



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

EMANUELA PAZ ROSAS

**ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS DE MASTÓCITOS NA DURA-MÁTER
HUMANA: LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE CGRP E ÓXIDO NÍTRICO SOB AÇÃO DO
TOPIRAMATO**

Recife,

2021

EMANUELA PAZ ROSAS

**ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS DE MASTÓCITOS NA DURA-MÁTER
HUMANA: LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE CGRP E ÓXIDO NÍTRICO SOB AÇÃO DO
TOPIRAMATO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de doutora em Biologia Aplicada a Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença

Co-orientadora: Profa. Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Recife,
2021.

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB4/1728

Rosas, Emanuela Paz

Aspectos morfofisiológicos de mastócitos na dura-máter humana: liberação *in vitro* de CGRP e óxido nítrico sob ação do topiramato / Emanuela Paz Rosas – 2021.

124 f. : il., fig., tab.

Orientador: Marcelo Moraes Valença

Coorientadora: Manuela Figueroa Lyra de Freitas

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2021.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Peptídeos 2. Mastócitos 3. Óxido nítrico I. Valença, Marcelo Moraes (orient). II. Freitas, Manuela Figueroa Lyra de (coorient.). III. Título.

612.015756

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-163

EMANUELA PAZ ROSAS

**ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS DE MASTÓCITOS NA DURA-MÁTER
HUMANA: LIBERAÇÃO IN VITRO DE CGRP E ÓXIDO NÍTRICO SOB AÇÃO
DO TOPIRAMATO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde. Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovado em: 30/09/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dra. Wylla Tatiana Ferreira e Silva (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dra. Daniella Araújo de Oliveira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dra. Paloma Lys de Medeiros (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dra. Ivone Antônia de Souza (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

*Dedico a Deus, a meus pais, a minha família e a todos
que contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Pai e meu Criador, que cuida de mim nos mínimos detalhes, que está todos os dias me fortalecendo e me guiando em tudo, a ti meu Senhor toda honra e glória!

A meu pai João Rafael Rosas pelo amor, apoio e incentivo, e em especial a minha mãe Silvania Tavares Paz, por ser essa mulher guerreira, um exemplo de mulher e de profissional sempre dedicada, que esteve ao meu lado em todas as etapas desse doutorado me ajudando, ensinando, apoiando e dando forças quando precisei, sou muito grata por sua vida e por tudo que você faz por mim. Palavras ainda não são suficientes para expressar o meu amor e gratidão a vocês. Amo muito vocês, pai e mãe!

A minha família, por todo apoio e incentivo.

Ao meu namorado Rhânniel Clayton Barnabé Santana, por toda paciência, amor, ajuda e apoio em todos os momentos, muito obrigada meu amor, te amo!

Aos meus orientadores Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença e Prof. Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas, por todo aprendizado que passaram, por toda orientação, carinho e apoio durante toda a jornada do doutorado.

A Prof. Dra. Daniella Araújo de Oliveira por toda ajuda e contribuição para que os experimentos fossem realizados.

A Raísa Costa, Ana Clara de Souza, Amanda Araújo, Ana Paula Fernandes, Camila Almeida, Sabrina Santana, José Wellinton da Silva, Camila Alves e Bruno Veras pela amizade, dedicação e ajuda seja nos experimentos seja na escrita dos artigos, o meu muito obrigada a vocês!

A Prof. Dr. Jeymesson Raphael Vieira por todo aprendizado e ajuda que tive durante o estágio à docência.

A Prof. Dra. Paloma Lys Medeiros por todo aprendizado e ajuda que tive não só durante o estágio à docência, bem como em sua colaboração seja na revisão e escrita do artigo e tese, muito obrigada!

Aos médicos Patologistas, técnicos de necropsia e funcionários do SVO, que foram fundamentais nas coletas da dura-máter, sem vocês nada teria sido feito, muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Arthur Clarck, Prof. Dr. Mário Ribeiro, Msc. Francisco Paes e a Prof. Dra. Wylla Tatiana por toda ajuda e apoio.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia aplicada à saúde e a todos funcionários, técnicos, professores, coordenadores e ao secretário Fábio Costa pela amizade, por todo apoio, colaboração frente a minha pesquisa e aos conhecimentos adquiridos com todas as disciplinas.

