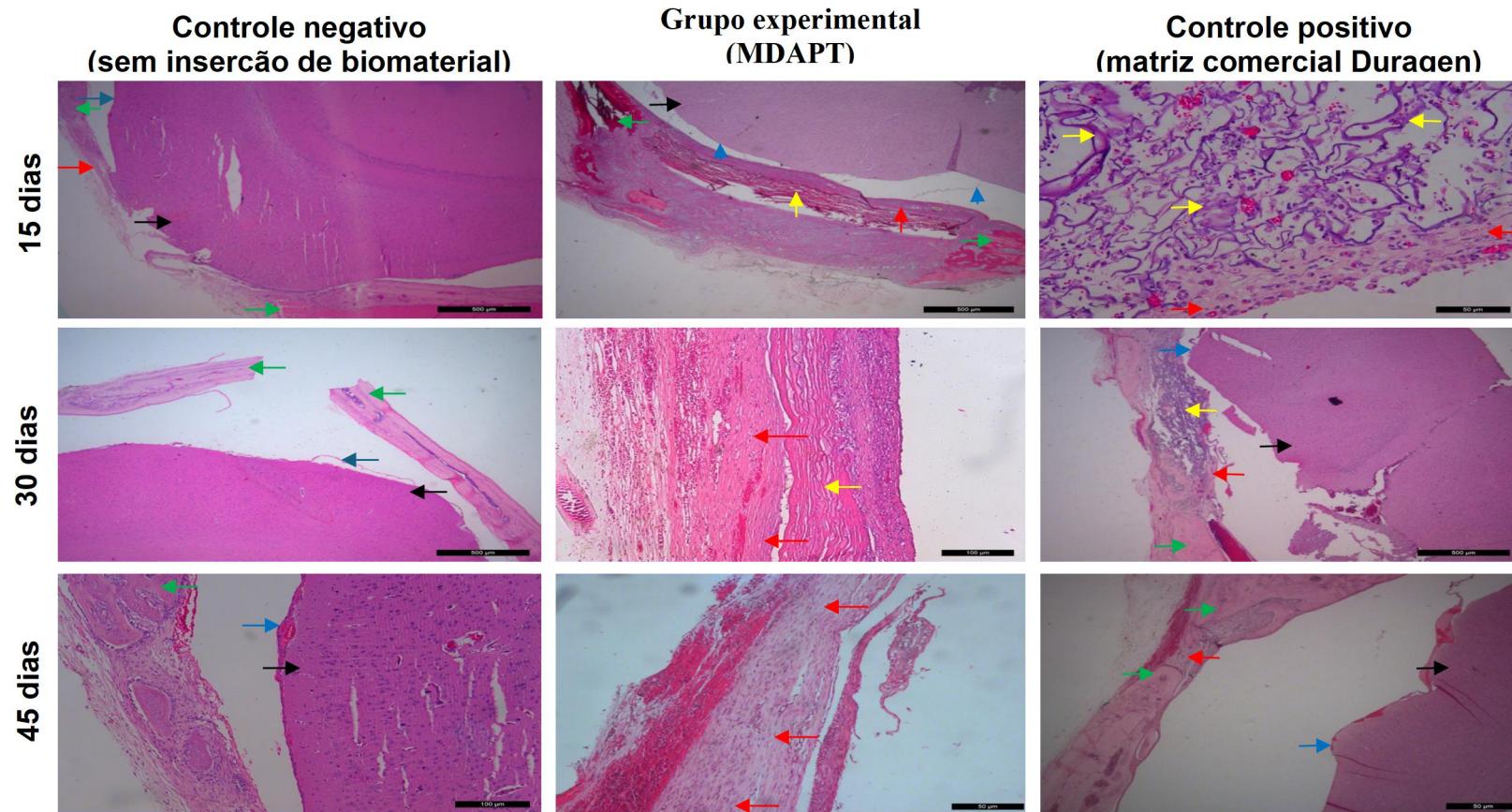
5.4.1 Matriz dérmica acelular de pele de tilápia (MDAPT)

No grupo de animais tratados com o *scaffold* da tilápia (MDAPT) e sacrificados 15 dias após a craniectomia, foi observada uma membrana conjuntiva conectando as extremidades da falha óssea. Tal fato sugere que o biomaterial atuou como barreira mecânica, separando satisfatoriamente a dura-máter da falha adjacente, para criar o ambiente favorável à regeneração óssea. As fibras de colágeno da matriz acelular de tilápia estavam organizadas e alinhadas, com poucas células aderidas e praticamente nenhuma célula infiltrada (Figura 16).

Nas amostras obtidas dos animais sacrificados em 15 dias, constatou-se a presença de fibroblastos aderidos na face da matriz acelular voltada ao córtex cerebral do animal.

Simultaneamente, no lado oposto, ocorreu o desenvolvimento de um novo tecido conjuntivo entre as falhas ósseas. Em corte transversal, a formação tecidual assemelhou-se a uma barreira constituída por fibras de colágeno e duas camadas de células alinhadas, uma de cada lado da superfície do *scaffold* (interna e externa). Nas micrografias, o biomaterial apresentou 100 µm de espessura, com quase nenhuma célula entre suas fibras de colágeno (internamente ao *scaffold*).

Figura 16 – Amostras das lâminas de hematoxilina-eosina (HE) em aumento de 200x após a craniectomia e o tratamento com o *scaffold* oriundo da pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® (controle positivo) e sem nenhum tratamento (controle negativo).



Fonte: Dados do experimento.

Legenda: Coloração de HE. Uma amostra após 15 e 30 dias da craniectomia sem inserção de nenhum biomaterial (controle negativo), seguida de uma duplicata (amostra 1 e 2) após 15, 30 e 45 dias da craniectomia tratada com a MDAPT e com o controle positivo (matriz comercial Duragen®) no aumento de 200x. Nas amostras de controle negativo, em 15 e 30 dias, não há evidência de formação tecidual entre as extremidades ósseas. Seta amarela identificando o biomaterial, vermelha, o tecido conjuntivo, azul, a dura máter, preta, o córtex cerebral, verde, o crânio.

Nos animais desse mesmo grupo sacrificados em 30 dias, as micrografias apresentaram estruturas heterogêneas que conectam as extremidades ósseas, presença de colágeno, tecido conjuntivo e formação óssea com larguras variáveis, em torno da espessura da calota craniana. As fibras de colágeno estavam bem alinhadas, com espessura entre 60 e 120 μm , e possuíam fibroblastos entremeados.

Aos 45 dias houve a completa absorção da matriz acelular de pele de tilápia. Entre as bordas da falha óssea formou-se um novo tecido conjuntivo, com espessura média de 301 μm , e células uniformemente alinhadas. Foi constatada significativa vascularização no tecido conjuntivo adjacente ao tecido ósseo em formação e, em algumas regiões, foram visualizados resíduos de fibras de colágeno (remanescentes do *scaffold* da tilápia), completamente entremeados por vasos e fibroblastos.

5.4.2 Matriz Duragen®

No grupo de animais sacrificados em 15 dias após a craniectomia e tratados com o Duragen®, foi observada uma estrutura de colágeno menos densa, conectando as extremidades ósseas, infiltrada por células desalinhadas. A estrutura de colágeno também atuou como barreira mecânica, separando a dura-máter e o encéfalo da falha óssea. No entanto, não houve a formação de tecido conjuntivo justaposto ao biomaterial, abaixo do crânio, como verificado com o *scaffold* de tilápia.

Notou-se uma estrutura de conexão entre as bordas ósseas, formada hegemonicamente por colágeno (Amostra 1, grupo controle positivo, Figura 11), com fibras curtas, aglomeradas e desalinhadas, repletas de lacunas, ocupadas por células inflamatórias. Alguns fibroblastos foram observados nas lacunas entre as fibras de colágeno e na superfície do externo do biomaterial. No lado do biomaterial voltado ao córtex, percebeu-se aderência do tecido conjuntivo em formação.

Aos 30 dias após a craniectomia, havia raro colágeno do Duragen® no local de inserção. O tecido ósseo estava entremeado por tecido conjuntivo, aderido ao resíduo da matriz de colágeno na face oposta ao córtex do animal. De fato, a matriz Duragen® já não apresentava fibras bem nítidas, vistas após 15 dias, mas sim um material sem uma forma bem caracterizada.

No grupo sacrificado 45 dias após a craniectomia, foi observado o fechamento quase total da falha óssea, não sendo possível visualizar resíduo de colágeno proveniente do Duragen® e tecido ósseo em formação.

5.4.3 Grupo de controle negativo

Nos animais que não receberam qualquer biomaterial não foi evidenciado tecido conjuntivo entre as falhas ósseas aos 15, 30 e 45 dias após a craniectomia, ou qualquer outro tecido que pudesse servir de barreira mecânica entre o encéfalo e o espaço subgaleal (entre o crânio e a aponeurose epicraneal, apostila à pele). A dura-máter encefálica apresentava-se em continuidade com a pele dos animais.

A ausência de processo inflamatório significativo neste grupo demonstra a segurança da técnica cirúrgica utilizada demonstrando que os processos inflamatórios observados nos grupos Tilápia e Durangen são decorrentes exclusivamente da presença das membranas.

As propriedades histológicas de todos os grupos experimentais estão sumarizadas no Quadro 3.

Quadro 3 – Resumo com as principais características histológicas.

INSTANTE DA ANÁLISE (DIA DO SACRIFÍCIO APÓS A CIRURGIA)	MDAPT	DURAGEN®	CONTROLE NEGATIVO (SHAM)
15 dias (T1)	<ul style="list-style-type: none"> *Estrutura de colágeno derivada do biomaterial, conectando extremidades ósseas. *Células nas superfícies da membrana. *Formação regular e uniforme. 	<ul style="list-style-type: none"> *Estrutura de colágeno derivada do biomaterial, conectando as extremidades ósseas. *Células infiltradas na membrana. *Formação irregular. 	<ul style="list-style-type: none"> *Ausência de conexão entre as extremidades ósseas. *Fechamento da craniectomia mais evidente que nos outros 2 grupos.
30 dias (T2)	<ul style="list-style-type: none"> *Tecido conjuntivo nas faces da estrutura de colágeno, com células infiltradas na estrutura de colágeno. *Estrutura de colágeno bem evidente, derivada do biomaterial. 	<ul style="list-style-type: none"> *Tecido conjuntivo entre as extremidades ósseas. *Colágeno residual do biomaterial pouco evidente. 	<ul style="list-style-type: none"> *Ausência de conexão entre as extremidades ósseas. *Fechamento da craniectomia mais evidente que nos outros 2 grupos.
45 dias (T3)	<ul style="list-style-type: none"> *Tecido conjuntivo presente. *Pouco colágeno residual. 	<ul style="list-style-type: none"> *Tecido conjuntivo presente. *Raro colágeno residual. 	<ul style="list-style-type: none"> *Fechamento praticamente completo da craniectomia.

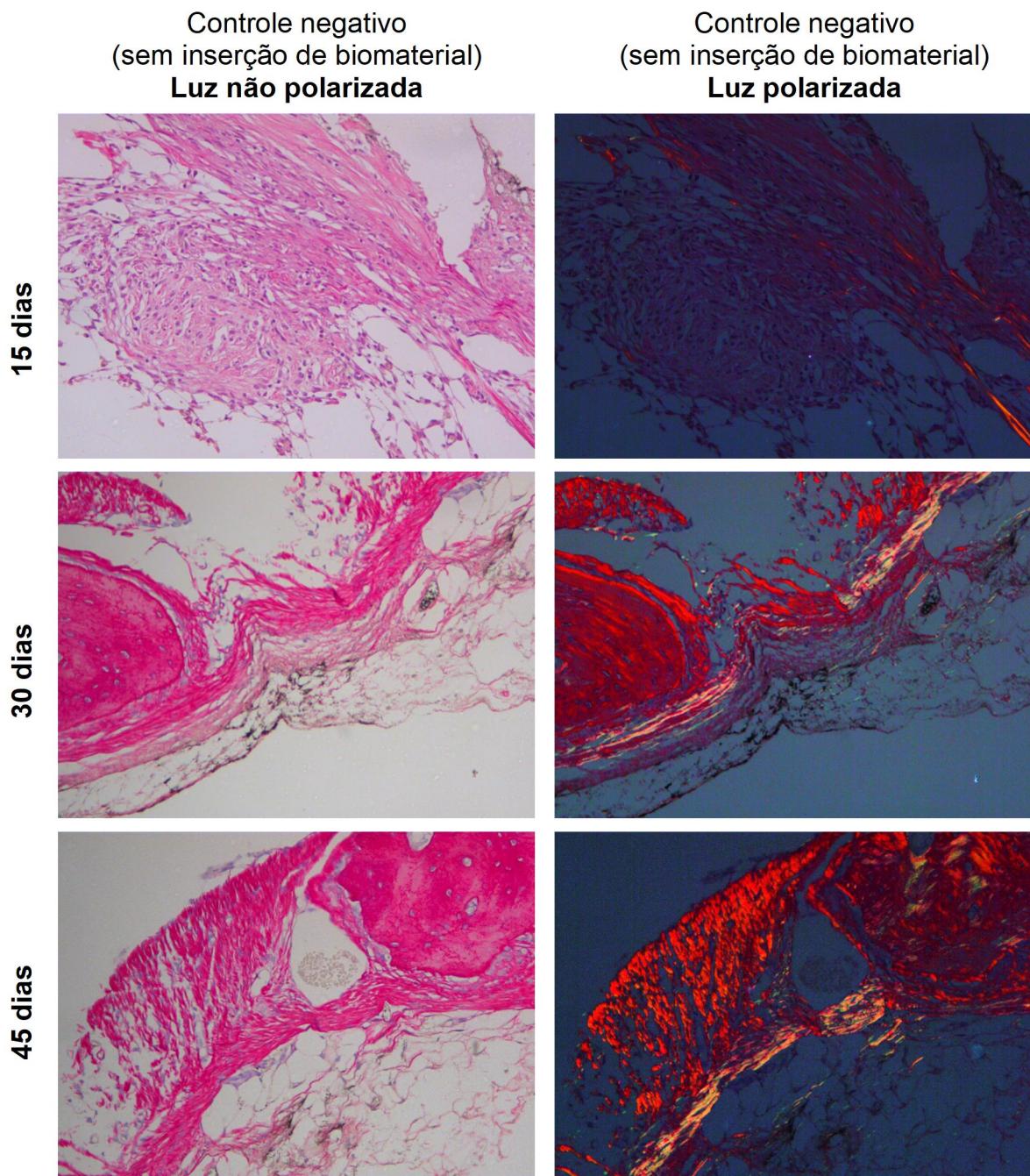
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: A descrição do processo inflamatório será feita em outro tópico. T1, T2 e T3 representam os tempos de sacrifício de 15, 30 e 45 dias após o procedimento.

5.5 Análise histológica pela coloração de *picrosirius red*

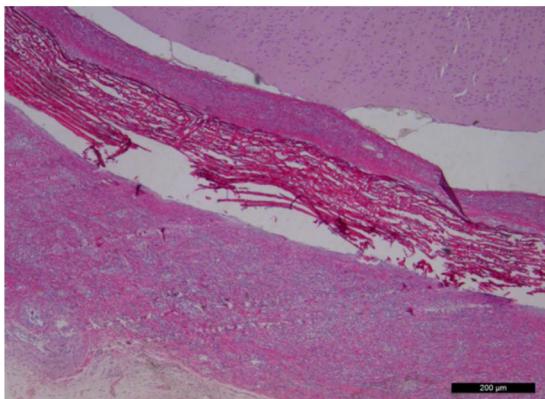
O colágeno foi visualizado pela técnica de *picrosirius*, conforme ilustrado a seguir (Figura 17).

Figura 17 – Perfil do colágeno total (vermelho), do tipo I (amarelo avermelhado) e do tipo III (verde esbranquiçado) em aumento de 200x após submissão a craniectomia e tratamento com a MDAPT, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (*sham*).

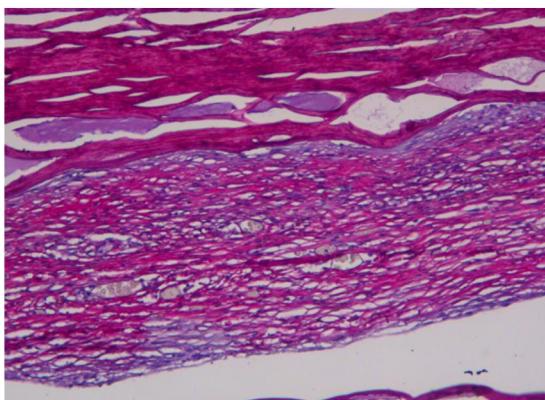


Grupo experimental (MDAPT)
Luz não polarizada

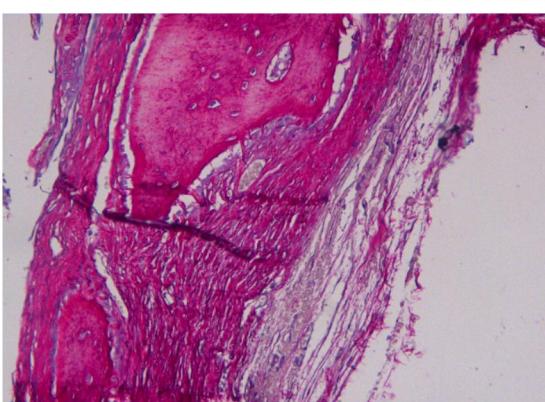
15 dias



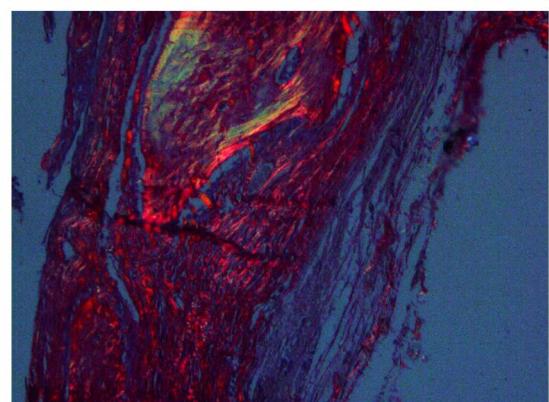
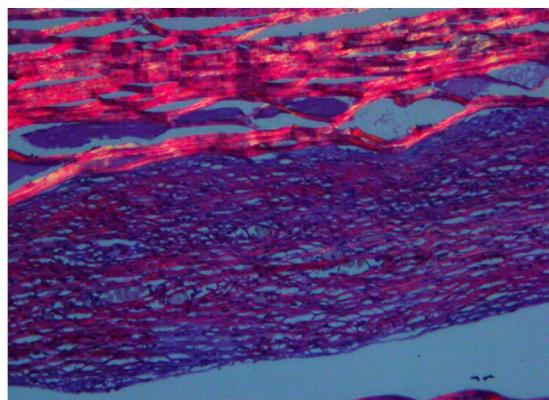
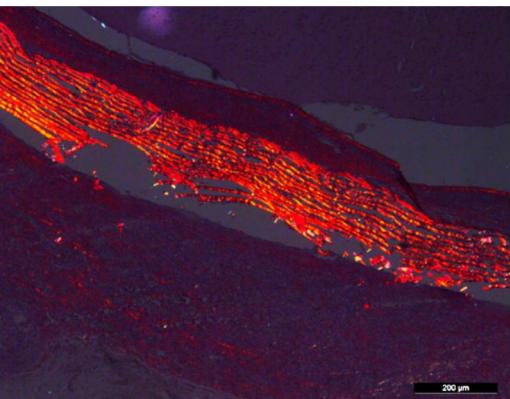
30 dias