A Capes, pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse executado e concluído, o meu muito obrigada!

*“Provai, e vede que o Senhor é bom,
bem-aventurado o homem que nele confia.”*

Salmos 34:8

RESUMO

A dura-máter intracraniana humana é a meninge mais externa que recobre o cérebro e possui vasos sanguíneos, mastócitos e fibras nervosas que exercem um papel importante em processos neuroinflamatórios, como a migrânea. O topiramato é um medicamento profilático da migrânea, contudo sua ação na dura-máter, ainda é incerta. Neste contexto, objetivou-se avaliar os aspectos morfofisiológicos de mastócitos na dura-máter humana e a liberação *in vitro* de óxido nítrico (NO), de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a degranulação de mastócitos sob ação do topiramato. Em uma primeira análise foram coletadas oito amostras de dura-máter intracraniana de cadáveres humanos. As amostras inteiras foram fixadas, e dois fragmentos de 1,5 cm² cada, foram cortados de quatro distintas áreas da convexidade da dura-máter, totalizando 64 fragmentos. Foram avaliados os parâmetros morfofisiológicos: distância dos mastócitos aos vasos, densidade de mastócitos e porcentagem de mastócitos degranulados. Em outra análise, os espécimes de dura-máter obtida de cadáveres (n=4) foram lavadas com fluido intersticial sintético (SIF) a 25° C por 30 minutos. Posteriormente, foram divididas em fragmentos (n=7) que foram incubados por 15 minutos com SIF e em seguida por 30 minutos na presença ou não do topiramato em diferentes concentrações: 10⁻⁶ M, 10⁻⁸ M e 10⁻¹⁰ M. Após o tratamento, o meio de incubação foi trocado por uma solução de cloreto de potássio (KCl) a 60 mM por 30 minutos. O teor de CGRP e NO liberado foi quantificado pelo método de ELISA e Reação de Griess, respectivamente. Os fragmentos de dura-máter das duas análises foram transferidos para o formol tamponado a 10% e em seguida foi feito o processamento histológico. A degranulação dos mastócitos foi examinada por microscopia óptica. A primeira análise demonstrou um maior número de mastócitos próximos de vasos venosos foi encontrado na camada periosteal (17,01 ± 10,13 células/ mm²) do que na camada meníngea (14,10 ± 6,95 células/ mm²). Os mastócitos próximos ao seio sagital superior se apresentaram em maior quantidade juntos aos vasos venosos (16,71 ± 10,05 células/ mm²) do que aos vasos arteriais (11,18 ± 7,52 células/ mm²). A segunda análise mostrou que o tratamento com topiramato na concentração de 10⁻¹⁰ M apresentou uma menor porcentagem de mastócitos degranulados por mm² (75,39% ± 0,27) quando comparado com controle. Desta forma, este estudo evidenciou que os mastócitos estão localizados próximos aos vasos venosos da camada periosteal e na região proximal do seio sagital superior. Além disso, sugere-se que o topiramato nas menores concentrações apresenta um efeito protetivo sobre a degranulação dos mastócitos.

Palavras-chave: Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina; Topiramato; Óxido nítrico; Mastócitos; Seio sagital superior; Degranulação celular.