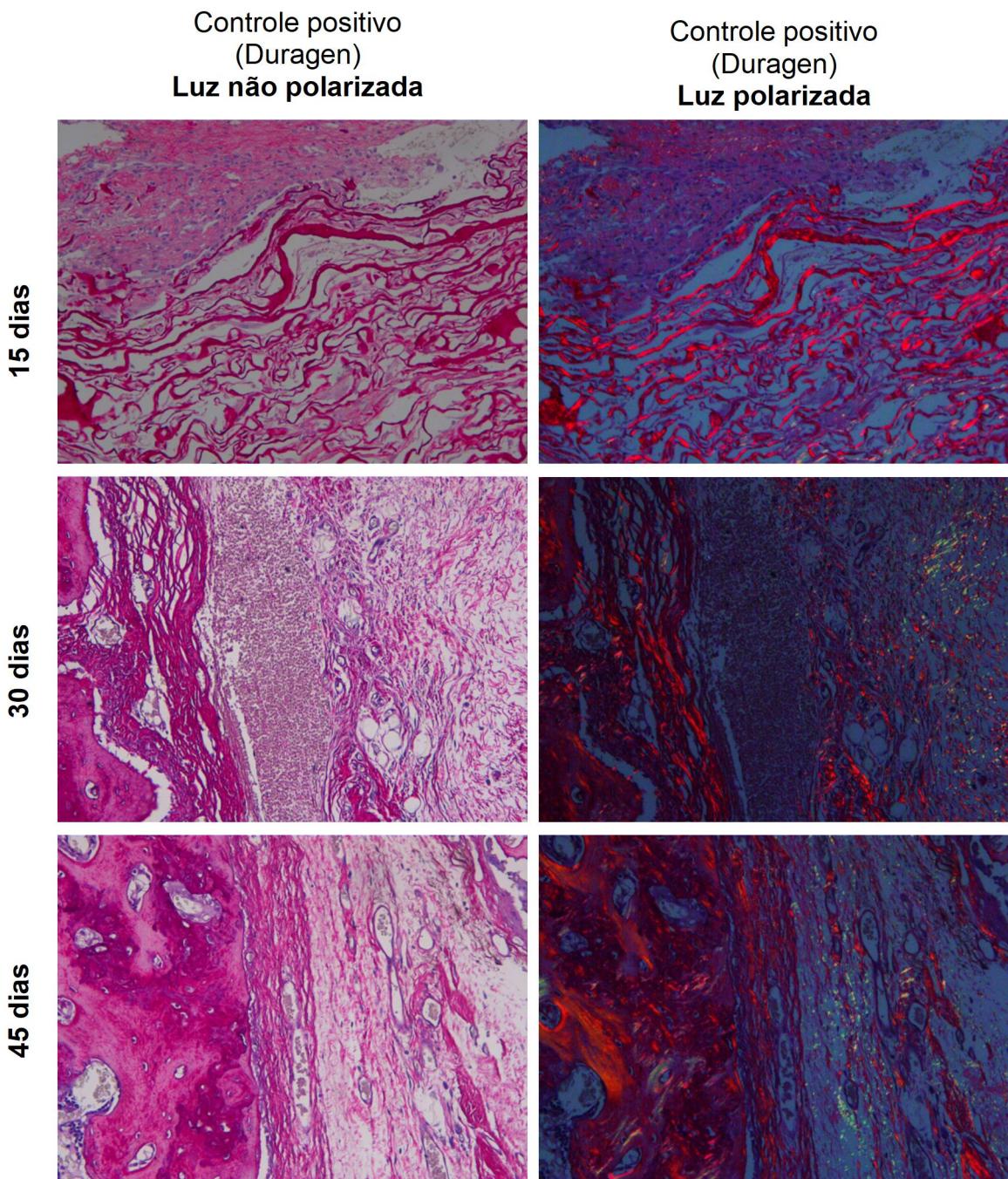


45 dias



Grupo experimental (MDAPT)
Luz polarizada



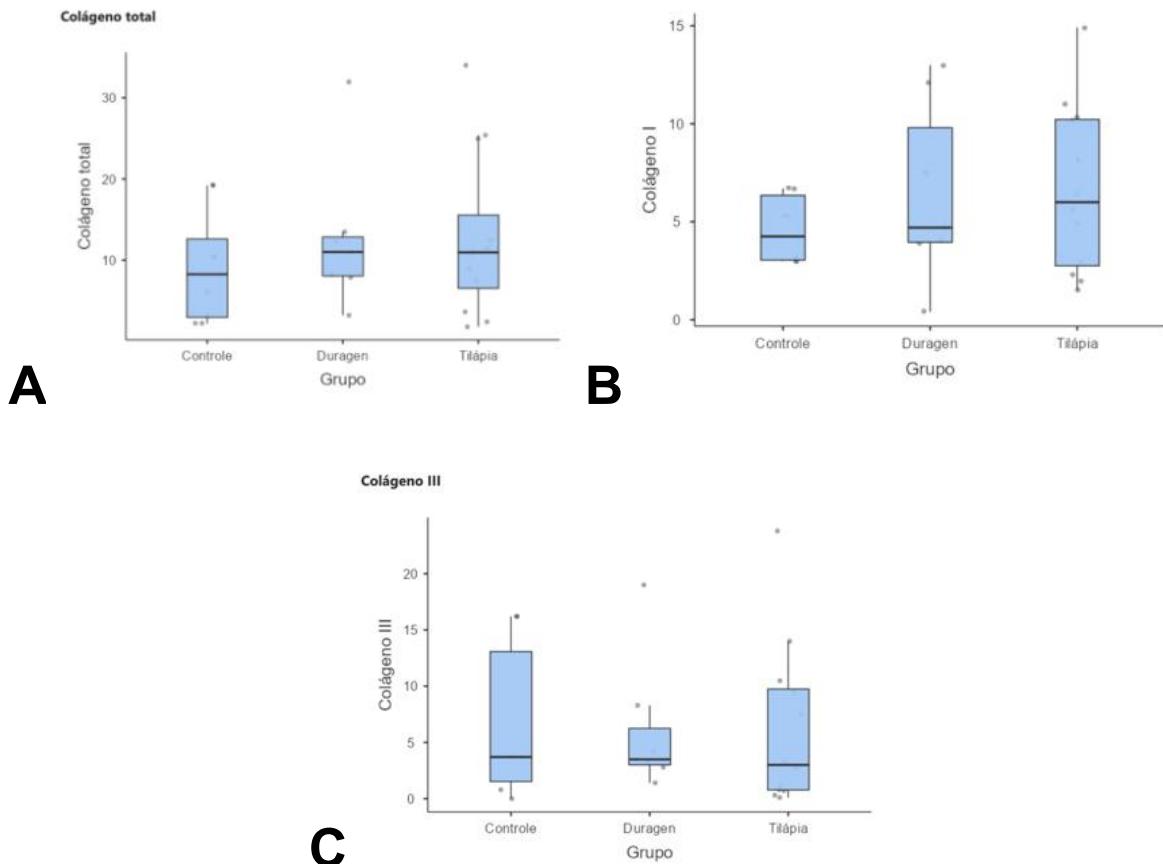


Fonte: Dados do experimento.

Legenda: Coloração de *picrosirius red*. Uma amostra após 15, 30 e 45 dias da craniectomia sem inserção de nenhum biomaterial (*sham*), seguida de uma duplicata (amostras 1 e 2) após 15, 30 e 45 dias da craniectomia tratada com a MDAPT e com a matriz comercial Duragen®, no aumento de 200x.

O colágeno total e os tipos I e III foram quantificados nas amostras. Não houve diferença significativa entre a quantidade de colágeno total ($p = 0,515$), do tipo I ($p = 0,781$) e do tipo III ($p = 0,814$) entre os grupos, independente do tempo de sacrifício (Figuras 18, 19 e 20).

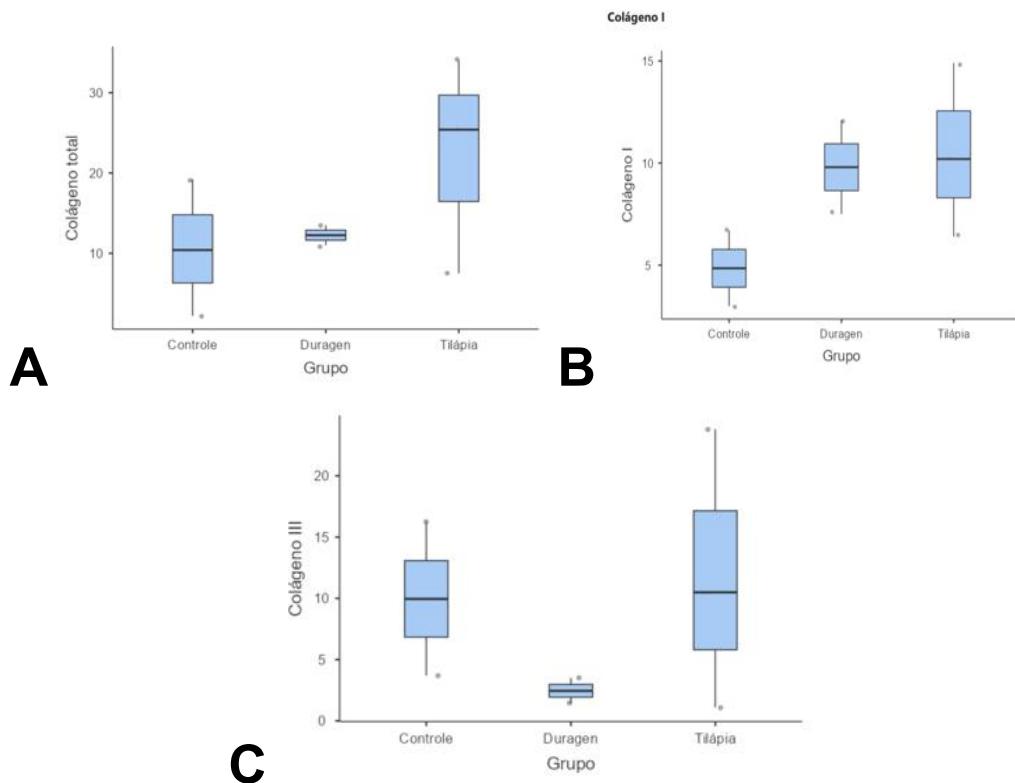
Figura 18 – Gráficos em barras evidenciando os valores de colágeno total, tipo I e tipo III quantificados em cada grupo (controle negativo, Duragen® e tilápia) aos 15 dias de tratamento (T1).



Fonte: Dados do experimento.

Nota: Nenhum dos grupos se destaca na quantificação de colágeno total, tipo I e tipo III nesse período de avaliação.

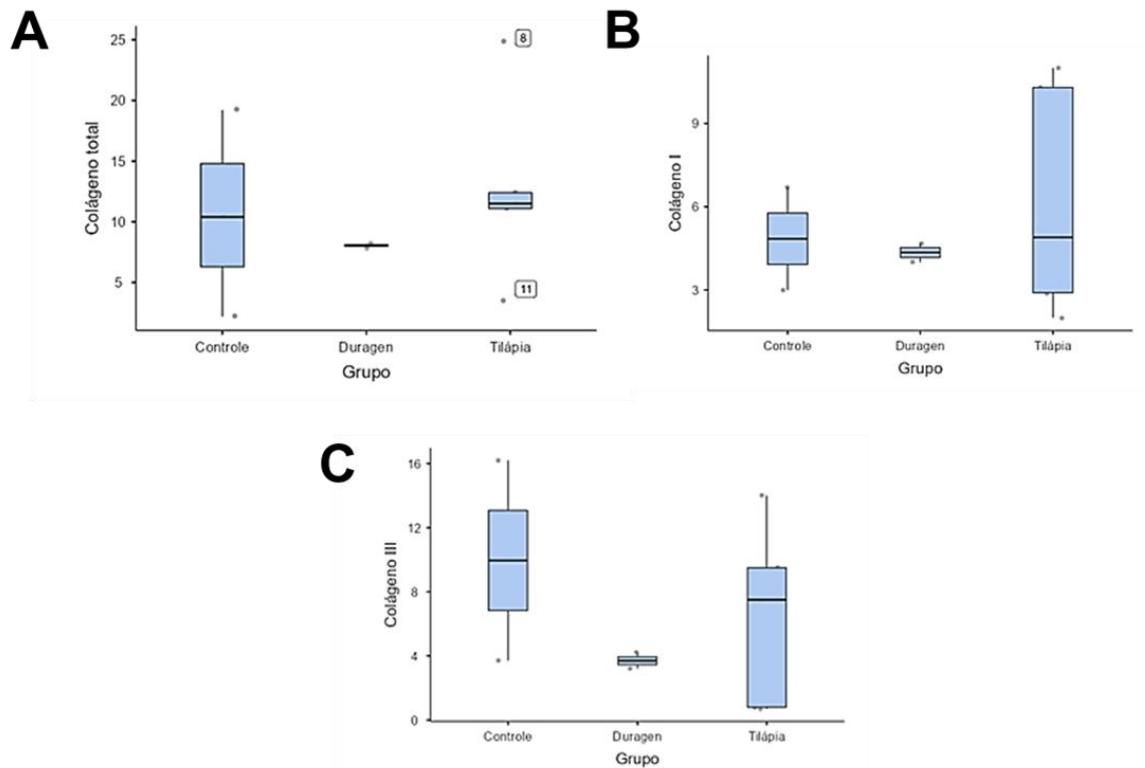
Figura 19 – Gráficos em barras evidenciando os valores de colágeno total, tipo I e tipo III quantificados em cada grupo (controle negativo, Duragen® e tilápia) aos 30 dias de tratamento (T2).



Fonte: Dados do experimento.

Nota: Nenhum dos grupos se destaca, significativamente, na quantificação de colágeno total, tipo I e tipo III nesse período de avaliação.Duragen®.

Figura 20 – Gráficos em barras evidenciando os valores de colágeno total (A), tipo I (B) e tipo III (C) quantificados em cada grupo (controle negativo, Duragen® e tilápia) aos 45 dias de tratamento (T3).



Fonte: Dados do experimento.

Nota: Nenhum dos grupos se destaca na quantificação de colágeno total, tipo I e tipo III nesse período de avaliação.

5.6 Análise do processo inflamatório

O processo inflamatório das amostras após a craniectomia foi classificado em ausente (0), discreto (1), moderado (2) e intenso (3), conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Análise do processo inflamatório das amostras das lâminas de hematoxilina-eosina (HE) em aumento de 200x após a craniectomia e o tratamento com a MDAPT, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (*sham*).

PROCESSO INFLAMATÓRIO DO DEFEITO CRANIANO EM DIFERENTES TEMPOS (DIAS)				
Grupos	15 dias	30 dias	45 dias	p-valor
MDAPT	2,5 (2-3)	2 (2-2)	1 (1-3)	0,095
Duragen®	2 (2-3)	1,5 (1-2)*	1,5 (1-2)	0,174
Controle Negativo (Sham)	1 (0-1)*	1 (0-1)*	1 (0-1)	1,000
p-Valor	0,011	0,035	0,183	

Fonte: Dados do experimento.

Nota: Dados expressos em forma de mediana (mínimo-máximo). *p < 0,05 versus demais tratamentos no mesmo dia (Teste Kruskal-Wallis/Dunn). Não há diferença entre os grupos MDAPT e matriz comercial Duragen® em 15 e 45 dias após a craniectomia. Porém, em 30 dias, o processo inflamatório no grupo Duragen® foi menor que o do grupo MDAPT. O grupo controle negativo (*sham*) apresentou menor intensidade de processo inflamatório que os demais em 15 dias; já em 30 dias, foi semelhante ao do grupo Duragen® e menos intenso que o do grupo tilápia. Em 45 dias, foi semelhante aos outros dois grupos (p = 0,183).

Foi observada diferença na intensidade do processo inflamatório entre os grupos e os tempos testados. Quando comparados aos 15 dias de tratamento, notou-se que o processo inflamatório foi estatisticamente menos intenso no grupo controle negativo (*sham*) em relação aos grupos matriz acelular de tilápia e Duragen®.

Observamos uma tendência de redução da intensidade do processo inflamatório em 30 e 45 dias nos grupos *scaffold* de tilápia e Duragen®, porém não foi significativa. Aos 30 dias de tratamento, o grupo *scaffold* de tilápia apresentou maior intensidade de processo inflamatório que os grupos Duragen® e *sham*. Não houve diferença significativa entre a inflamação observada nestes dois últimos grupos. Em 45 dias, não houve diferença na intensidade da inflamação entre os três grupos (p = 0,183).

Nos grupos sacrificados em 15 dias estavam presentes células polimorfonucleadas (leucócitos); e, em 30 dias, células mononucleares (linfócitos, histiócitos e plasmócitos). Inicialmente, tanto o grupo que recebeu o *scaffold* de tilápia quanto o grupo Duragen® apresentaram atividade inflamatória intensa, com presença de células polimorfonucleares. Progressivamente, ambos exibiram uma diminuição da intensidade da inflamação para leve ou moderada.

5.7 Análise imuno-histoquímica

5.7.1 Marcação de MDM2 em miofibroblastos

Os miofibroblastos com marcação de MDM2 são células identificadas pela morfologia fusiforme e pela coloração acastanhada. A contagem dessas células foi realizada com magnificação de 400x, em corte coronal ao defeito craniano, em todos os grupos, evidenciando os resultados a seguir (Figura 21).

Observou-se diferença significativa na contagem de miofibroblastos pela coloração MDM2 entre o grupo tilápia e os demais, em T1 (sacrifício em 15 dias após o procedimento) e T2 (sacrifício em 30 dias após o procedimento), com $p = 0,016$ e $0,002$ respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 – Análise de miofibroblastos utilizando a marcação imuno-histoquímica MDM2 no aumento de 400x, após a craniectomia e o tratamento com o *scaffold* oriundo da pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (*sham*).

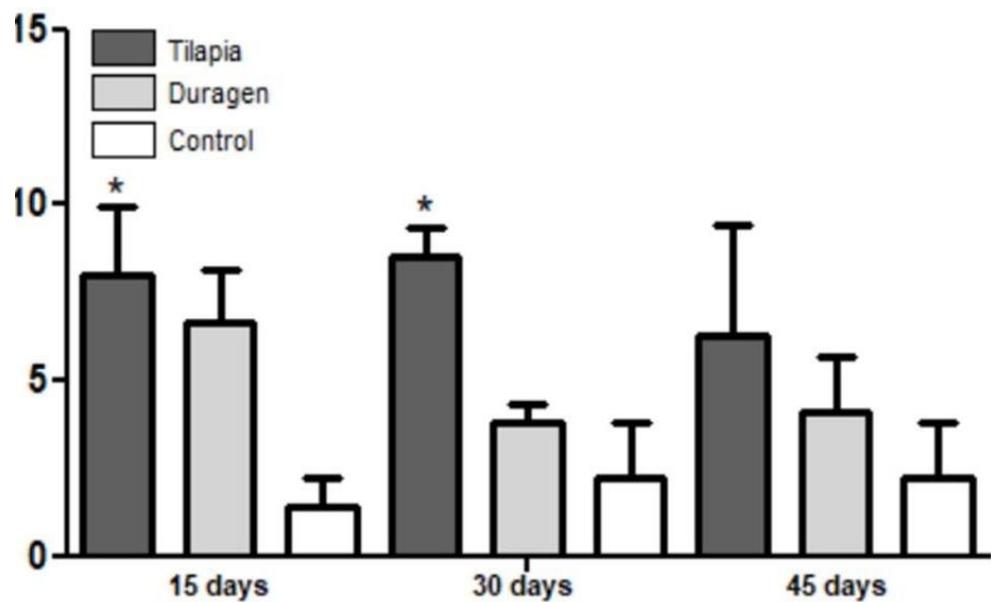
CONTAGEM DE MIOFIBROBLASTOS COM MARCAÇÃO DE MDM2 EM DIFERENTES INSTANTES APÓS A CRANIECTOMIA

Grupos	15 dias	30 dias	45 dias	p-valor
MDAPT	$8,0 \pm 4,7^*$	$8,5 \pm 2,0^*$	$6,3 \pm 7,7$	0,755
Duragen®	$6,7 \pm 3,6$	$3,8 \pm 1,4$	$4,1 \pm 4,0$	0,262
Sham	$1,4 \pm 2,0$	$2,2 \pm 3,9$	$2,0 \pm 3,7$	0,888
p-Valor	0,016	0,002	0,453	

Fonte: Dados do experimento.

Legenda: Dados expressos em forma de mediana (mínimo-máximo). * $p < 0,05$ versus demais tratamentos no mesmo dia (Teste Kruskal-Wallis/Dunn). Há diferença entre o *scaffold* e os demais grupos após 15 dias da craniectomia. Após 30 dias, a MDAPT e o Duragen® foram significativamente diferentes entre si, com a maior contagem de MDM2 observada no grupo da MDAPT.

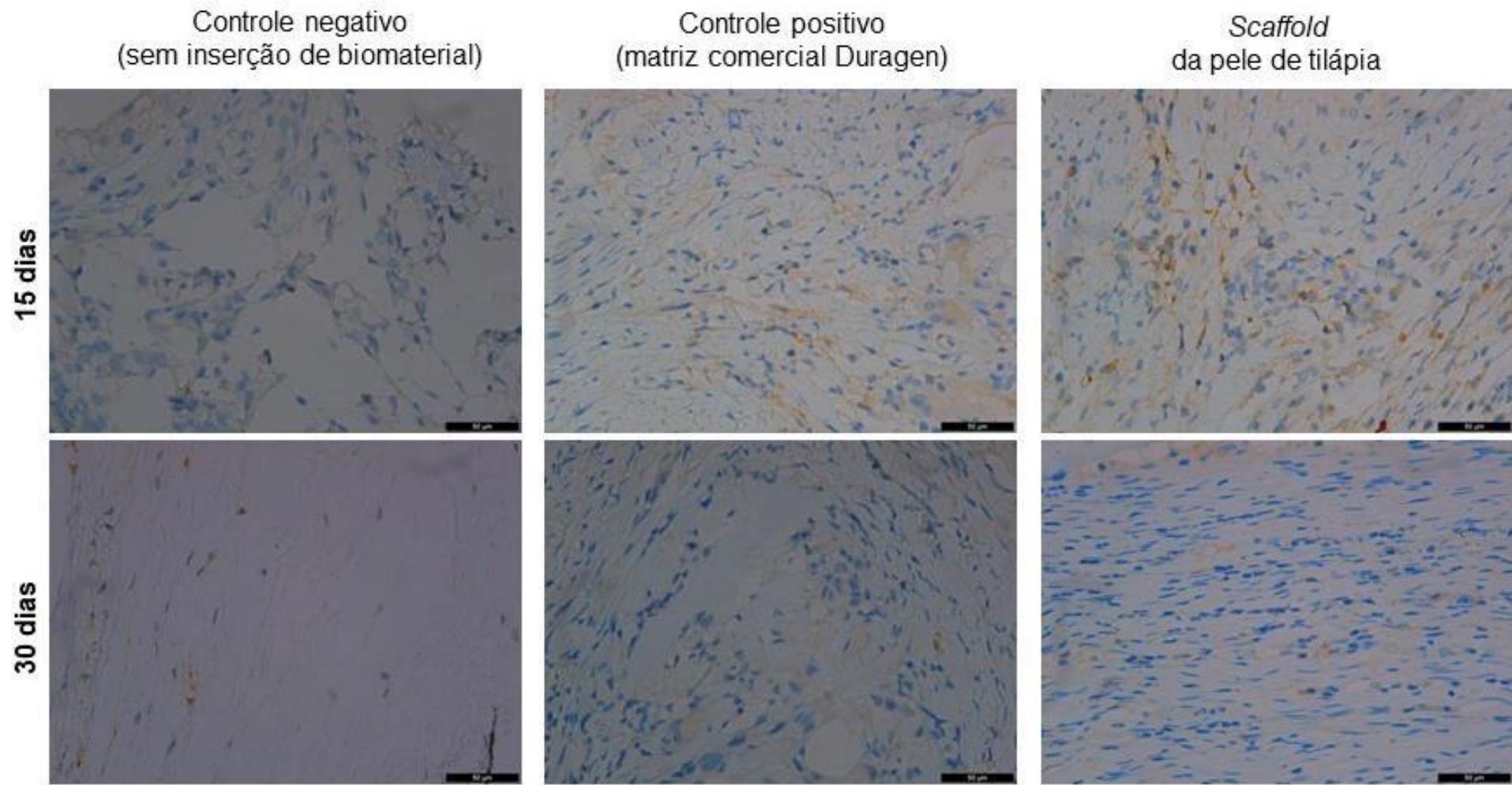
Figura 21 – Análise de miofibroblastos utilizando a marcação imuno-histoquímica de MDM2, no aumento de 400X, após submissão dos animais à craniectomia e tratamento com o *scaffold* oriundo da pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (*sham*).



Fonte: Dados do experimento.

Legenda: Eixo X: diferentes tempos de aferição (15, 30 e 45 dias após a craniectomia); eixo Y: número de miofibroblastos. Nos tempos de 15 e 30 dias, há maior quantidade de miofibroblastos no grupo de *scaffold* de tilápia (Kruskal-Wallis/Dunn) ($p = 0,016$ e $p = 0,002$, respectivamente); e, em 45 dias, não há diferença significativa entre os grupos ($p = 0,453$).

Figura 22 – Análise de miofibroblastos com marcação imuno-histoquímica de MDM2 no aumento de 400x.



Fonte: Dados do experimento.

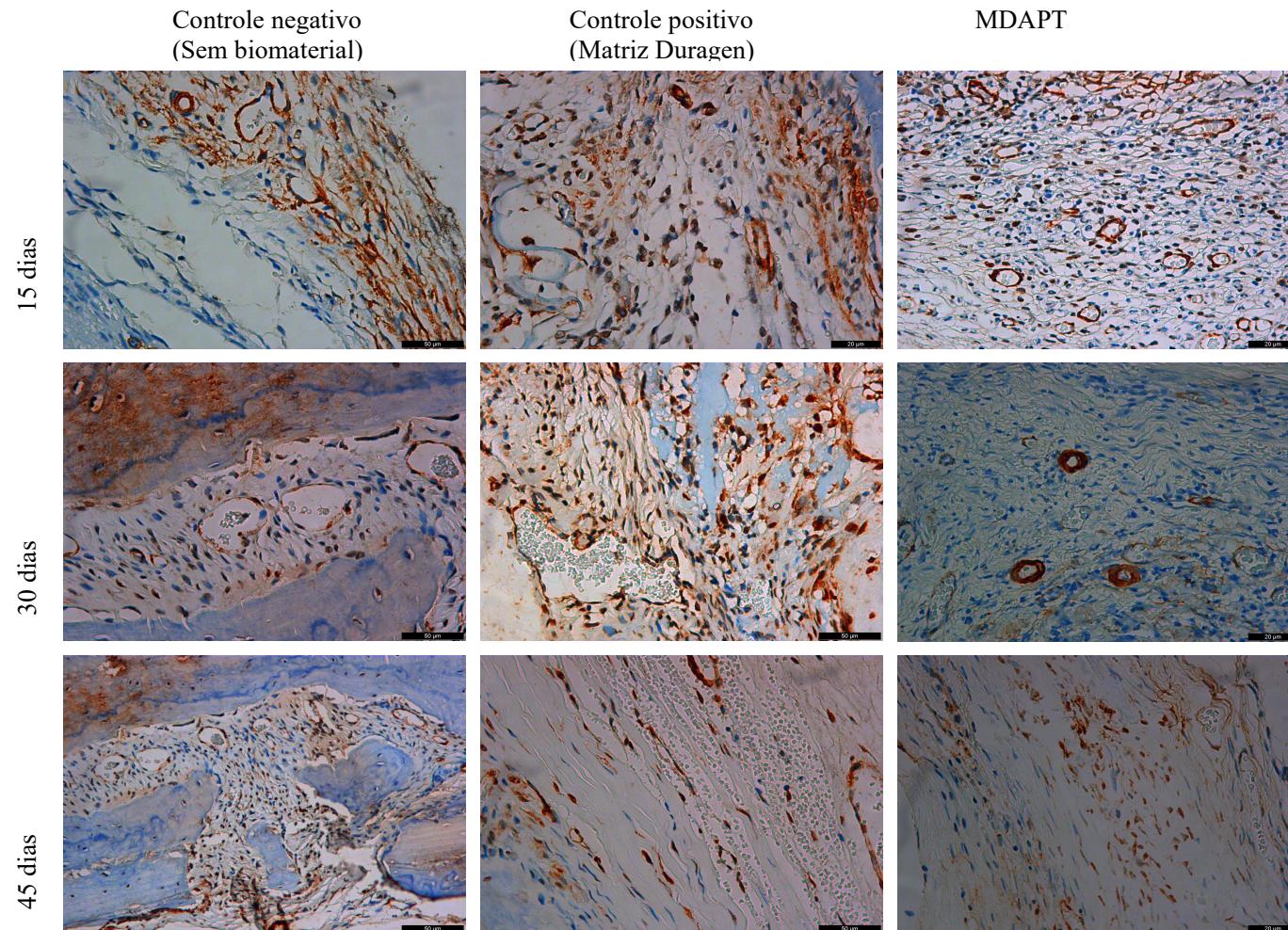
Em 15 e 30 dias após a craniectomia, no grupo tratado com o *scaffold* de tilápia, foi constatada uma maior quantidade de miofibroblastos em relação aos demais grupos e tempos testados. A contagem de miofibroblastos, nesses tempos de avaliação, não apresentou diferença significativa entre os grupos Duragen® e *sham* ($p = 0,453$). Já na avaliação dos grupos de animais sacrificados em 45 dias, não houve diferença na contagem de miofibroblastos entre todos os grupos (Tabela 5 e Figura 22).

5.7.2 Miofibroblastos marcados com alfa-actina de músculo liso

As amostras dos animais sacrificados aos 15, 30 e 45 dias após a craniectomia foram submetidas à marcação de alfa-actina de músculo liso e analisadas, conforme mostrado na Figura 23.

Entre os grupos sacrificados em 15 dias após a craniectomia (T1), não houve diferença na contagem de miofibroblastos pela marcação com alfa-actina de músculo liso. Já nos grupos de animais sacrificados em 30 dias (T2), o Duragen® apresentou maior quantidade de miofibroblastos que os grupos de MDAPT e controle negativo ($p < 0,001$). Finalmente, nos grupos sacrificados em 45 dias (T3), o de MDAPT e o de Duragen® mostraram contagem de miofibroblastos maiores que o controle negativo ($p = 0,006$) (Tabela 6 e Figura 24).

Figura 23 – Análise de miofibroblastos utilizando a marcação imuno-histoquímica de alfa-actina de músculo liso, no aumento de 400x, após a craniectomia e o tratamento com o *scaffold* de pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (*sham*).



Fonte: Dados do experimento.

Nota: O Duragen® apresentou significativamente os maiores quantitativos de miofibroblastos, em 30 e 45 dias da craniectomia. Em 15 dias, não houve diferença entre os grupos ($p=0,073$), análise por teste Kruskal-Wallis/Dunn.

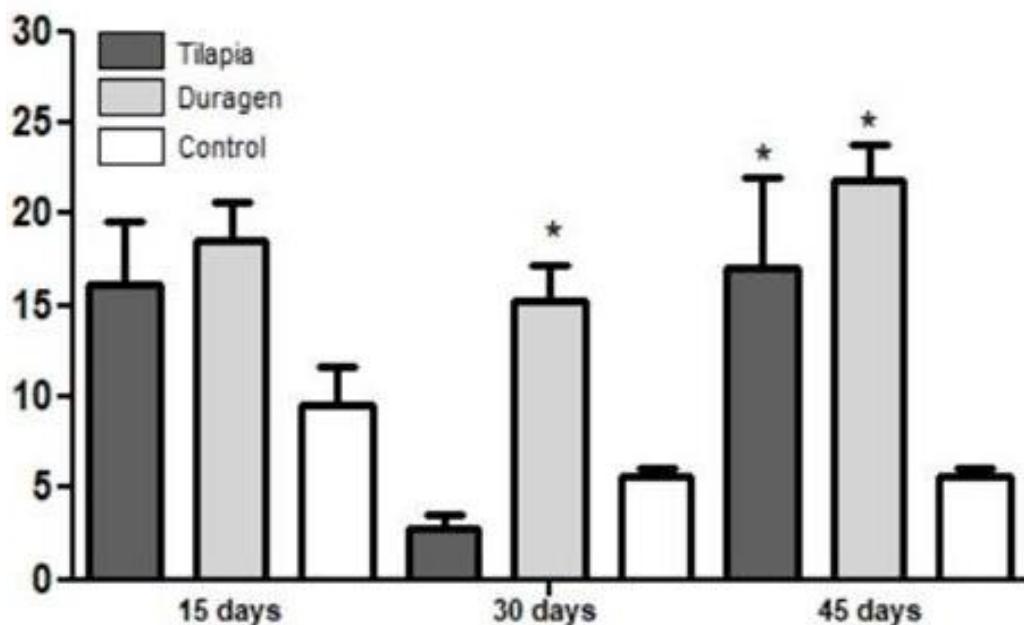
Tabela 6 – Análise de miofibroblastos utilizando a marcação imuno-histoquímica de alfa-actina de músculo liso, no aumento de 400x, após submissão dos animais à craniectomia e tratamento com a MDAPT, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (*sham*).

CONTAGEM DE MIOFIBROBLASTOS COM MARCAÇÃO DE ALFA-ACTINA DE MÚSCULO LISO EM DIFERENTES INSTANTES APÓS A CRANIECTOMIA				
Grupos	15 dias	30 dias	45 dias	p-valor
MDAPT	16,1 ± 8,7	2,9 ± 1,6	17,1 ± 12,1	0,021
Duragen®	18,6 ± 4,9	15,2 ± 4,9*	21,8 ± 4,9*	0,097
Sham	9,6 ± 4,9	5,7 ± 0,9	5,2 ± 0,8	0,052
p-Valor	0,073	< 0,001	0,006	

Fonte: Dados do experimento.

Nota: Dados expressos em forma de mediana (mínimo-máximo). *p < 0,05 *versus* demais tratamentos no mesmo dia (Teste Kruskal-Wallis/Dunn). O Duragen® apresentou significativamente os maiores quantitativos de miofibroblastos, em 30 e 45 dias da craniectomia. Em T1 (sacrifício em 15 dias após o procedimento), não houve diferença nos grupos entre si (p = 0,073).

Figura 24 – Análise de miofibroblastos utilizando a marcação imuno-histoquímica de alfa-actina de músculo liso, no aumento de 400x, após submissão dos animais à craniectomia e tratamento com o *scaffold* de pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (*sham*).



Fonte: Dados do experimento.

Nota: Dados expressos em forma de mediana (mínimo-máximo). *p < 0,05 versus demais tratamentos no mesmo dia (Teste Kruskal-Wallis/Dunn). Após 15 dias, não houve diferença entre os grupos (p = 0,073). O grupo Duragen® apresentou significativamente os maiores quantitativos de miofibroblastos, após 30 da craniectomia. Os grupos Duragen e Tilápia apresentaram maior número de miofibroblastos que o grupo controle em 45 dias (p=0,006).

5.7.3 Contagem de neovasos marcados com alfa-actina de músculo liso

A contagem de vasos foi realizada no aumento de 200X e com marcação de alfa-actina de músculo liso. No tempo de sacrifício de 15 dias após a craniectomia (T1), não houve diferença significativa na contagem de vasos entre os diferentes grupos (p = 0,102). Aos 30 dias após a craniectomia (T2), o grupo que recebeu *scaffold* acelular de pele de tilápia apresentou quantidade significativamente maior de vasos em relação aos demais, com p = 0,048 (Tabela 7). Já no tempo de 45 dias após a craniectomia (T3), não houve diferença significativa entre os grupos, com p = 0,473.

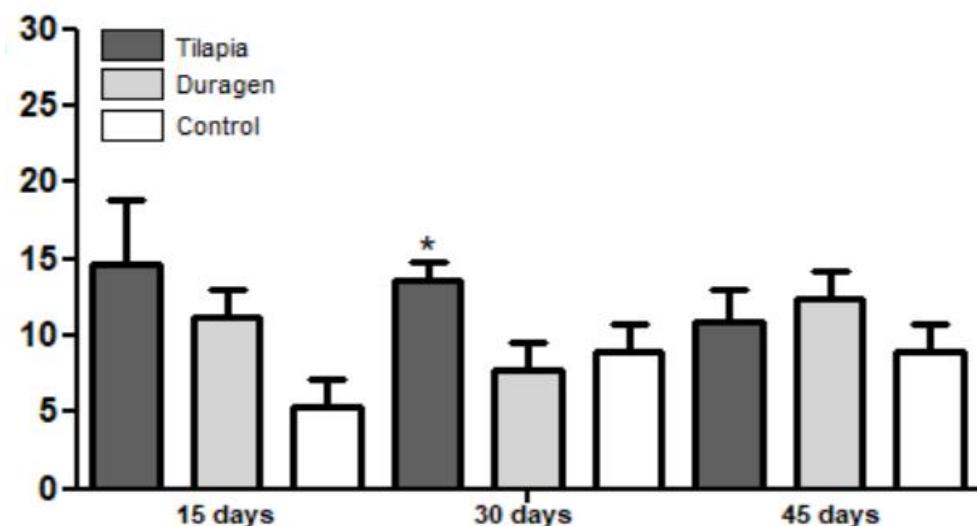
Tabela 7 – Análise de neovasos utilizando a marcação imuno-histoquímica de alfa-actina de músculo liso, no aumento de 200x, após submissão dos animais à craniectomia e tratamento com o *scaffold* oriundo da pele de tilápia, com a matriz comercial Duragen® e sem nenhum tratamento (*sham*).

CONTAGEM DE NEOVASOS COM MARCAÇÃO DE ALFA-ACTINA DE MÚSCULO LISO EM DIFERENTES INSTANTES APÓS A CRANIECTOMIA				
Grupos	15 dias	30 dias	45 dias	p-valor
MDAPT	14,6 ± 10,4	13,7 ± 2,8*	10,9 ± 5,2	0,637
Duragen®	11,3 ± 4,4	7,8 ± 4,4	12,4 ± 4,4	0,204
Sham	5,4 ± 4,4	9,0 ± 4,4	8,4 ± 4,4	0,293
p-Valor	0,102	0,048	0,473	

Fonte: Dados do experimento.

Nota: Dados expressos em forma de média, * $p < 0,05$ versus demais grupos da mesma coluna (Teste Kruskal-Wallis/Dunn). Em 30 dias após a craniectomia, o grupo de tilápia apresentou maior número de vasos que os grupos Duragen® e de controle negativo ($p = 0,048$). Nas outras avaliações temporais, aos 15 e 45 dias após a craniectomia, não houve diferença significativa.

Figura 25 – Gráfico em barras mostrando a contagem de vasos com marcação de alfa-actina de músculo liso (eixo Y) dos grupos MDAPT, Duragen® e controle negativo, aos 15, 30 e 45 dias após a craniectomia (eixo X).



Fonte: Dados do experimento.

Nota: Apenas no tempo de 30 dias após a craniectomia há diferença significativa entre os grupos, sendo que o grupo da tilápia tem maior quantidade ($p=0,048$).

6 DISCUSSÃO

Um biomaterial ideal para a substituição dural deve fornecer reparo e restauro efetivos no local do defeito (LI *et al.*, 2017, 2019). Neste estudo, a matriz proteica acelular (*scaffold*) oriunda da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) foi utilizada pela primeira vez em um procedimento cirúrgico de craniectomia em animais. A avaliação clínica pós-cirúrgica foi essencial para verificar a restauração da integridade tissular e a manutenção da homeostasia nos animais operados (ONO *et al.*, 2014).