ABSTRACT

The human intracranial dura mater is the outermost meninges covering the brain and has blood vessels, mast cells, and nerve fibers that play an essential role in neuroinflammatory processes linked to the physiopathology of migraine disorders. Topiramate is a prophylactic migraine drug, but its action on the dura mater is still uncertain. In this context, the objective of this study was to evaluate the morphophysiological aspects of mast cells in the human dura mater and the in vitro release of nitric oxide (NO), calcitonin gene-related peptide (CGRP), and the degranulation of mast cells under the action of topiramate. In a first analysis, eight samples of intracranial dura mater from human cadavers were collected. The entire samples were fixed, and two fragments of 1.5 cm² each were cut from four distinct areas of the convexity of the dura mater, totaling 64 fragments. The morphophysiological parameters were evaluated: distance from mast cells to vessels, mast cell density, and percentage of degranulated mast cells. In another analysis, dura mater specimens obtained from cadavers (n=4) were washed with synthetic interstitial fluid (SIF) for 30 minutes. Subsequently, they were divided into fragments (n=7) that were incubated for 15 minutes with SIF and then for 30 minutes in the presence or not of topiramate at different concentrations: 10⁻⁶ M, 10⁻⁸ M, and 10⁻¹⁰ M. After treatment, the incubation medium was changed to a 60 mM potassium chloride (KCl) solution for 30 minutes. The content of CGRP and NO released was quantified by ELISA and Griess Reaction methods, respectively. The dura mater fragments from the two analyzes were transferred to 10% buffered formalin and then histologically processed. Mast cell degranulation was examined by light microscopy. The first analysis showed that more mast cells close to venous vessels were found in the periosteal layer (17.01 ± 10.13 cells/ mm²) than in the meningeal layer (14.10 ± 6.95 cells/ mm²). Mast cells more proximate to the superior sagittal sinus were present in greater numbers near the venous vessels (16.71 ± 10.05 cells/ mm²) than to the arterial vessels (11.18 ± 7.52 cells/ mm²). The second analysis showed that the treatment with topiramate at a 10⁻¹⁰ M concentration conferred a lower percentage of degranulated mast cells per mm² ($75.39\% \pm 0.27$) compared to the control group. Thus, this study showed that mast cells are located close to the venous vessels of the periosteal layer and in the proximal region of the superior sagittal sinus. Furthermore, it is suggested that topiramate at lower concentrations has a protective effect on mast cell degranulation.

Keywords: Calcitonin Gene-Related Peptide; Topiramate; Nitric Oxide; Mast Cells; Superior Sagittal Sinus; Cell Degranulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação estrutural das meninges cerebrais.....	19
Figura 2 – Visão posterior da dura-máter intracraniana humana.....	20
Figura 3 – Vascularização da dura-máter intracraniana.....	21
Figura 4 – Seios venosos da dura-máter humana.....	22
Figura 5 – Inervação dural.....	23
Figura 6 – Células imunes da dura-máter.....	24
Figura 7 – Hipóteses de mecanismos de inflamação neurogênica na dura-máter.....	27
Figura 8 – Origem e diferenciação dos mastócitos.....	32
Figura 9 – Representação esquemática de degranulação do mastócito de forma rápida ou controlada	34
Figura 10 – Estrutura molecular do topiramato.....	38
Figura 11 – Localização das áreas analisadas para histomorfometria dos mastócitos em dura-máter intracraniana humana.....	42
Figura 12 – Resumo esquemático das análises morfofisiológicas.....	44
Figura 13 – Amostra de dura-máter humana intracraniana pós-mortem.....	45
Figura 14 – Fotomicrografias de mastócitos próximos aos vasos arteriais na dura-máter humana.....	50
Figura 15 – Fotomicrografias de mastócitos próximos aos vasos venosos na dura-máter humana.....	51
Figura 16 – Fotomicrografia de mastócito degranulado.....	51
Figura 17 – Fotomicrografias de mastócitos marcados por triptase próximos a vasos sanguíneos na dura-máter humana.....	52
Figura 18 – Fotomicrografias de amostra de dura-máter intracraniana humana tratada com topiramato 10^{-10} M.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações sobre as amostras de dura-máter intracraniana humana.....	41
Tabela 2 – Grupos experimentais e seus estímulos/tratamentos.....	46
Tabela 3 – Etapas de cada grupo experimental <i>in vitro</i>	47
Tabela 4 – Análise comparativa dos tipos de parâmetros morfofisiológicos de mastócitos em estudos com dura-máter intracraniana em diferentes espécies.....	53
Tabela 5 – Análise quantitativa da densidade dos mastócitos em diferentes distâncias em relação ao vaso arterial nas camadas e posições quanto ao seio sagital superior da dura-máter intracraniana correspondente a convexidade de oito cadáveres humano.....	54
Tabela 6 – Análise quantitativa da densidade dos mastócitos em diferentes distâncias em relação ao vaso venoso nas camadas e posições quanto ao seio sagital superior da dura-máter intracraniana correspondente a convexidade de oito cadáveres humanos.....	54
Tabela 7 – Análise quantitativa da densidade dos mastócitos a uma distância de 0 a 150 µm dos vasos em relação aos tipos de camadas da dura-máter intracraniana correspondente a convexidade de oito cadáveres humanos.....	55
Tabela 8 – Análise quantitativa da densidade dos mastócitos a uma distância de 0 a 150 µm dos vasos em relação as posições quanto ao seio sagital superior (distal e proximal) da dura-máter intracraniana correspondente a convexidade de oito cadáveres humanos.....	55
Tabela 9 – Análise quantitativa da densidade dos mastócitos a uma distância de 0 a 150 µm dos vasos em relação ao sexo da dura-máter intracraniana correspondente a convexidade de oito cadáveres humanos.....	55
Tabela 10 – Densidade e porcentagem de mastócitos granulados e degranulados por mm ² da dura-máter intracraniana dos grupos experimentais.....	58
Tabela 11 – Fração e porcentagem da presença de mastócitos granulados por amostragem de dura-máter intracraniana humana nos grupos experimentais.....	59
Tabela 12 – Fração e porcentagem de mastócitos granulados e degranulados totais encontrados em amostras	59
Tabela 13 – Liberação <i>in vitro</i> de Óxido Nítrico (µM) pela dura-máter intracraniana humana das três etapas experimentais dos grupos ao longo do tempo.....	60
Tabela 14 – Liberação <i>in vitro</i> de CGRP (pg/mL) de dura-máter intracraniana humana da etapa incubação dos grupos experimentais.....	60