6.1 Biocompatibilidade e estudos experimentais

A dura-máter humana tem uma camada externa aderida ao crânio, a dura periosteal, e outra interna em contato com as leptomeninges, a dura meníngea (KHURANA *et al.*, 2024). O reparo de ambas as camadas ocorre a partir de proliferação de fibroblastos e do desenvolvimento de fibras do tecido conectivo, o que gera a necessidade de substitutos durais para conter o conteúdo encefálico e estruturar a reparação dural enquanto ela ocorre (KHURANA *et al.*, 2024).

O substituto dural derivado da pele de tilápia, introduzido nesta tese, atua como uma estrutura que facilita a migração e a integração de diferentes tipos de células produtoras de fibras de colágeno, fibras elásticas e glicoproteínas (KHURANA *et al.*, 2024), ao mesmo tempo que fibroblastos e outras células liberam metaloproteinases capazes de degradá-lo lentamente, facilitando sua absorção.

Neste estudo, observamos que todos os animais apresentaram boa evolução clínica relacionadas ao aspecto da ferida operatória, comportamento e marcha. Isso indica que houve uma evolução favorável frente ao impacto cirúrgico no grupo controle negativo e de cirurgia somada à aposição das matrizes proteicas nos grupos experimental e controle positivo.

Em estudos experimentais de biocompatibilidade de enxertos durais, são considerados os seguintes parâmetros de qualidade do produto: uma análise histológica satisfatória, a aderência ou inaderência ao córtex cerebral, o desenvolvimento ou não de fistula liquórica e a incorporação do *scaffold* aos tecidos circunjacentes ou sua persistência no local de inserção.

O estudo em humanos para avaliação de substituto dural derivado de colágeno bovino Duradry® baseou-se em avaliações clínicas e radiológicas para detecção de fistula, infecção, pseudomeningocele, meningite e hidrocefalia (COSTA *et al.*, 2010). Os exames

realizados foram tomografia computadorizada (TC) de crânio (em 30 e 60 dias), para avaliação de hemorragia, e ressonância nuclear magnética (RMN) de crânio em alguns casos, para verificação de processos inflamatórios. É importante salientar que a inflamação, quando regulada, compõe o processo cicatricial normal e admissível ao substituto dural, que não deve provocar resposta inflamatória desregulada e potencialmente danosa ao sistema nervoso central.

Observamos, no nosso estudo experimental, que o processo inflamatório culmina em uma etapa que promove a substituição do *scaffold* de colágeno enxertado por tecido conjuntivo, na medida em que os fibroblastos do próprio receptor aderem e permeiam a membrana de colágeno. Portanto, o *scaffold* ideal deve gerar uma resposta inflamatória, mas ela não pode ser muito intensa ou muito prolongada a ponto de causar dano tecidual circunjacente, que seria expresso por deiscência de ferida, lesão neurológica associada ou não à sintomatologia clínica e meningismo por etiologia asséptica ou infecciosa. O fato de um estudo não observar esses sintomas ou não visualizar alterações radiológicas nos exames de TC e RMN de crânio não significa que não houve processo inflamatório; na verdade, não houve exacerbação indesejada dessa resposta.

Os estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* devem preceder aqueles feitos em humanos, porque assim é possível quantificar o processo inflamatório e descartar materiais que provoquem reações indesejadas nessa fase. Nesse contexto, discutiremos a seguir alguns resultados de estudos experimentais realizados com *scaffold* sintético e derivados de colágeno, conforme o Quadro 4.

Quadro 4 – Estudos experimentais de substitutos durais em modelos animais.

ESTUDO	ANIMAL	MATERIAL EM ESTUDO	MATERIAIS COMPARADOS	CRANIECTOMIA	AVALIAÇÃO CLÍNICA	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA	TEMPO DE AVALIAÇÃO
Presente estudo	Ratos	Matriz dérmica acelular de pele de tilápia	Duragen® (Integra LifeSciences Corporation)	Parietal à direita	Ganho de peso, FL, aspecto da FO	Intensidade do processo inflamatório, fechamento da calota craniana, quantificação de colágeno, IHQ	15, 30 e 45 dias
Deng <i>et al.</i> , 2016	Cão	Material sintético de PLLA	Codman ETHISORB Dura Patch® (Johnson & Johnson) eDuragen® (Integra LifeSciences Corporation)	Duas: parietal à direita e à esquerda	FL e aspecto FO	Intensidade do processo inflamatório (0 a 3)	30 e 90 dias
Chumna nvej <i>et al.</i> , 2020	Coelho	Material sintético ORC+PCL	Enxerto de gálea autóloga	Parietal à direita	FL e infecção sistêmica	Intensidade de processo inflamatório, IHQ	30, 60, 180 dias
Karkuck <i>et al.</i> , 2021	Rato	TachoComb® (Takeda Pharmaceutical Company)	TissuDura® (Baxter)	Parietal à esquerda	Comportamento, FL e aspecto da FO	Intensidade de processo inflamatório	21 dias
Neulen <i>et al.</i> , 2011	Porco	BCM (B. Braun Aesculap)	Duragen® (Integra LifeSciences Corporation)	Parietal à esquerda*	Aspecto da FO	Intensidade de processo inflamatório	30 e 60 dias

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: BCM: *bilayered collagen matrix* (matriz de bicamada de colágeno); FL: fistula liquórica; FO: ferida operatória; IHQ: imuno-histoquímica; PLLA: poli-L-ácido-lático; ORC: celulose oxidada regenerada; PCL: poli(ε-caprolactona); PIC: pressão intracraniana. *Além da craniectomia parietal à esquerda, foi realizada uma trepanação frontal à direita para implante de cateter de monitorização de pressão intracraniana.

Um estudo experimental de duroplastia em cães foi realizado para avaliação de um substituto dural sintético absorvível, em comparação com os produtos comerciais Codman Ethisorb Dura Patch® e o Duragen® Dural Graft Matrix (DENG *et al.*, 2016). Enquanto o primeiro substituto dural comercial é composto por material sintético absorvível (poligalactina 910 e poli-p-dioxonona, ou PDS), o segundo é constituído por colágeno de tendão bovino. A cirurgia foi realizada por uma incisão na linha média e craniectomias nas regiões parietais direita e esquerda, sob as quais foi realizada a duroplastia com cada enxerto. Foram utilizados parâmetros clínicos e histológicos para avaliação da biocompatibilidade e detecção de fistula liquórica, observação macroscópica da ferida e avaliação microscópica aos 30 e 90 dias após a implantação cirúrgica dos materiais.

Na análise microscópica, foram avaliados a presença de adesão ao córtex e o processo inflamatório, graduado de 0 a 3 (nenhum, leve, moderado e intenso). Macroscopicamente, não foram observados, em nenhum dos grupos avaliados (Dura Patch®, Duragen® e PLLA), sinais de infecção, deiscência de ferida, abaulamento da pele ou fistula liquórica. Na avaliação de 30 dias, do ponto de vista macroscópico, a falha dural estava completamente fechada, preenchida por tecido fibroso, sem diferenciação entre a dura-máter original e o enxerto utilizado para fechamento. No grupo suturável, foram constatadas áreas de adesão ao encéfalo, tanto no lado em que se usou PLLA quanto naquele em que se usou Dura Patch®. Na avaliação de 90 dias, observou-se adesão ao encéfalo apenas no grupo receptor de Dura Patch®.

Na avaliação microscópica após 30 dias, todos os enxertos estavam circundados extensivamente por fibroblastos, mas havia neovascularização mais abundante circunjacente ao Duragen® e ao PLLA em relação ao Dura Patch®. Ainda nesse instante, notou-se que havia um processo inflamatório leve circunjacente à membrana de PLLA, usada de forma não suturável, e à de Duragen®. Porém, a inflamação foi considerada mais intensa nas adjacências às membranas de Dura Patch® e de PLLA no uso suturável. Mesmo assim, em nenhum grupo foram observados necrose ou dano tecidual encefálico. Na avaliação de 90 dias, o processo inflamatório estava bem mais reduzido, e todos os 3 materiais foram substituídos por tecido conectivo altamente vascularizado, semelhante à dura-máter. O processo inflamatório entre os grupos foi similar, sendo composto por poucos linfócitos e reação de células gigantes multinucleadas.

O experimento desta tese foi realizado com introdução dos *scaffolds* no espaço epidural, em contato com a delgada dura-máter de *Rattus norvegicus*, e os resultados foram semelhantes aos observados no grupo sem sutura do estudo de Deng *et al.* (2016). Realizou-se

a craniectomia apenas na região parietal direita, optando-se por não utilizar outra área nem mesmo para um controle sem uso de substituto dural, pois avaliou-se que tal uso poderia acrescentar o viés da contaminação de um sítio para o outro. Na análise clínica, não foi observada deiscência ou infecção de ferida operatória, assim como abaulamento da pele ou fistula liquórica em nenhum animal.

Do ponto de vista macroscópico, houve uma formação de tecido conectivo vedando o local da craniectomia nos animais em que foram utilizados os enxertos de matriz rica em colágeno. Esse tecido foi observado já aos 15 dias após a intervenção cirúrgica, quando estava entremeado entre as fibras de colágeno xenogênico, remanescentes das matrizes exógenas inseridas no espaço epidural. Nesse instante, o tecido que preenchia a falha óssea ainda era majoritariamente formado por fibras provenientes dos dispositivos exógenos, o que demonstra a biocompatibilidade desses produtos com as células do hospedeiro. Contudo, aos 30 dias, o tecido era fundamentalmente composto por fibroblastos, sem fibras remanescentes de colágeno xenogênico no grupo Duragen®, mas com poucas fibras remanescentes no grupo *scaffold* de pele de tilápia. Aos 45 dias, o tecido conectivo era formado apenas por fibroblastos, sem fibras remanescentes em ambos os grupos receptores de telas biológicas. Diferentemente do estudo de Deng *et al.* (2016), este trabalho incluiu um grupo de controle negativo (*sham*), em que nenhum enxerto foi introduzido. Neste, não se observou a formação do tecido conectivo na área de craniectomia, o que sugere um primeiro benefício da utilização de *scaffold* rico em colágeno: a barreira mecânica que evita a comunicação do espaço subgaleal e da pele com o tecido encefálico e a dura-máter.

Na análise microscópica, constatou-se que, em 15 dias, já havia pouco ou nenhum processo inflamatório (intensidade 1 e 0, respectivamente) no grupo não submetido ao implante de matriz exógena e, em 30 dias, alguns animais já não apresentavam nenhum processo inflamatório ou aumento de vascularização. Nos grupos submetidos aos *scaffolds* ricos em colágeno, pôde-se observar processo inflamatório variando de moderado a intenso (intensidade 2 e 3, respectivamente) em 15 dias; de leve a moderado no período de 30 dias; e leve em 45 dias. Em 15 dias, os grupos com enxertos de biomateriais apresentaram processos inflamatórios de intensidades estatisticamente iguais entre si. Ainda que, no instante de 30 dias, o grupo do *scaffold* de tilápia tenha apresentado um processo inflamatório pouco mais acentuado, aos 45 dias notou-se semelhança intensidade de inflamação baixa e significativamente igual entre os grupos de tilápia e Duragen®. O processo inflamatório tornou-se progressivamente mais brando a cada tempo observado: 15, 30 e 45 dias. Ademais,

em nenhum dos dois grupos foi observado dano encefálico ou processo inflamatório na duramáter adjacente ao enxerto, assim como não foram vistas aderências ao tecido encefálico.

Um estudo experimental para avaliação de uma membrana sintética de duas camadas de celulose oxidada regenerada/poli(ϵ -caprolactona) (ORC/PCL) como substituto dural, em comparação com enxerto de gálea autóloga, foi realizado em modelo de coelhos (CHUMNANVEJ *et al.*, 2020). A craniectomia foi feita apenas na região parietal direita dos coelhos, após a realização de uma incisão na linha média, e o estudo baseou-se em avaliação de parâmetros clínicos, tais quais fistula liquórica e infecção sistêmica. Na avaliação macroscópica, não se observaram aderências do enxerto a estruturas encefálicas adjacentes. A avaliação microscópica foi realizada pela técnica de hematoxilina-eosina e coloração de Masson, e constatou a formação de tecido conectivo de forma similar em ambos os grupos experimentais (membrana sintética e gálea).

Além da formação de tecido conjuntivo, o trabalho de Chumnanvej *et al.* (2020) avaliou ainda a presença de vascularização, a reação a corpo estranho, a atividade osteoclástica e a formação óssea. A vascularização foi visualizada em todos os grupos, sendo maior no grupo com a membrana estudada do que no pericrânio, e decresceu com o aumento do tempo pós-operatório avaliado. Curiosamente, houve crescimento ósseo nas membranas avaliadas, todavia os autores afirmaram desconhecer as razões para essa observação, sugerindo necessitar de outro estudo para entender essa propriedade. Assim como esperado, os enxertos foram degradados progressivamente com o tempo, porém, após 6 meses, apenas o grupo com enxerto autólogo apresentava o tecido dural estudado com tecidos indistintos entre a área enxertada e a área com a dura não enxertada. A avaliação do processo inflamatório não evidenciou diferença entre os grupos em 1 e 3 meses, mas, em 6 meses, apenas aquele com enxerto autólogo não exibia processo inflamatório algum.

A pesquisa de Chumnanvej *et al.* (2020) também apresenta semelhanças com a desta tese, já que o autor optou por realizar a craniectomia apenas em um sítio, sob o qual foi realizado o experimento, de tal forma que cada animal foi submetido a apenas um material. Isso evita a contaminação de um sítio pelo outro e a interpretação de que o processo inflamatório de um lado possa ter potencializado o do outro. Em uma situação hipotética em que o autor utilize os dois lados para realizar a craniectomia, o animal poderia apresentar sintomatologia de infecção sistêmica e processo inflamatório moderado em ambos, motivo pelo qual os autores não poderiam afirmar ao certo que membrana estaria relacionada ao referido processo de inflamação.

Neste estudo, foi possível avaliar a vascularização por meio da marcação de alfa-actina do músculo liso com aumento de 200x. Observamos maior vascularização nos grupos em que utilizamos enxertos xenográficos em relação ao grupo *sham*, sendo essa diferença significativa em 30 dias, mas não em 15 e 45 dias. Isso corrobora o resultado do estudo de Chumnanvej *et al.* (2020) que, na avaliação inicial de um mês, evidenciou quantidade significativamente maior de formação vascular nos espécimes submetidos à membrana ORC/PCL em comparação com aqueles submetidos ao enxerto autólogo. Já em 3 meses, ainda que houvesse mais formação óssea nos grupos com membrana ORC/PCL, essa diferença não foi significativa.

Com relação à formação óssea, o resultado foi bem diferente: enquanto no estudo de autoria de Chumnanvej *et al.* (2020) a formação óssea no grupo com enxerto autólogo foi menor que no grupo com a tela biológica, nesta tese constatou-se que os grupos receptores de biomateriais apresentaram menor formação óssea que o grupo sem enxerto. No grupo receptor do dispositivo Duragen®, que tem poros grandes e abundantes, observou-se permeio periférico de tecido ósseo, o que ocorreu em menor escala no grupo do *scaffold* derivado da pele de tilápia, compacto e praticamente sem poros.

Por fim, no estudo de Chumnanvej *et al.* (2020), o processo inflamatório foi observado em todos os grupos até 3 meses, sem diferença significativa, e esteve ausente apenas no grupo com enxerto autólogo aos 6 meses. No nosso experimento, notamos que o grupo com *scaffold* de tilápia apresentou maior processo inflamatório aos 15 e 30 dias, porém, aos 45 dias, tornou-se menos intenso e sem diferença significativa em relação ao grupo de controle negativo (sem uso de biomaterial exógeno). Em relação ao produto Duragen®, o processo inflamatório do *scaffold* de tilápia mostrou-se significativamente maior apenas aos 30 dias.

Em outra pesquisa, foram comparadas as membranas TachoComb (enxerto de colágeno em combinação de fibrinogênio humano com aprotinina e trombina bovina) e TissuDura (derivado de colágeno de tendão de Aquiles de equinos) quanto a efeitos adversos e complicações de duroplastia em ratos (KARKUCAK *et al.*, 2021). Nesse estudo, 30 ratos foram submetidos a procedimento cirúrgico na região parietal esquerda: em 10 ratos foi implantado o TachoComb; em 10, o TissuDura; e, finalmente, em 10 ratos não foi implantado nenhum tipo de membrana. Os animais foram anestesiados com Cetamina e Xilazina intraperitoneal e submetidos a um dos três procedimentos cirúrgicos a depender do grupo, e os autores relataram abertura de 3 mm da dura-máter com lâmina número 11. Foram observados

quanto ao quadro clínico, como sinais de inflamação e deiscência de ferida operatória, fistula liquórica e alterações de comportamento.

Após 21 dias de acompanhamento, os animais foram sacrificados, e inflamação, edema, gliose e reação a corpo estranho foram avaliados no sítio cirúrgico. Essa análise histológica realizada apenas por hematoxilina-eosina revelou processo inflamatório parenquimatoso no grupo *sham* (1 de 10 animais), TachoComb (7 de 10 animais) e TissuDura (3 de 10 animais), assim como no osso no grupo *sham* (0 de 10), TachoComb (5 de 10) e TissueDura (2 de 10 animais); e reação de corpo estranho no parênquima dos grupos TachoComb (10 de 10) e TissuDura (2 de 10 de forma generalizada e 10 de 10 alguma reação de corpo estranho), não ocorrendo processo inflamatório no parênquima dos animais do grupo *sham*. No entanto, edema e gliose encefálica foram observados em todos os grupos, incluindo este último.

Esse estudo, de forma similar ao desta tese, foi realizado em ratos e utilizou apenas uma trepanação em um ponto específico na região parietal esquerda (no caso do trabalho aqui descrito, escolhemos fazer a trepanação à direita com referência a modelo descrito em Janowski (2016). As técnicas de tricotomia, anestesia e incisão foram semelhantes, entretanto, não se utilizou *drill* (broca cirúrgica) nesta tese para craniectomia, a qual foi realizada com rotação de lâmina número 15. Por fim, Karkucak *et al.* (2021) optaram por seccionar a dura-máter dos animais, ao contrário da intervenção cirúrgica descrita nesta tese.

A dura de *Rattus norvegicus* possui espessura de alguns micrômetros, tendo um espaço apenas virtual do parênquima. Por essa razão, neste trabalho de doutorado, decidiu-se não seccionar a dura-máter, pois isso implicaria em alto potencial de dano do parênquima pela técnica, o que poderia ser um viés na avaliação do processo reacional provocado pelas membranas. Tal problema foi observado nos resultados de outro estudo (BIROLI *et al.*, 2008), em que mesmo o grupo *sham* apresentou edema e gliose cerebral, apontando para um dano tecidual causado pela técnica, não pela sobreposição da membrana.

De volta ao estudo de Karkucak *et al.* (2021), o processo inflamatório adjacente à membrana foi mais exuberante no grupo TachoComb, sendo esse resultado significativamente maior que nos outros grupos estudados e suficiente para mostrar a menor segurança em sua utilização, segundo conclusão da pesquisa. Já no parênquima, o processo inflamatório não indicou diferença significativa entre as telas biológicas investigadas. Em todo caso, ainda que tenha havido significativamente mais gliose no grupo TachoComb, o resultado do processo inflamatório adjacente à membrana é suficiente para demonstrar a menor segurança desse produto. Portanto, considera-se que a decisão de não tentar abrir a dura-máter dos ratos no

experimento aqui descrito foi acertada, na medida em que não contribuiria para a avaliação do processo inflamatório (no máximo, seria uma informação redundante) e aumentaria os riscos neurológicos (morbidade e mortalidade) para o animal.

Também foi realizado um estudo de duroplastia em porcos (*Sus scrofa domesticus*) para avaliação de biocompatibilidade de uma matriz de dupla camada de colágeno semissintética (BCM), desenvolvida pela fabricante B. Braun Aesculap (NEULEN *et al.*, 2011). Nessa pesquisa, 34 porcos foram submetidos a craniectomia e excisão da dura, seguidas de duroplastia, usando a membrana BCM, Duragen® suturável (Integra) ou periôsteo. Foram avaliadas a facilidade de manuseio intraoperatório, a fístula liquórica, a adesão encefálica dos materiais, e os parâmetros histopatológicos (morfologia do tecido, processo inflamatório e infiltração da membrana por fibroblastos). Os animais foram submetidos à trepanação frontal à direita para implantação de monitor de pressão intracraniana, e à craniectomia parietal esquerda com ressecção de dura-máter e indução de um dano no parênquima parietal esquerdo. Além disso, utilizou-se um material para hemostasia (Sangustop, Aesculap).

Os animais foram sacrificados 1 e 6 meses após a intervenção cirúrgica. Todos os materiais estavam integrados após 6 meses e os produtos Duragen® e BCM mostraram maior tendência de estímulo à reação linfocítica, porém, esses enxertos apresentaram maior facilidade de manuseio. Os autores mencionam que o Duragen® foi escolhido para comparação por não provocar reações importantes nos tecidos adjacentes e por ser amplamente usado no contexto clínico. Consideraram, no entanto, que o produto semissintético em estudo (BCM), que consiste em uma camada de esponja de colágeno derivada de pele bovina e uma camada impermeável de colágeno de pericárdio bovino liofilizado, é uma melhor barreira mecânica.

Pesquisas em animais de médio e grande porte, como nesse caso, permitem a realização da técnica de abertura dural (durotomia) e de sutura do material enxertado à dura-máter do animal. No estudo em questão, havia a necessidade de analisar a facilidade de manuseio, avaliada por meio de um escore proveniente do tempo médio contabilizado para a duroplastia de cada grupo do experimento. Esse parâmetro não poderia ser avaliado nesta tese, pois o rato, como explanado anteriormente, tem uma dura-máter muito delgada, com espessura de poucos micrômetros, o que impossibilita a realização de durotomia e duroplastia.

Algumas particularidades do estudo de Neulen *et al.* (2011), entretanto, podem levar a algum tipo de viés na avaliação do processo inflamatório, o parâmetro mais importante, visto que determina a possibilidade da utilização desse biomaterial em humanos. A introdução

de um cateter de monitorização de pressão intracraniana (PIC) causa dano tecidual e quebra de barreira que pode servir de porta de entrada para agentes infecciosos.

Além de expor o animal a mais um sítio potencial de infecção pela introdução do cateter de aferição, foi necessário realizar o aumento da PIC por manobra de Valsalva e a inclinação da cabeça do porco para baixo, conforme descrito no estudo. Essas manobras para aumento de PIC, após os procedimentos de durotomia e de laceração intencional do córtex parietal esquerdo, podem ter provocado potenciais situações de viés, como maior sangramento e dano tecidual em sítio cirúrgico. Neste trabalho de doutorado, padronizou-se a metodologia para que fosse a mais simples e rápida possível, pois se sabe que até mesmo a diferença de tempo cirúrgico pode favorecer maior risco de contaminação; portanto, foram realizadas uma incisão simples e uma única trepanação na região parietal direita. De forma semelhante ao estudo descrito nesta tese, os autores escolheram o Duragen® para comparação com a membrana experimental BCM, mostrando mais uma vez se tratar de um *scaffold* de referência internacional, por sabidamente provocar pouca resposta inflamatória.

O desempenho de um material para enxerto na dura-máter não depende apenas da combinação de sua composição e estrutura, mas também da manipulação ou técnica cirúrgica escolhida, a saber, a seleção do biomaterial (suturado ou não suturado) e da região anatômica onde será aplicado. Esses elementos são essenciais para garantir que o enxerto se integre parcialmente à dura-máter, promovendo uma cicatrização adequada e minimizando complicações (CHUAN *et al.*, 2020; DENG *et al.*, 2016; NEULEN *et al.*, 2011). De fácil hidratação, o *scaffold* de pele de tilápia acomoda-se com excelência no local da lesão, facilitando o procedimento cirúrgico.

A qualidade histológica, a ausência de aderência (ou aderência parcial) ao córtex cerebral e a proliferação celular são propriedades imprescindíveis para atestar a biocompatibilidade do enxerto dural (LI *et al.*, 2017, 2019). O *scaffold* da pele de tilápia forneceu um arcabouço de colágeno adequado para a integração de fibroblastos e a formação de um tecido conectivo funcional, na medida em que o próprio colágeno foi degradado e absorvido. Além disso, não observamos aderência aos tecidos circundantes, nem desenvolvimento de tecido cicatricial volumoso (RABINOWITZ *et al.*, 2005). O novo *scaffold* proposto neste trabalho não é inferior e assemelha-se, em alguns parâmetros, ao Duragen®, material de uso clínico e amplamente utilizado em duroplastias humanas. Também é importante enfatizar que a matriz dérmica descelularizada de pele de tilápia possibilitou uma boa proteção mecânica e imunológica à dura-máter, por meio da sua notável barreira mecânica.

6.2 Peso

McCowen e Bistrain (2003) e Ono *et al.* (2014) apontam que, se o animal apresenta deficiência de proteína antes e durante cirurgias de grande porte, o processo de cicatrização posterior é prejudicado, favorecendo maior risco de infecções. Neste estudo, em todos os grupos submetidos à craniectomia e em todas as avaliações temporais, com ou sem implante de material, os animais tiveram ganho de peso, o que sugere um bom estado nutricional e aporte proteico para o processo cicatricial. Essa condição satisfatória favorece o aumento da proliferação de fibroblastos, da angiogênese, da produção de colágeno e, consequentemente, melhora o reparo tecidual da ferida, com impacto no processo de homeostasia e na cicatrização de lesões (CAMPOS; GROTH; BRANCO, 2008).

O ganho de peso e o bom estado nutricional dos animais após o procedimento cirúrgico corroboram a regeneração de tecidos lesados, como ocorreu no fechamento parcial da craniectomia em todos os grupos. Mesmo que o ganho de peso tenha sido mais significativo no grupo *sham* (controle negativo) que nos grupos de *scaffold* da tilápia e Duragen®, é importante enfatizar que as falhas ósseas ao fim do experimento, em todos os grupos, estavam na ordem de grandeza de dezenas de micrômetros (<100 micrômetros), enquanto o defeito ósseo provocado cirurgicamente (craniectomia) era na ordem de, no mínimo, 3 µm (3.000 micrômetros). Portanto em todos os grupos houve um significativo fechamento da ferida cirúrgica. As possíveis razões pelas quais haveria uma diferença de regeneração óssea entre os grupos serão discutidas adiante.

O bom estado nutricional dos animais, representado pelo ganho de peso, comprova os resultados observados em todos os grupos: bom fechamento da pele, sem deiscência ou infecção, fechamento parcial da falha óssea gerada pela craniectomia, formação de tecido conectivo sobre as membranas (no caso dos animais em que foram implantados a matriz acelular de tilápia e o Duragen®), presença de neovasos e de novas fibras de colágeno tipos I e III no tecido cicatricial. Os efeitos positivos advindos da nutrição do animal possibilitam modular e acelerar o processo de cicatrização, contribuindo para o aumento da deposição de colágeno e da força tênsil dos tecidos (ONO *et al.*, 2014). As análises histológicas foram um parâmetro importante para constatar que esse processo ocorreu nos animais.

6.3 Área de craniectomia

A área de craniectomia consiste na medida da área do quadrado de calota craniana removido do animal para introdução de uma tela biológica, como o Duragen® ou a matriz dérmica descelularizada de tilápia, ou para simples fechamento da incisão cutânea com pontos cirúrgicos (grupo de controle negativo ou *sham*). Observamos que, aos 15 dias de tratamento, os animais do grupo Duragen® apresentaram maior área de craniectomia que os grupos de tilápia e controle negativo. Aos 30 dias, os animais do grupo controle negativo apresentaram maior área de craniectomia em relação aos demais. Aos 45 dias, não houve diferença significativa entre as áreas de craniectomia dos grupos de tilápia e Duragen®, mas a área do grupo *sham* foi estatisticamente superior à área dos demais. A maior área de craniectomia, entre todos os grupos e todos os tempos, foi registrada no grupo Duragen® sacrificado aos 15 dias.

A aferição das áreas de craniectomia é importante porque uma diferença muito grande entre as intervenções cirúrgicas poderia interferir no resultado de vários parâmetros avaliados. Uma craniectomia muito pequena em qualquer um dos grupos poderia ser a justificativa para uma menor espessura de falha óssea, independentemente do tratamento aplicado. Além disso, uma craniectomia muito pequena também geraria menor dano tecidual, o que poderia influenciar o ganho de peso e o processo inflamatório.

Aos 15 dias de tratamento, o grupo Duragen® foi prejudicado por uma maior área de craniectomia, mas a espessura média da falha óssea no mesmo grupo foi estatisticamente igual à do grupo receptor da MDAPT. Portanto, o fechamento da falha pode ter sido mais rápido no grupo Duragen®, o que explicaria a igualdade estatística entre as médias de espessura de falha óssea desse grupo e do grupo receptor da matriz de tilápia. Se, em ambos os grupos, as áreas médias de craniectomia fossem semelhantes, possivelmente a espessura média da falha no grupo Duragen® seria menor que a do grupo de tilápia. Tal fato sugere que a membrana de Duragen® pode permitir uma maior passagem de indutores de crescimento e proliferação óssea, em razão de seus maiores poros, o que aceleraria o fechamento da falha óssea.

Além disso, aos 15 dias, o grupo *sham* apresentou espessura média de falha óssea significativamente inferior à dos demais, o que sugere um fechamento mais acelerado do defeito de calota craniana. Provavelmente esse achado se deve à passagem de uma maior quantidade e a uma variedade de fatores de crescimento da dura-máter para o defeito ósseo, em vista da ausência de barreira física entre ambos os tecidos.

Aos 30 dias de tratamento, a área de craniectomia média foi significativamente maior no grupo controle negativo (*sham*) que nos demais. Ainda assim, o grupo *sham* apresentou valor médio de espessura de falha óssea significativamente menor que os outros dois. Isso reforça o entendimento de que a ausência de barreira entre a dura-máter e a calota craniana permite a passagem de uma maior quantidade e variedade de fatores de crescimento, contribuindo para acelerar o fechamento da falha óssea.

Por último, aos 45 dias de tratamento, a área média da craniectomia foi significativamente superior no grupo *sham* em relação aos grupos receptores de matriz de tilápia e Duragen®, que não apresentaram diferença significativa entre si. Em contrapartida, a espessura de falha óssea foi estatisticamente menor no grupo *sham* e igual entre os demais grupos, o que indica a ocorrência de um fechamento mais rápido do defeito craniano no grupo de controle negativo. Provavelmente, a intensa troca de fatores de crescimento entre a dura-máter e o tecido ósseo estimulou o fechamento acelerado do defeito no grupo *sham*, devido à ausência de uma tela biológica posicionada sob o defeito, atuando como barreira física. A degradação mais lenta da matriz de tilápia, que tem poucos e pequenos poros, possibilitou a passagem de fatores de crescimento da dura-máter para a calota craniana tardiamente, estimulando o fechamento do defeito ósseo somente aos 45 dias. Essa hipótese pode ser sustentada pelo fato de não haver diferença entre as espessuras da falha óssea aos 15 e 30 dias de tratamento com o *scaffold* de tilápia, quando o biomaterial ainda estava íntegro. Já aos 45 dias, quando a matriz de tilápia já havia sido absorvida, a espessura da falha óssea tornou-se significativamente menor que nos tempos anteriores ($p = 0,02$).

6.4 Fechamento da craniectomia

As craniectomias foram realizadas em formato de quadrilátero, cujos lados variaram de 3 a 5 milímetros. Já as dimensões do que consideramos espessura de falha óssea, ou remanescente da craniectomia, variaram de 20 a 100 micrômetros. Esse dado deve ser destacado, pois a discussão que se segue não é por uma ausência ou incapacidade de regeneração de tecido ósseo nos casos em que foram implantados *scaffolds* de colágeno, mas por uma diferença mínima, mas estatisticamente significativa, entre as dimensões das falhas ósseas dos grupos Duragen, MDAPT e *sham*.

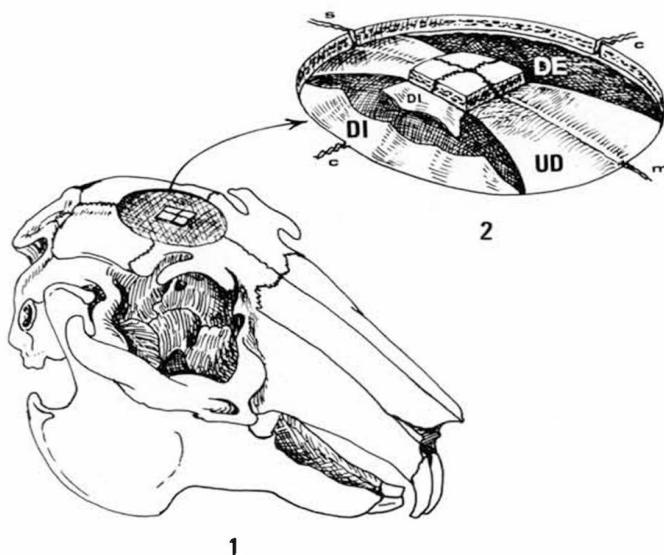
Os animais em que não foram utilizados *scaffolds* apresentaram menor espessura da falha óssea (maior fechamento da craniectomia) tanto aos 15 dias ($p = 0,002$) quanto aos 30 dias de tratamento e 45 dias ($p < 0,001$). No grupo Duragen®, a espessura média da falha

foi numericamente inferior à do grupo da tilápia, porém sem diferença significativa aos 15, 30 e 45 dias. A hipótese para essa observação, como discutiremos a seguir, é que a interposição de uma barreira mecânica (*scaffold*) entre a dura-máter e a calota craniana dificulta a passagem de fatores de crescimento e a regeneração óssea, sendo esse impedimento maior quanto menores e mais escassos forem os poros da referida barreira. Em outras palavras, a obstrução à passagem dos fatores de crescimento é tanto mais intensa quanto mais compacta e fechada for a tela biológica posicionada abaixo do defeito ósseo.

Quando comparamos os 3 grupos de tilápia, 15, 30 e 45 dias, houve uma diferença significativa do tamanho da espessura do defeito em 45 dias ($p=0,024$). Atribuímos essa observação a uma “descompactação” das fibras de colágeno visualizadas nas lâminas coradas em HE. Isso permitiria uma maior permeabilidade da membrana a células e fatores de crescimento ósseo.

A dura-máter, a camada mais externa das meninges, desempenha um papel crucial na morfogênese da calvária, na fusão das suturas pós-natais e no reparo ósseo dos defeitos nesse local (DE SOUZA, 2012). Em um estudo em modelo animal para avaliar a influência da dura-máter na regeneração de defeito ósseo adjacente, uma cirurgia de craniectomia circular (Figura 26) foi realizada em 24 coelhos brancos da Nova Zelândia com 6 semanas de idade (MOSSAZ; KOKICH, 1981). Em 12 animais, a continuidade dessa camada foi interrompida, e os demais animais serviram como controle. Eles foram sacrificados em diferentes intervalos, para documentar o potencial regenerativo dos tecidos durais alterados, e os resultados desse experimento mostraram que a deposição óssea necessária ao novo desenvolvimento calvarial é diretamente dependente da presença da dura-máter. Além disso, a taxa de deposição aparentemente é afetada pela continuidade dural, pela idade do animal e por diferenças localizadas na espessura das camadas durais. Os autores concluíram que o novo desenvolvimento e a patência das suturas cranianas são fortemente influenciados por alterações na continuidade da dura-máter.

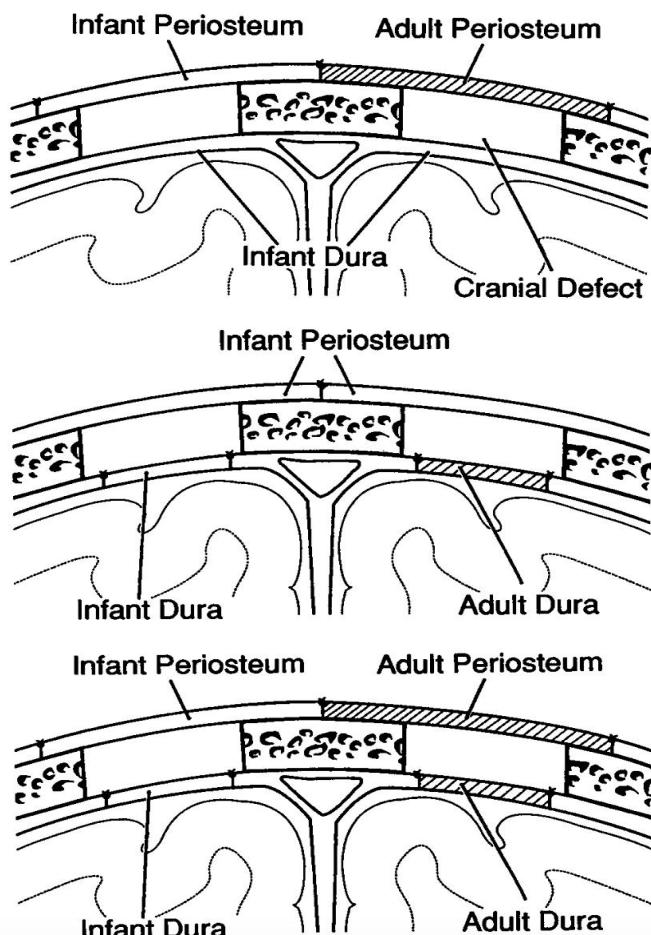
Figura 26 – Desenho de um crânio de coelho ilustrando o corte e a extensão da calvariectomia circular.



Fonte: Mossaz e Kokich (1981). Lado esquerdo (DE), a dura foi completamente removida; no lado direito, DI, a dura foi incisionada. Maior regeneração óssea no lado com mais dura máter.

Na pesquisa de Hobar *et al.* (1993), realizada em modelo animal, foi testado o efeito da transferência de tecidos pericranianos maduros para animais imaturos com defeitos ósseos cranianos. Porquinhos-da-índia isogênicos de diferentes idades foram usados: “infantis” (3-4 semanas) e “adultos” (>18 meses). Defeitos cranianos parietais bilaterais foram feitos em porquinhos-da-índia infantis e os animais foram divididos em três grupos. No grupo 1 ($n=6$), o periôsteo infantil foi ressecado e substituído por um autotransplante em um lado (controle), e o periôsteo adulto foi transplantado como um isoenxerto no outro (experimento). No grupo 2 ($n=5$), a dura-máter foi usada como variável e, no grupo 3 ($n=5$), tanto ela quanto o periôsteo, combinados, se tornaram as variáveis. Após 8 semanas, houve regeneração óssea completa ou quase completa em todos os animais em que a dura-máter infantil estava presente, enquanto a regeneração foi mínima ou inexistente em defeitos em que a dura-máter adulta estava presente (vide Figura 27). Os autores concluíram que, ao contrário da dura-máter, o periôsteo teve pouca influência na capacidade do osso se regenerar.

Figura 27 – Desenho de um modelo animal mostrando periósteo infantil no lado de controle e periósteo adulto no lado experimental.



Fonte: Hobar *et al.* (1993).

Nota: A dura-máter do hospedeiro (infantil) está presente em ambos os lados. Meio: Desenho de um modelo animal mostrando dura-máter infantil no lado de controle e adulta no lado experimental. O periósteo do hospedeiro (infantil) está presente em ambos os lados. Inferior: Desenho de um modelo animal mostrando dura-máter e periósteo infantis no lado de controle e dura-máter e periósteo adultos no lado experimental.

Ambos os estudos destacam a influência da dura-máter na regeneração óssea, especialmente em relação a defeitos cranianos. O primeiro, realizado em coelhos brancos da Nova Zelândia, mostrou que a deposição óssea que leva ao redesenvolvimento calvarial é diretamente dependente da presença da dura-máter. O segundo, conduzido em porquinhos-da-índia, apoiou essa descoberta, indicando regeneração óssea completa ou quase completa na presença de dura-máter infantil, mas regeneração óssea mínima ou inexistente quando a dura-máter adulta estava presente, e curiosamente também descobriu que o periósteo pouco influencia essa capacidade de restruturação.

A diferença de capacidade de regeneração óssea induzida pela presença da dura-máter também é influenciada pela região em que a membrana dural se encontra, como observado em estudo realizado em ratos por Yu *et al.* (1997). O estudo mostra evidências *in*

vivo de que a dura-máter, sem outros componentes do sistema nervoso central, induz tanto a condrogênese quanto a osteogênese. O mecanismo funciona, pelo menos em parte, por interação tecidual próxima. No referido trabalho, a dura-máter subjacente às suturas metópica, sagital e lambdoide e aquela subjacente às porções planas dos ossos frontais e parietais foram obtidas de ratos Lewis neonatais e transplantadas no tórax posterior de receptores Lewis adultos.

No grupo 1, enxertos de dura-máter subjacente às suturas ($n=20$) e às porções ($n=20$) foram transplantados individualmente para bolsas epiteliomesenquimais separadas. Já no grupo 2, os enxertos durais foram transplantados para bolsas mesenquimais cirurgicamente criadas ($n=10$ para cada camada), colocados entre os músculos *panniculus carnosus* e *latissimus dorsi*. Os animais foram sacrificados em intervalos de 2 semanas e analisados por microscopia de luz, análise histoquímica, imuno-histoquímica e microscopia eletrônica. A formação óssea foi vista em 15 dos 18 animais (83%) do grupo 1, no entanto não foi vista formação de osso ou cartilagem no grupo 2.

Notou-se a condrogênese em 4 animais que receberam dura-máter subjacente às suturas metópica, sagital e lambdoide no grupo 1. A hiperproliferação celular, por sua vez, foi constatada em 2 semanas quando a dura-máter foi transplantada perto dos folículos capilares. Essas células tinham uma alta relação núcleo-citoplasma e eram positivas para fator de crescimento transformador beta (TGF- β). Essa hiperproliferação foi seguida pela produção e pelo acúmulo de matriz extracelular positiva para *alcian blue*, que resistiu à digestão por hialuronidase. A cartilagem com células ativas foi vista em 6 semanas. Não houve condrogênese em animais que receberam dura-máter subjacente às porções planas dos ossos frontais e parietais no grupo 1.

A microscopia eletrônica mostrou a presença de substância fundamental semelhante a proteoglicano e colágeno tipo II na camada interna da dura-máter sutural, e predominância de colágeno tipo I denso na dura-máter escamosa e na camada externa da dura-máter sutural. Os autores concluíram que a dura-máter neonatal transplantada heterotopicamente induziu osteogênese dependente da interação epiteliomesenquimal. A condrogênese ocasionalmente ocorreu além da osteogênese com a dura-máter sutural, enquanto apenas a ossificação membranosa aconteceu com a dura-máter escamosa, indicando diferenças intrínsecas dentro da própria dura. Sabe-se também do papel das interleucinas e do TGF- β na morfogênese da sutura craniana (OPPERMAN *et al.*, 1999). De fato, o estudo de Yu *et al.* (1997) avaliou que essa morfogênese precisa de fatores solúveis secretados pela dura-máter para resistir à obliteração óssea prematura.

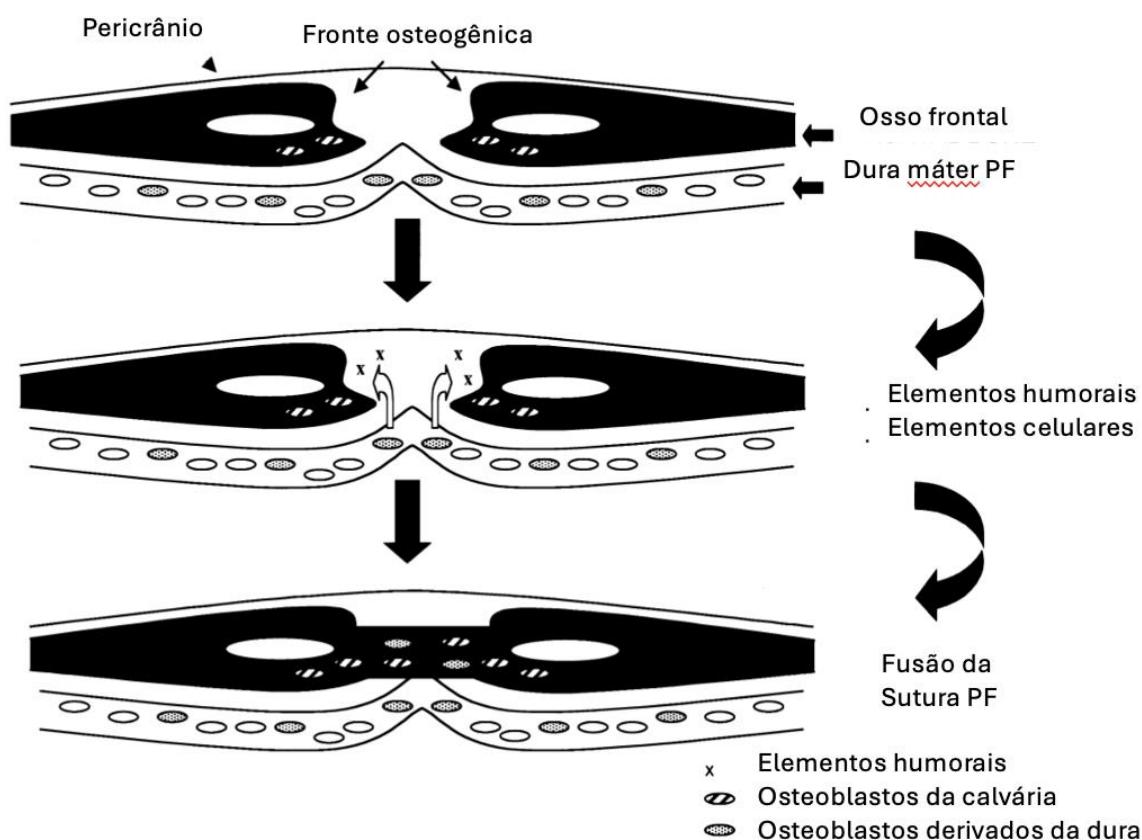
Pesquisas sobre os mecanismos autócrinos e parácrinos que atuam na biologia das células durais durante a ossificação calvarial mostraram que células durais não associadas à sutura em filhotes de ratos de 6 dias exibiam níveis elevados de fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2), enquanto células durais em ratos adultos de 60 dias apresentavam baixos níveis de FGF-2 (LI; QUARTO; LONGAKER, 2007; SPECTOR *et al.*, 2002). Esses estudos indicam que a capacidade de mamíferos jovens curarem grandes defeitos calvariais com sucesso pode ser atribuída aos efeitos autócrinos e/ou parácrinos do FGF-2 na proliferação, na expressão gênica e na produção de fosfatase alcalina das células durais (LI; QUARTO; LONGAKER, 2007; SPECTOR *et al.*, 2002).

Em uma pesquisa específica, foram estabelecidas culturas de células durais não associadas à sutura retiradas de filhotes de ratos Sprague-Dawley de 6 dias, que foram estimuladas com FGF-2 humano recombinante ou rhFGF-2 (MOURSI *et al.*, 2002). Verificou-se que as células durais estimuladas com rhFGF-2 proliferavam significativamente mais rápido do que as não tratadas, durante 24 e 48 horas. Além disso, outro estudo evidenciou que células durais estimuladas com rhFGF-2 expressavam 7 vezes mais antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) do que as culturas de controle (LI; QUARTO; LONGAKER, 2007). O tratamento com rhFGF-2 aumentou, portanto, a expressão de genes importantes para o reparo tecidual esquelético, como os genes de FGF-2, fator de crescimento transformador beta 1, fator de crescimento transformador beta 3, colágeno tipo I e osteopontina, um marcador “tardio” da diferenciação osteoblástica. Curiosamente, a atividade da fosfatase alcalina das células durais, um marcador mais precoce da diferenciação osteoblástica, diminuiu significativamente com o tratamento com rhFGF-2 em comparação com as culturas de controle em 24 e 48 horas (LI; QUARTO; LONGAKER, 2007).

Um estudo sobre a fusão da sutura craniana para entender a etiopatogênese da craniossinostose examinou os mecanismos da fusão normal das suturas (GREENWALD *et al.*, 2000). Modelos murinos em que a sutura frontal posterior passou por fusão programada logo após o nascimento ofereceram um modelo ideal para estudar esses mecanismos. A sutura sagital do rato foi comparada em duas regiões: anterior à sutura coronariana, denominada na pesquisa de sutura frontal posterior (P), e posterior à sutura coronariana, denominada de sutura sagital (S) (diferença ilustrada na Figura 28). Na espécie de ratos estudada, P fundiu-se logo após o nascimento, enquanto S permaneceu patente. O destino da sutura, ou seja, fusão *versus* patência, foi regulado pela dura-máter diretamente abaixo da própria sutura craniana. Esses estudos levaram à hipótese de que a dura-máter calvarial é regionalmente diferenciada e

que essa diferenciação orienta o desenvolvimento da sutura subjacente (GREENWALD *et al.*, 2000).

Figura 28 – Imagem superior evidenciando um defeito ósseo (no caso, a sutura frontal em modelo murino, descrita como frontal posterior); imagem do meio evidenciando a liberação de elementos celulares e humorais pela dura-máter; imagem inferior evidenciando a falha óssea fechada por trabeculado ósseo.



Fonte: Adaptado de Greenwald *et al.* (2000, p. 2427).

A expressão do ácido ribonucleico (RNA) mensageiro de colágeno tipo III e de fosfatase alcalina foi maior na amostra da região frontal posterior (sutura precocemente fundida) do que na região sagital (sutura que fica patente por mais tempo). Foi constatado que a expressão de citocinas osteogênicas e de moléculas da matriz extracelular associadas ao osso aumentou fortemente na dura-máter adjacente à sutura frontal posterior. Além disso, a proliferação celular na dura-máter ligada à fusão de P foi significativamente menor do que a encontrada na sutura sagital patente, logo antes do início da fusão sutural.

Ainda no estudo de Greenwald *et al.* (2000), para analisar ainda mais a diferenciação regional das células durais associadas à sutura craniana, foi realizada a cultura

de células durais de suturas cranianas fundidas e patentes em ratos, nas quais foi avaliada a expressão de citocinas osteogênicas, de colágeno tipo I e de antígeno nuclear de células proliferantes. Esses estudos confirmaram que as culturas de células durais provenientes da sutura frontal posterior em fusão expressaram quantidades significativamente maiores de TGF-beta1, FGF-2 e colágeno tipo I. Ademais, as células durais derivadas de P produziram significativamente menos antígeno nuclear de células proliferantes do que as derivadas de S.

No conjunto, esses dados apoiam fortemente a hipótese de que a dura-máter calvarial é regionalmente diferenciada, resultando na regulação positiva das citocinas osteogênicas e das moléculas da matriz extracelular óssea nos tecidos durais subjacentes às suturas cranianas em fusão, mas não patentes. Alterações na expressão de citocinas podem governar a diferenciação osteoblástica e a deposição de moléculas da matriz extracelular, regulando assim o destino sutural. A elucidação dos eventos biomoleculares que ocorrem antes da fusão normal da sutura craniana no rato pode aumentar nossa compreensão dos eventos que levam à sua fusão prematura.

Os resultados desta tese mostraram que houve uma taxa de fechamento menor em animais operados com *scaffold* (seja o derivado da pele de tilápia, seja o Duragen®) interposto entre a calota craniana e a dura-máter, em relação àqueles em que não foi utilizado nenhum *scaffold*. Com base nos estudos revisados acima, entendemos, considerando nossos resultados, que a interposição de uma barreira entre a dura-máter e o osso dificulta o trânsito de fatores indutores de crescimento ósseo da calota craniana. As atividades de fatores osteogênicos, não somente em áreas de sutura mas também em falhas ósseas adjacentes à membrana dural, tiveram sua ação reduzida.

De fato, a difusão de partículas em meio poroso é bem determinada pela equação diferencial parcial de Fick (KASOJU *et al.*, 2014):

$$\frac{dC}{dt} = D * \nabla^2 C$$

Em que: C é a concentração de partículas em um ponto no espaço; t é o tempo; D é o coeficiente de difusão das partículas no meio poroso; e ∇^2 é o operador laplaciano.

O coeficiente de difusão das partículas no meio poroso é afetado por uma série de fatores, incluindo: o tamanho e a forma das partículas; a viscosidade do meio poroso; o tamanho dos poros; e a tortuosidade do meio poroso. Logo, há uma correlação inversa entre a passagem de uma substância por uma membrana e a espessura desta, e uma correlação direta

entre o tamanho médio dos poros da membrana e a passagem dessa mesma substância (KASOJU *et al.*, 2014).

No caso desta tese, deve-se levar em consideração a diferença entre os dois dispositivos utilizados (matriz dérmica acelular de tilápia e Duragen®) para justificar os resultados, que, como observado na microscopia eletrônica, está no tamanho dos poros e na tortuosidade do caminho através da membrana.

A utilização de uma membrana substituta dural, ou *scaffold*, é necessária para servir de barreira mecânica para impedir tanto a saída de substâncias (como o líquor) quanto a entrada de抗ígenos no encéfalo. Por essa razão, considera-se que a maior tortuosidade, menor porosidade e, consequentemente, a menor permeabilidade da matriz dérmica acelular derivada de pele de tilápia são vantagens estruturais em relação ao Duragen®. Esses dados estruturais sobre as membranas são inferidos dos resultados da análise histológica e de microscopia eletrônica e carecem de estudos específicos para comprovação.

Portanto, há duas justificativas para o maior fechamento da craniectomia nos animais do grupo de controle negativo:

- a) serem um pouco mais jovens que os animais dos outros grupos, pois apresentaram peso inicial significativamente menor que os animais dos grupos Duragen® ($p = 0,024$) e *scaffold* de tilápia ($p = 0,001$);
- b) não haver barreira mecânica entre a dura-máter e a calota craniana em regeneração, o que tornou a função parácrina da dura-máter mais efetiva.

Ressalto que essa discussão decorreu da observação de uma diferença de fechamento da calota craniana na escala de micrômetros: a menor dimensão da craniectomia quadrangular foi de 3mm (3 mil micrômetros) e a maior média de persistência de falha óssea não passou de 100 micrômetros. Isso quer dizer que, na pior das hipóteses, o fechamento foi quase completo (100um dividido por 3000 é 0,03, ou 3%; ou seja 97% de fechamento). Isso quer dizer que os animais submetidos aos *scaffolds* além de permanecerem com os encéfalos protegidos, também apresentaram alto índice de fechamento da craniectomia.

6.5 Microscopia eletrônica

As imagens de microscopia eletrônica, ao aumento de 2.500x, permitiram a visualização do arranjo das fibras nos dois biomateriais. Na matriz dérmica acelular derivada da pele de tilápia, visualizamos uma estrutura compacta, com poucos poros em formato de pequenas fendas. Já o dispositivo Duragen® apresentou poros grandes e abundantes. Essa

diferença estrutural corrobora os achados histológicos, que demonstraram haver inúmeras células infiltradas entre as fibras de colágeno do Duragen® já aos 15 dias de tratamento. Na MDAPT foi evidenciada a presença de células apenas nas superfícies interna e externa dessa membrana. Se, por um lado, isso atrasou a decomposição da matriz de tilápia, por outro, leva a crer que esta seja uma melhor barreira mecânica, justamente a função almejada para um *scaffold* de dura-máter.

O tempo de absorção da MDAPT confirma as observações anteriores, pois é maior que o tempo de absorção do Duragen®. Na coloração com HE, aos 30 dias, o Duragen® já está completamente ausente, enquanto a absorção completa da MDAPT somente ocorre aos 45 dias. De fato, o tempo de absorção de até 30 dias já havia sido demonstrado em duraplastias caninas com Duragen® (ZERRIS *et al.*, 2007). A estrutura da MDAPT é mais compacta, com menor quantidade de poros, enquanto o Duragen® possui propriedades mecânicas frágeis (SILVA, 2023; ZERRIS *et al.*, 2007), com fibras colagenosas delgadas, rarefeitas e permeadas por grandes poros (Figura 22). Acredita-se que a estrutura mais frouxa do Duragen® facilita sua degradação e absorção, enquanto a estrutura da MDAPT é mais resistente e, portanto, atrasa sua absorção e estimula a inflamação e a regeneração tecidual por mais tempo.

6.6 Colágeno

O colágeno tipo I é uma proteína fibrilar estrutural expressa em quase todos os tecidos conjuntivos, dentre eles, a dura-máter (LIU *et al.*, 2022). Assim, um dispositivo à base de colágeno provavelmente pode ser um candidato adequado para reparar e regenerar a dura-máter danificada (ESPOSITO *et al.*, 2008).

Para que ocorra a regeneração da área lesionada, uma das principais propriedades do dispositivo regenerativo é a semelhança entre a sua composição bioquímica e a do tecido receptor. Em grande medida, isso significa que o colágeno constituinte do dispositivo deve ser estruturalmente semelhante ou igual ao colágeno da matriz extracelular na área lesionada. Ao mimetizarem minimamente o tecido reparado, saudável, os componentes do dispositivo exógeno (colágeno e outras proteínas) orquestram os fatores de crescimento endógenos para iniciarem a proliferação celular. Nesse contexto, os receptores de membrana dos fibroblastos são estimulados, ativando vias de sinalização celular que promovem sua função de síntese da matriz extracelular (CAMPOS; GROTH; BRANCO, 2008; SZWED; SANTOS, 2016).

Os dispositivos regenerativos ricos em colágeno geralmente se caracterizam por baixa toxicidade e alta biocompatibilidade. Em testes de citotoxicidade *in vitro*, células da linhagem L929 (derivadas de fibroblasto murino) demonstraram altos níveis de viabilidade após contato indireto com a MDAPT, superiores a 70%, conforme preconizado pela norma ISO 10993-5:2009 (SILVA, 2023). Quanto menor a toxicidade *in vitro*, maior a chance de compatibilidade *in vivo*. Desse modo, a MDAPT apresentou perfil inflamatório moderado, não crônico, após inserção no espaço subcutâneo de ratos (*Rattus norvegicus*), corroborando os resultados de citotoxicidade *in vitro*. A matriz descelularizada de pele de tilápia induziu a proliferação e migração dos fibroblastos para a área lesionada, para produzir e depositar colágeno na matriz extracelular, potencializando e acelerando o processo de cicatrização (MARTINS, 2023). Por meio da síntese de novas fibras de colágeno, o tecido começou a ser remodelado e, consequentemente, estimulou mais ainda a atividade celular dos fibroblastos. De fato, vários estudos sugerem que os produtos derivados da pele de tilápia mimetizam o microambiente do tecido receptor (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2019; SILVA, 2023).

Estudos anteriores também demonstraram a biocompatibilidade de dispositivos ricos em colágeno de peixe com o espaço epidural em mamíferos. Nos estudos de Li *et al.* (2017), um *scaffold* oriundo da pele do peixe Weever foi utilizado em modelos de defeito dural em coelhos, indicando que o biomaterial à base de colágeno previu a adesão do tecido cerebral, o que reduziu a inflamação, facilitando o crescimento de fibroblastos, a regeneração e a cicatrização do tecido.

Neste estudo, as análises histológicas quantitativas mostraram que o percentual de colágeno (total, do tipo I e do tipo III) no tecido regenerado não foi significativamente diferente entre os grupos de tratamento e tempos estudados. Ainda que o grupo da tilápia tenha apresentado uma tendência de se destacar com quantitativo maior de colágeno total e tipo I no tempo de sacrifício de 30 dias, essa diferença não foi significativa. Já no tempo de 45 dias, os grupos voltaram a expressar menores quantitativos de colágeno, mais próximos dos valores encontrados nos animais sacrificados aos 15 dias.

A coloração de *picrosírius red* também foi usada para avaliação do colágeno nos tecidos adjacentes à região de aposição dos biomateriais. Nesse caso, os conteúdos estimados de colágeno não incluíram os dispositivos de pele de tilápia descelularizada e Duragen®. O excesso de colágeno nos tecidos circunvizinhos poderia representar um volume excedente de matriz extracelular, o qual seria prejudicial por comprimir o encéfalo.

Felizmente, não houve colagênese exacerbada ao redor da região de aposição da matriz acelular de pele de tilápia e do Duragen®, em relação ao controle negativo, em todos

os tempos analisados. Portanto, a presença de colágeno em quantidades semelhantes em todos os grupos sugere que a matriz dérmica acelular de pele de tilápia provocou uma resposta aceitável do organismo no contexto do processo cicatricial.

6.7 Processo inflamatório

Em T1, o grupo controle negativo (*sham*) apresentou intensidade do processo inflamatório significativamente menor que os grupos receptores da matriz acelular de tilápia e do Duragen® em 15 e 30 dias. Já os grupos que receberam implante de dispositivos exógenos não apresentaram diferença significativa entre si. O processo inflamatório é uma resposta normal dos organismos ao dano tecidual e esteve presente, ainda que de forma mais leve, no grupo *sham*. A presença do implante estimula uma inflamação mais intensa, porém, é importante asseverar que a MDAPT induziu processo inflamatório comparável ao provocado pelo Duragen®, produto comercial de referência (registrado no FDA e na ANVISA).

Em T2, o processo inflamatório foi mais intenso no grupo tilápia em relação aos grupos *sham* e Duragen®, contudo, não houve diferença significativa entre os dois últimos. De T1 para T2 não houve acentuação do processo inflamatório no grupo da tilápia, enquanto no grupo Duragen® houve redução da intensidade de inflamação.

Em T2, o processo inflamatório nos animais receptores de MDAPT permaneceu mais intenso que aquele do grupo Duragen®, possivelmente pela maior demora na decomposição da estrutura de colágeno da matriz acelular de pele de tilápia. Ainda em T2, foram identificados fibroblastos e macrófagos aderidos ao Duragen®, assim como neovascularização, e não foram detectados neutrófilos, linfócitos ou plasmócitos, indicando boa biocompatibilidade *in vivo*.

Em T3, a intensidade do processo inflamatório foi a mesma entre os grupos, sugerindo que o implante da matriz dérmica acelular de tilápia já não estava influenciando o aumento da inflamação. De fato, praticamente já não havia mais resíduo de colágeno no grupo de *scaffold* de tilápia e raro colágeno no grupo Duragen®. O processo cicatricial já estava praticamente resolvido nos grupos submetidos a implante de biomaterial, nos quais um tecido conectivo estruturado por células, vasos e MEC havia substituído a matriz de colágeno.

Sobre o processo inflamatório causado pela matriz dérmica acelular de pele de tilápia, pode-se afirmar, resumidamente, que foi mais intenso em T1, mas começou a diminuir à medida que a fase proliferativa se iniciou, o que possibilitou a cicatrização adequada da lesão (CHUAN *et al.*, 2020). A neovascularização, a proliferação de fibroblastos e a

diminuição de células polimorfonucleares indicaram que a MDAPT forneceu um substrato adequado para a formação de um tecido conectivo (conjuntivo), à medida que foi sendo degradado e absorvido. A absorção do biomaterial durante o processo cicatricial ocorreu sem formação de aderência ou compressão dos tecidos circundantes. A presença contínua da barreira mecânica formada pelo tecido conjuntivo, que surgiu no lugar da matriz acelular de tilápia, pode prevenir a ocorrência de fistula liquórica (RABINOWITZ *et al.*, 2005).

6.8 Marcadores imuno-histoquímicos

A enolase neuroespecífica (NSE) é um marcador altamente específico para neurônios e células neuro endócrinas (ISGRÒ; BOTTONI; SCATENA, 2015). As análises de lâminas com marcação imuno-histoquímica de enolase neuroespecífica não revelaram danos neuronais em nenhum dos grupos experimentais. Em primeiro lugar, isso demonstra o sucesso da craniectomia em todos os casos, o que valida a técnica empregada neste estudo. Em segundo lugar, demonstra que a presença dos *scaffolds* não provocou dano neural adjacente seja por causa mecânica (alguma compressão) ou processo inflamatório.

O MDM2 foi um dos marcadores detectados durante a regeneração tecidual, após a craniectomia, em todos os grupos experimentais testados. A proteína MDM2 é um alvo transcricional da sinalização de NF-κB e p53, ligando inflamação e carcinogênese (GU; FINDLEY; ZHOU, 2002; PONNUSWAMY; HUPP; FÄHRAEUS, 2012). Durante a cicatrização, fatores de transcrição responsáveis pela resposta inflamatória, como o NF-κB, coordenam a ativação de genes inflamatórios, a proliferação celular, a angiogênese e a remodelação tecidual. Quando eles estão corretamente modulados, é possível observar uma cicatrização eficiente, sem complicações associadas à inflamação crônica ou inadequada.

A contagem de miofibroblastos foi realizada de duas formas, uma pela alfa actina de músculo liso, que será discutida a seguir e outra pela MDM2. A alfa actina de músculo liso marca uma população de miofibroblastos com função contrátil sobre a matriz extracelular, cujas funções esperadas são aproximar as bordas da ferida, reorganizar e remodelar a matriz extracelular, gerar forças de tração que facilitam a migração de outros tipos celulares como fibroblastos e células endoteliais (KHURANA, 2024). Já os miofibroblastos marcados pela MDM2 estão relacionados à função de proliferação celular (THOMASOVA *et al.*, 2012) e neovascularização (HSIEH, 2000).

A maior quantidade de miofibroblastos significa que a via de sinalização de NF-κB foi positivamente regulada, enquanto a via da proteína p53 foi negativamente regulada por

MDM2. O resultado é a proliferação e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, necessária à formação do tecido conjuntivo e à regeneração tecidual (THOMASOVA *et al.*, 2012), associada a neovascularização (HSIEH, 2000). É importante enfatizar também que a inibição excessiva da função de p53 pode levar à remodelação disfuncional dos tecidos, caracterizada por fibrose (BAO *et al.*, 2024).

Por meio da análise do marcador imuno-histoquímico MDM2, foi demonstrada a transformação dos fibroblastos em miofibroblastos, presentes em grande número na estrutura do tecido conectivo originado após a craniectomia, nos grupos experimentais que receberam a MDAPT e o Duragen®. Dessa maneira, foi evidenciada a formação do tecido conjuntivo e a ocorrência de regeneração no local da intervenção cirúrgica. No grupo que recebeu MDAPT e Duragen®, observamos a formação de uma barreira protetiva que não foi constatada no grupo *sham*, reforçando a estabilidade e a proteção ao tecido subjacente proporcionadas pelos *scaffolds*. De fato, o número de miofibroblastos marcados com MDM2 foi maior no grupo tilápia em relação aos demais, aos 15 e 30 dias após a craniectomia. Já aos 45 dias, não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao número de marcações de MDM2.

Por ser um marcador pró-inflamatório, o MDM2 pode ser prejudicial quando expresso em excesso, dependendo da região onde ocorre o reparo tecidual. Nos estudos de Zhao *et al.* (2017), notou-se que a inibição desse marcador bloqueou a indução de citocinas pró-inflamatórias, melhorou a função cardíaca e reduziu a fibrose no coração durante o infarto do miocárdio (ZHAO *et al.*, 2017). Desse modo, o bloqueio do MDM2 poderia ser uma estratégia terapêutica em potencial para a doença isquêmica miocárdica crônica. De forma inversa, no reparo da dura-máter é necessário que a expressão de MDM2 aumente naturalmente, desempenhando um papel controlado na promoção da resposta inflamatória, na proliferação de fibroblastos, na neovascularização e na deposição de matriz extracelular.

A produção de tecido conjuntivo na área do defeito ósseo mostrou um equilíbrio satisfatório de crescimento celular e deposição de matriz extracelular, sem fibrose, que poderia pressionar o córtex subjacente de maneira potencialmente danosa. Esse estado de equilíbrio entre crescimento celular e produção de matriz é essencial para a resposta adequada a danos histológicos (THOMASOVA *et al.*, 2012). De fato, nas avaliações histológicas, não foram observados sinais de excesso tecidual nas áreas de cicatrização, já que os tecidos conjuntivos formados entre as bordas ósseas sobre os biomateriais mantinham a espessura média da calota craniana. A avaliação por enolase neuroespecífica, em que não se observou lesão neuronal em nenhum dos grupos, corrobora a evidência de segurança das células do sistema nervoso com a utilização dos *scaffolds* sobre a dura-máter.

Outro fator que permite que os tecidos sofram inflamação é a presença de vasos sanguíneos. O processo de angiogênese regula o fluxo sanguíneo na resposta à lesão tecidual (CUNHA, 2004), aumentando o transporte de células e nutrientes que possibilitam o reparo do tecido. A expressão de alfa-actina de músculo liso (α -SMA) é regulada positivamente em pericitos durante a angiogênese, particularmente em resposta a fatores de crescimento como o fator de crescimento transformador beta (TGF- β). Portanto, a α -SMA pode servir como um marcador para pericitos ativados envolvidos na formação de novos vasos sanguíneos. Estudos mostraram que pericitos com alta expressão de α -SMA contribuem para as propriedades contráteis necessárias para regular o fluxo sanguíneo e dar suporte às células endoteliais durante a formação de novos vasos (MOONEN *et al.*, 2010; KWARTLER *et al.*, 2023). Neste estudo, a α -SMA foi avaliado como marcador de neovasos na área da craniectomia, após a intervenção cirúrgica. O marcador de alfa-actina de músculo liso mostrou neovascularização em todos os animais, sendo significativamente maior no grupo de tilápia entre os grupos avaliados aos 30 dias após a craniectomia ($p = 0,0478$).

Chumnanvej *et al.* (2020) evidenciaram maior quantidade de vasos formados em crânios de coelhos após a aplicação de um dispositivo similar ao Duragen® em região parietal a direita de coelhos, quando comparado ao enxerto autólogo de gálea. No presente estudo, a contagem de marcações com alfa-actina de músculo liso indicou número significativamente maior de neovasos no grupo de MDAPT aos 30 dias, em relação aos demais grupos avaliados no mesmo momento (Tabela 7). Porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos aos 15 e 45 dias após a craniectomia.

O resultado de contagem de neovasos (Tabela 7) recapitula a avaliação do processo inflamatório, pois a intensidade da inflamação aos 30 dias é significativamente maior no grupo que recebeu a MDAPT em relação aos demais grupos, no mesmo tempo de análise, mas não em 15 e 45 dias (Tabela 4). De maneira semelhante, o número de miofibroblastos com marcação de MDM2 é significativamente maior no grupo da tilápia em relação aos demais, tanto aos 15 quanto aos 30 dias, mas não em 45 dias (Tabela 5). Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que, ainda que em 30 dias possa haver uma intensidade de processo inflamatório significativamente maior no grupo Tilápia, esse processo não é superior ao observado no grupo Duragen em 15 dias.

Já aos 45 dias após a craniectomia, percebeu-se que a quantidade de neovasos e miofibroblastos é semelhante a do grupo Duragen® e do controle negativo (*sham*). Portanto, 45 dias após o procedimento cirúrgico todos os grupos evoluem em processos semelhantes de cicatrização, sem diferença de intensidade de inflamação, de quantidade de colágeno e de

quantidade de miofibroblastos marcados por alfa-actina ou MDM2 e quantidade de neovasos, como visto anteriormente.

7 CONCLUSÃO

O estudo permite concluir que a MDAPT provoca processo inflamatório aceitável, em 15, sem diferença significativa em relação ao do Duragen® e, em 45 dias, sem diferença em relação ao grupo controle negativo e Duragen®. Em todos os espécimes submetidos ao procedimento com esse material, observamos a formação de uma barreira mecânica capaz de proteger o tecido encefálico. Inicialmente, essa barreira é composta pela própria membrana de colágeno somada a células inflamatórias (15 dias) e, posteriormente (30 e 45 dias), por um tecido conjuntivo integrado aos tecidos do animal. Constatamos uma absorção gradual da estrutura de colágeno, de forma que, em 45 dias, encontramos apenas resíduos dessa estrutura.

Portanto, inferimos que a MDAPT apresenta algumas das importantes propriedades adequadas a um biomaterial a ser utilizado no reparo de dura-máter, pois provoca processo inflamatório autolimitado no tempo e no espaço, à semelhança do biomaterial biocompatível com o qual foi comparado. Ao longo do tempo, sofreu absorção progressiva pelo organismo, demonstrando propriedade de biodegradabilidade. Com esses resultados, vislumbra-se o seu potencial como futuro biomaterial para procedimentos neurocirúrgicos em humanos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ABOGHAZLEH, R. *et al.* Rodent brain extraction and dissection: a comprehensive approach. **MethodsX**, [s. l.], v. 12, p. 1-10, 7 Dec. 2023. DOI: 10.1016/j.mex.2023.102516. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215016123005125>. Acesso em: 21 nov. 2024.
- ABRUCEZE, L. H. B. **Avaliação da eficácia dos biocurativos em ratos Wistar com lesões de pele causadas por queimaduras**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Médica) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.
- ADEEB, N. *et al.* The cranial dura mater: a review of its history, embryology, and anatomy. **Child's Nervous System**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 827-837, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00381-012-1744-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00381-012-1744-6>. Acesso em: 17 mar. 2024.
- ALVES, A. P. N. N *et al.* Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Queimaduras**, Limeira, v. 14, n. 3, p. 203-210, jul./ago./set. 2015.
- APRILE, P.; LETOURNEUR, D.; SIMON-YARZA, T. Membranes for guided bone regeneration: a road from bench to bedside. **Advanced Healthcare Materials**, [s. l.], v. 9, n. 19, p. 1-24, Oct. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/adhm.202000707>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/adhm.202000707>. Acesso em: 23 mar. 2024.
- ARIGBEDE, A. O.; ADEYEMI, B. F.; FEMI-AKINLOSOTU, O. Relative biocompatibility of micro-hybrid and nano-hybrid light-activated composite resins. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1-6, 2017. DOI: <https://doi.org/10.15171/joddd.2017.001>. Disponível em: <https://joddd.tbzmed.ac.ir/Article/joddd-20170503143042>. Acesso em: 21 nov. 2024.
- BAO, Y. N. *et al.* Targeting tumor suppressor p53 for organ fibrosis therapy. **Cell Death & Disease**, [s. l.], v. 15, p. 1-11, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06702-w>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41419-024-06702-w>. Acesso em: 21 nov. 2024.
- BARBOLT, T. A. *et al.* Biocompatibility evaluation of dura mater substitutes in an animal model. **Neurological Research**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 813-820, Dec. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1179/016164101101199405>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1179/016164101101199405?needAccess=true>. Acesso em: 21 fev. 2024.
- BARON, J. M.; GLATZ, M.; PROKSCH, E. Optimal support of wound healing: new insights. **Dermatology**, Basel, v. 236, n. 6, 593-600, Nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1159/000505291>. Disponível em: <https://karger.com/drm/article/236/6/593/114582/Optimal-Support-of-Wound-Healing-New-Insights>. Acesso em: 25 mar. 2024.

BERJANO, R.; VINAS, F. C.; DUJOVNY, M. **Critical Reviews in Neurosurgery**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 217-222, 1999.

BERMUELLER, C. *et al.* Marine collagen scaffolds for nasal cartilage repair: prevention of nasal septal perforations in a new orthotopic rat model using tissue engineering techniques.

Tissue Engineering: Part A, [s. l.], v. 19, n. 19-20, p. 2201-2214, 2013. DOI:

<https://doi.org/10.1089%2Ften.tea.2012.0650>. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3762606/>. Acesso em: 14 mar. 2024.

BIRK, D. E.; MAYNE, R. Localization of collagen types I, III and V during tendon development: changes in collagen types I and III are correlated with changes in fibril diameter. **European Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 72, n. 4, p. 352-361, Apr. 1997.

BIROLI, F. *et al.* Novel equine collagen-only dural substitute. **Operative Neurosurgery**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 273-274, Mar. 2008. DOI: 10.1227/01.neu.0000317404.31336.69.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18424997/>. Acesso em: 14 mar. 2024.

BOU-GHARIOS, G.; ABRAHAM, D.; CROMBRUGGHE, B. de. Type I collagen structure, synthesis, and regulation. In: BILEZIKIAN, J. P. *et al.* (ed.). **Principles of bone biology**. 4th ed. London: Academic Press, 2020. v. 1, cap. 13, p. 295-337.

bi

CALEY, M. P.; MARTINS, V. L. C.; O'TOOLE, E. A. Metalloproteinases and wound healing.

Advances in Wound Care, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 225-234, 2015. DOI:

<https://doi.org/10.1089%2Fwound.2014.0581>. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4397992/>. Acesso em: 25 mar. 2024.

CAMPOS, A. C. L.; GROTH, A. K.; BRANCO, A. B. Assessment and nutritional aspects of wound healing. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 281-288, May 2008. DOI: 10.1097/MCO.0b013e3282fbd35a. Disponível em:

https://journals.lww.com/co-clinicalnutrition/abstract/2008/05000/assessment_and_nutritional_aspects_of_wound.15.aspx.

Acesso em: 21 fev. 2024.

CHUAN, D. *et al.* Fabrication and properties of a biomimetic dura matter substitute based on stereocomplex poly (lactic acid) nanofibers. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 15, p. 3729-3740, 2020. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S248998>. Disponível em:

<https://www.dovepress.com/fabrication-and-properties-of-a-biomimetic-dura-matter-substitute-base-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>. Acesso em: 21 fev. 2024.

CHUMNANVEJ, S. *et al.* In vivo evaluation of bilayer ORC/PCL composites in a rabbit model for using as a dural substitute. **Neurological Research**, [s. l.], v. 42, n. 10, p. 879-889, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/01616412.2020.1789383>. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01616412.2020.1789383>. Acesso em: 28 fev. 2024.

COSTA, B. S. *et al.* Clinical experience with a novel bovine collagen dura mater substitute.

Asian Journal of Neurosurgery, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 31-34, 2010. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3201076/>. Acesso em: 28 fev. 2024.

CUNHA, A. B. da. Insuficiência ventricular esquerda e sistema nervoso autônomo. **Editorial Laranjeiras**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 4, p. 35-37, set. 2004.

DENG, K. *et al.* Evaluation of efficacy and biocompatibility of a new absorbable synthetic substitute as a dural onlay graft in a large animal model. **Neurological Research**, [s. l.], v. 38, n. 9, p. 799-808, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1214418>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01616412.2016.1214418>. Acesso em: 28 fev. 2024.

DE SOUZA, R. B.; PINTO, F. C. G. Could Craniometric Measurements Explain the Growth of the Superior Sagittal Sinus? **Pediatric Neurosurgery**, v. 48, n. 4, p. 225–228, 2012.

EMING, S. A. *et al.* Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 517-527, July 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.04.009>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1084952109000913>. Acesso em: 25 mar. 2024.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 127, p. 514-525, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700701>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15332917>. Acesso em: 25 mar. 2024.

ESPOSITO, F. *et al.* Collagen-only biomatrix as a novel dural substitute: examination of the efficacy, safety and outcome: clinical experience on a series of 208 patients. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, [s. l.], v. 110, n. 4, p. 343-351, Apr. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2007.12.016>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0303846707003563?via%3Dihub>. Acesso em: 23 mar. 2024.

FISCHER, E. R. *et al.* Scanning electron microscopy. **Current Protocols in Microbiology**, [s. l.], p. 1-76, May 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc02b02s25>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22549162/>. Acesso em: 20 mar. 2024.

GREENHALGH, D. G. Models of wound healing. **Journal of Burn Care and Research**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 293-305, July./Aug. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.BCR.0000169885.66639.B5>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jbcr/article-abstract/26/4/293/4745884?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 12 mar. 2024.

GREENWALD, J. A. *et al.* Regional differentiation of cranial suture-associated dura mater in vivo and in vitro: implications for suture fusion and patency. **Journal of Bone and Mineral Research**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 2413-2430, Dec. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.12.2413>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1359/jbmr.2000.15.12.2413>. Acesso em: 20 mar. 2024.

GU, L.; FINDLEY, H. W.; ZHOU, M. MDM2 induces NF-κB/p65 expression transcriptionally through Sp1-binding sites: a novel, p53-independent role of MDM2 in doxorubicin resistance in acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, [Washington, DC], v. 99, n. 9, p. 3367-3375, 1 May 2002. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V99.9.3367>. Disponível em:

<https://ashpublications.org/blood/article/99/9/3367/54043/MDM2-induces-NF-B-p65-expression-transcriptionally>. Acesso em: 21 fev. 2024.

GUILLAMAT-PRATS, R. The role of MSC in wound healing, scarring and regeneration. **Cells**, Basel, v. 10, n. 7, p. 1-15, July 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fcells10071729>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/7/1729>. Acesso em: 20 mar. 2024.

HENRIKSEN, K.; KARSDAL, M. A. Type I collagen. In: KARSDAL, M. A. (ed.). **Biochemistry of collagens, laminins and elastin: structure, function and biomarkers**. London: Academic Print, 2016. p. 1-11.

HERFORD, A. S. et al. Evaluation of a porcine matrix with and without platelet-derived growth factor for bone graft coverage in pigs. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 1351-1358, 2012.

HOBAR, P. C. et al. The role of the dura in cranial bone regeneration in the immature animal. **Plastic and Reconstructive Surgery**, [s. l.], v. 92, n. 3, p. 405-410, Sep. 1993.

HSIEH JK et al. p53, p21(WAF1/CIP1), and MDM2 involvement in proliferation and apoptosis in an in vitro model of conditionally immortalized human vascular smooth muscle cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2000 Mar;20(3):636-44. doi: 10.1161/01.atv.20.3.636. PMID: 10712385.

HOLMES, D. F. et al. Collagen fibril assembly and function. In: LITSCHER, E. S.; WASSARMAN, P. M. (ed.). **Extracellular matrix and egg coats**. Cambridge, MA: Academic Press, 2018. p. 107-142.

ISGRÒ, M. A.; BOTTONI, P.; SCATENA, R. Neuron-specific enolase as a biomarker: biochemical and clinical aspects. In: SCATENA, R. (ed.). **Advances in cancer biomarkers**. Dordrecht: Springer, 2015. p. 125-143.

JANOWSKI, Miroslaw (ed.). **Experimental neurosurgery in animal models**. New York: Humana Press, 2016.

KARKUCAK, A. et al. Comparison of TachoComb and TissuDura in terms of adverse effects and complications in duraplasty in rats. **Turkish Neurosurgery**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 680-685, 2021. DOI: 10.5137/1019-5149.JTN.30444-20.2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33978197/>. Acesso em: 10 mar. 2024.

KASSAM, A. B. et al. Endoscopic endonasal skull base surgery: analysis of complications in the authors' initial 800 patients. **Journal of Neurosurgery**, v. 114, n. 6, p. 1544–1568, jun. 2011.

KASOJU, N. et al. Dip TIPS as a facile and versatile method for fabrication of polymer foams with controlled shape, size and pore architecture for bioengineering applications. **Plos One**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. e108792, Oct. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108792>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0108792>. Acesso em: 20 mar. 2024.

- KHURANA, D. *et al.* Biosubstitutes for dural closure: Unveiling research, application, and future prospects of dura mater alternatives. **Journal of Tissue Engineering**, [s. l.], v. 15, Jan./Dec. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1177/20417314241228118>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/20417314241228118>. Acesso em: 10 mar. 2024.
- KIM, B. C. *et al.* Fibroblasts from chronic wounds show altered TGF-β-signaling and decreased TGF-β type II receptor expression. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 195, n. 3, p. 331-336, June 2003. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.10301>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.10301>. Acesso em: 25 mar. 2024.
- KIM, D. W. *et al.* A transparent artificial dura mater made of silk fibroin as an inhibitor of inflammation in craniotomized rats: laboratory investigation. **Journal of Neurosurgery**, [s. l.], v. 114, n. 2, p. 485-490, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3171/2010.9.JNS091764>. Disponível em: <https://thejns.org/view/journals/j-neurosurg/114/2/article-p485.xml>. Acesso em: 13 mar. 2024.
- KINACI, A. *et al.* Histologic comparison of the dura mater among species. **Comparative Medicine**, [s. l.], v. 70, n. 2, p. 170-175, Apr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.30802%2FAALAS-CM-19-000022>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7137549/>. Acesso em: 17 mar. 2024.
- KUBYSHKIN, V. Stabilization of the triple helix in collagen mimicking peptides. **Organic and Biomolecular Chemistry**, [s. l.], v. 17, n. 35, p. 8031-8047, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1039/c9ob01646e>. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/ob/c9ob01646e>. Acesso em: 23 mar. 2024.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran – Patologia**: bases patológicas das doenças. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.
- KWARTLER, C. S. *et al.* Nuclear smooth muscle α-actin participates in vascular smooth muscle cell differentiation. **Nature Cardiovascular Research**, [s. l.], v. 2, p. 937-955, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s44161-023-00337-4>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s44161-023-00337-4>. Acesso em: 22 nov. 2024.
- LEAVITT, T. *et al.* Scarless wound healing: finding the right cells and signals. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 365, n. 3, p. 483-493, Sep. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007%2Fs00441-016-2424-8>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5010960/>. Acesso em: 25 mar. 2024.
- LEÓN-LÓPEZ, A. *et al.* Hydrolyzed collagen: sources and applications. **Molecules**, Basel, v. 24, n. 22, p. 1-16, Nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24224031>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/22/4031>. Acesso em: 23 mar. 2024.
- LI, Q. *et al.* A novel fish collagen scaffold as dural substitute. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 80, p. 346-351, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.102>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493117310627?via%3Dihub>. Acesso em: 10 mar. 2024.
- LI, Q. *et al.* Preparation and characterization of a novel acellular swim bladder as dura mater substitute. **Neurological Research**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 242-249, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/01616412.2018.1550139>. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01616412.2018.1550139>. Acesso em: 10 mar. 2024.

LI, S.; QUARTO, N.; LONGAKER, M. T. Dura mater-derived FGF-2 mediates mitogenic signaling in calvarial osteoblasts. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, [s. l.], v. 293, n. 6, C1834-C1842, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00135.2007>. Disponível em: https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpcell.00135.2007?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org. Acesso em: 20 mar. 2024.

LIMA VERDE, M. E. Q. *et al.* Nile tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) for burn treatment: ultrastructural analysis and quantitative assessment of collagen. **Acta Histochemica**, [s. l.], v. 123, n. 6, p. 1-8, 29 July 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151762>. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/66422>. Acesso em: 17 mar. 2024.

LIMA-JUNIOR, E. M. *et al.* Innovative treatment using tilapia skin as a xenograft for partial thickness burns after a gunpowder explosion. **Journal of Surgical Case Reports**, [s. l.], v. 6, p. 1-4, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093%2Fjscr%2Frjz181>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jscr/article/2019/6/rjz181/5518403>. Acesso em: 17 mar. 2024.

LIMA-JUNIOR, E. M. *et al.* Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 10-17, 2017. Disponível em: <http://rbqueimaduras.org.br/details/341/pt-BR/uso-da-pele-de-tilapia--oreochromis-niloticus---como-curativo-biologico-occlusivo--no-tratamento-de-queimaduras>. Acesso em: 17 mar. 2024.

LIU, L. *et al.* Tissue-engineered composite tracheal grafts create mechanically stable and biocompatible airway replacements. **Journal of Tissue Engineering**, [s. l.], v. 13, p. 1-11, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1177%2F20417314221108791>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9243572/>. Acesso em: 23 mar. 2024.

MARTINS, C. B. **Desenvolvimento de matriz biológica derivada de pele de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) e avaliação de sua biocompatibilidade em ratos**. 2023. Dissertação (Mestrado em Medicina Translacional) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/77414>. Acesso em: 23 mar. 2024.

MENDOZA HERNÁNDEZ, E. N. Desenvolvimento de matriz extracelular descelularizada (*scaffold*) de pele de tilápia como novo biomaterial para aplicação em medicina regenerativa. 2020. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/49896>. Acesso em: 6 fev. 2020.

MCCOWEN, K. C.; BISTRAN, B. R. Immunonutrition: problematic or problem solving? **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 77, n. 4, p. 764-770, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.4.764>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002916523056885>. Acesso em: 22 fev. 2024.

MIDWOOD, K. S.; WILLIAMS, L. V.; SCHWARZBAUER, J. E. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. **The International Journal of Biochemistry and Cell**

Biology, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 1031-1037, June 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.12.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1357272503004291?via%3Dihub>. Acesso em: 25 mar. 2024.

MIENALTOWSKI, M. J.; BIRK, D. E. Structure, physiology, and biochemistry of collagens. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [s. l.], v. 802, p. 5-29, 2014. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-007-7893-1_2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24443018/>. Acesso em: 25 mar. 2024.

MITTAL, M.; CHANDRA, S.; CHANDRA, S. Comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic sealers. **Journal of Endodontics**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. 622-624, Dec. 1995. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)81116-7](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)81116-7). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0099239906811167>. Acesso em: 21 nov. 2024.

MONTE, T. M. *et al.* Apert hand reconstruction with tilapia skin. **The Journal of Craniofacial Surgery**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 1939, Sep. 2022. DOI: 10.1097/SCS.0000000000008522. Disponível em: https://journals.lww.com/jcraniofacialsurgery/citation/2022/09000/apert_hand_reconstruction_with_tilapia_skin.66.aspx. Acesso em: 20 mar. 2024.

MOONEN, J. R. A. J. *et al.* Endothelial progenitor cells give rise to pro-angiogenic smooth muscle-like progeny. **Cardiovascular research**, [s. l.], v. 86, n. 3, p. 506-515, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq012>. Disponível em: <https://academic.oup.com/cardiovascres/article-abstract/86/3/506/317424?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 22 nov. 2024.

MOSSAZ, C. F.; KOKICH, V. G. Redevelopment of the calvaria after partial craniectomy in growing rabbits: the effect of altering dural continuity. **Acta Anatomica**, [s. l.], v. 109, n. 4, p. 321-331, 1981.

MOURSI, A. M. *et al.* Fibroblast growth factor 2 induces increased calvarial osteoblast proliferation and cranial suture fusion. **Cleft Palate-Craniofacial Journal**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 487-496, Sep. 2002. DOI: https://doi.org/10.1597/1545-1569_2002_039_0487_fgffic_2.0.co_2. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/10.1597/1545-1569_2002_039_0487_fgffic_2.0.co_2?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 23 mar. 2024.

NAOMI, R.; FAUZI, M. B. Cellulose/collagen dressings for diabetic foot ulcer: a review. **Pharmaceutics**, Basel, v. 12, n. 9, p. 1-18, Sep. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fpharmaceutics12090881>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7558961/>. Acesso em: 23 mar. 2024.

NAOMI, R.; RIDZUAN, P. M.; BAHARI, H. Current insights into collagen type I. **Polymers**, Basel, v. 13, n. 16, p. 1-19, Aug. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fpolym13162642>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8399689/>. Acesso em: 23 mar. 2024.

NEULEN, A. *et al.* Evaluation of efficacy and biocompatibility of a novel semisynthetic collagen matrix as a dural onlay graft in a large animal model. **Acta Neurochirurgica**, Wien, v. 153, n. 11, p. 2241-2250, 2011. DOI: 10.1007/s00701-011-1059-5. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3197932/>. Acesso em: 10 mar. 2024.

ONO, M. C. C. *et al.* Influência de dieta imunomoduladora na cicatrização cutânea em ratos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 432-438, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5935/2177-1235.2014RBCP0077>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbcn/a/t454sGvWpX3dnzq9HrQWTzd/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 22 fev. 2024.

OPPERMAN, L. A. *et al.* Cranial suture obliteration is induced by removal of transforming growth factor (TGF)-beta 3 activity and prevented by removal of TGF-beta 2 activity from fetal rat calvaria in vitro. **Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 164-173, July 1999.

ORTOLANI, E. *et al.* Mechanical qualification of collagen membranes used in dentistry. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, [Rome], v. 51, n. 3, p. 229-235, 2015. DOI: https://doi.org/10.4415/ann_15_03_11. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26428048/>. Acesso em: 23 mar. 2024.

OTTO, B. A. *et al.* Transsphenoidal approach with nasoseptal flap pedicle transposition: modified rescue flap technique. **The Laryngoscope**, [s. l.], v. 123, n. 12, p. 2976-2979, Dec. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/lary.24210>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lary.24210>. Acesso em: 14 mar. 2024.
PAKYARI, M. *et al.* Critical role of transforming growth factor beta in different phases of wound healing. **Advances in Wound Care**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 215-224, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0406>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3857353/>. Acesso em: 25 mar. 2024.

PASTAR, I. *et al.* Epithelialization in wound healing: a comprehensive review. **Advances in Wound Care**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. 445-464, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1089%2Fwound.2013.0473>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4086220/>. Acesso em: 25 mar. 2024.

PIEK, J. *et al.* Pharmacoeconomical consequences of postoperative CSF leaks after intracranial surgery: a prospective analysis. **Journal of Neurological Surgery: Part A**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 25-28, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0032-1304501>. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0032-1304501>. Acesso em: 14 mar. 2014.

PINHEIRO-NETO, C. D.; SNYDERMAN, C. H. Nasoseptal Flap. p. 42–55, 1 jan. 2012.

PONNUSWAMY, A.; HUPP, T.; FÅHRAEUS, R. Concepts in MDM2 Signaling: Allosteric Regulation and Feedback Loops. **Genes and Cancer**, [s. l.], v. 3, n. 3-4, p. 291-297, Mar./Apr. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1177/1947601912454140>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1947601912454140>. Acesso em: 22 fev. 2024.

PREVEDELLO, D. M. *et al.* History of endoscopic skull base surgery: its evolution and current reality. v. 107, n. 1, p. 206–213, 1 jul. 2007.

- RABINOWITZ, L. *et al.* Growth of rat cortical neurons on Duragen®, a collagen-based dural graft matrix. **Neurological Research**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 887-894, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1179/016164105X49364>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1179/016164105X49364>. Acesso em: 10 mar. 2024.
- RECH, T. H.; VIEIRA, S. R. R.; BRAUNER, J. S. Valor da enolase específica do neurônio como indicador de prognóstico pós-parada cardiorrespiratória. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 396-401, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0103-507x2006000400013>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbti/a/vVvGgXdkRmkcJnyYCvJss9x/?lang=pt>. Acesso em: 22 nov. 2024.
- RICARD-BLUM, S. The collagen family. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1-19, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>. Disponível em: <https://cshperspectives.cshlp.org/content/3/1/a004978.full>. Acesso em: 22 nov. 2024.
- RODRÍGUEZ, A. H. *et al.* Male-to-female gender-affirming surgery using nile tilapia fish skin as a biocompatible graft. **Journal of Minimally Invasive Gynecology**, [s. l.], v. 27, n. 7, p. 1474-1475, Nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmig.2020.02.017>. Disponível em: [https://www.jmig.org/article/S1553-4650\(20\)30120-5/abstract](https://www.jmig.org/article/S1553-4650(20)30120-5/abstract). Acesso em: 20 mar. 2024.
- SNYDERMAN, C. H. *et al.* Endoscopic reconstruction of cranial base defects following endonasal skull base surgery. **Skull Base**, New York, v. 17, n. 1, p. 73-78, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1055%2Fs-2006-959337>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1852577/>. Acesso em: 17 mar. 2024.
- SORUSHANOVA, A. *et al.* The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development. **Advanced Materials**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. e1801651, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.201801651>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adma.201801651>. Acesso em: 23 mar. 2024.
- SPECTOR, J. A. *et al.* Dura mater biology: autocrine and paracrine effects of fibroblast growth factor 2. **Plastic and Reconstructive Surgery**, [s. l.], v. 109, n. 2, p. 645-654, Feb. 2002.
- SUETAKE, T. *et al.* Functional analyses of the stratum corneum in scars: sequential studies after injury and comparison among keloids, hypertrophic scars, and atrophic scars. **Archives of Dermatology**, [s. l.], v. 132, n. 12, p. 1453-1458, 1996.
- SZWED, D. N.; SANTOS, V. L. P. dos. Fatores de crescimento envolvidos na cicatrização de pele. **Cadernos da Escola de Saúde**, Curitiba, v. 1, n. 15, p. 7-17, 2016. Disponível em: <https://portaldeperiodicos.unibrasil.com.br/index.php/cadernossaude/article/view/2450>. Acesso em: 22 fev. 2024.
- THADANI, V. *et al.* Creutzfeldt-Jakob disease probably acquired from a cadaveric dura mater graft: case report. **Journal of Neurosurgery**, [s. l.], v. 69, n. 5, p. 766-769, 1988.
- THOMASOVA, D. *et al.* p53-independent roles of MDM2 in NF-κB signaling: implications for cancer therapy, wound healing, and autoimmune diseases. **Neoplasia**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 1097-1101, Dec. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1593/neo.121534>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1476558612800467>. Acesso em: 22 fev. 2024.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **The Journal of International Medical Research**, [s. l.], v. 37, p. 1528-1542, Oct. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1177/147323000903700531>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/147323000903700531>. Acesso em: 25 mar. 2024.

WEBER, C.; PIEK, J.; GUNAWAN, D. Health care costs of incidental durotomy and postoperative cerebrospinal fluid leaks after elective spinal surgery. **European Spine Journal**, [s. l.], v. 24, n. 9, p. 2065-2068, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00586-014-3504-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00586-014-3504-7>. Acesso em: 12 mar. 2024.

YAMADA, S. *et al.* Potency of fish collagen as a *scaffold* for regenerative medicine. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2014, p. 1-8, May 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155%2F2014%2F302932>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4055654/>. Acesso em: 23 mar. 2024.

YU, J. C. *et al.* Regional differences of dura osteoinduction: squamous dura induces osteogenesis, sutural dura induces chondrogenesis and osteogenesis. **Plastic and Reconstructive Surgery**, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 23-31, July 1997.

ZERRIS, V. A. *et al.* Repair of the dura mater with processed collagen devices. **Journal of Biomedical Materials Research**, [s. l.], v. 83B, n. 2, p. 580-588, Nov. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30831>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.b.30831>. Acesso em: 12 mar. 2024.

ZHAO, H. *et al.* Murine double minute-2 inhibition attenuates cardiac dysfunction and fibrosis by modulating NF-κB pathway after experimental myocardial infarction. **Inflammation**, New York, v. 40, n. 1, p. 232-239, Feb. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0473-5>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10753-016-0473-5>. Acesso em: 25 mar. 2024.