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AC	Anidrase carbônica
ACh	Acetilcolina
AMM	Artéria meníngea média
Ca ²⁺	Cálcio
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CLR	Receptor tipo receptor de calcitonina
CTMCs	Mastócitos de tecido conjuntivo
DAC	Depressão alastrante cortical
eNOS	Sintase de óxido nítrico endotelial
FcγRI	Receptor de alta afinidade para a região Fc da imunoglobulina E (IgE)
GABA	Ácido <i>gama</i> -aminobutírico
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
iNOS	Sintase de óxido nítrico indutível
K ⁺	Potássio
KCl	Cloreto de potássio
M	Molar
MAP	Proteína quinase ativada por mitogênio
MC	Mastócito
MCA	Migrânea com aura
mM	Milimolar
MMCs	Mastócitos de mucosa
MSA	Migrânea sem aura
Na ⁺	Sódio
NA	Noradrenalina
NKA	Neuroquinina A
nNOS	Sintase de óxido nítrico neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase

NPY	Neuropeptídeo Y
PACAP	Polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária
PBS	Tampão fosfato salino
RAMP1	Proteína modificadora da atividade do receptor 1
RCP	Proteína do componente receptor
SABC	Complexo Avidina-biotina
SIF	Fluido intersticial sintético
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SP	Substância P
SSS	Seio sagital superior
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TP	Topiramato
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VIP	Polipeptídeo intestinal vasoativo
VPA	Ácido valpróico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 OBJETIVOS.....	18
1.1.1 Objetivo Geral.....	18
1.1.2 Objetivos Específicos.....	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 DURA-MÁTER INTRACRANIANA HUMANA.....	19
2.1.1 Aspectos anatômicos e histológicos da dura-máter humana.....	19
2.1.2 Migrânea.....	24
2.1.3 Relação da dura-máter e a inflamação estéril na fisiopatologia da migrânea.....	26
2.2 O CGRP E SEU PAPEL NA DURA-MÁTER INTRACRANIANA.....	28
2.3 O ÓXIDO NÍTRICO E SEU PAPEL NA DURA-MÁTER INTRACRANIANA.....	29
2.4 MASTÓCITOS.....	30
2.4.1 Origem, desenvolvimento e localização dos mastócitos.....	30
2.4.2 Características histomorfológicas e ativação.....	32
2.4.3 Papel dos mastócitos na dura-máter intracraniana.....	35
2.5 TRATAMENTO PROFILÁTICO DA MIGRÂNEA.....	36
2.5.1 Antiepilépticos.....	37
2.5.1.1 Topiramato.....	37
3 MÉTODOS.....	40
3.1 DESENHO DO ESTUDO.....	40
3.2. LOCAL DO ESTUDO.....	40
3.3 PERÍODO DO ESTUDO.....	40
3.4 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	40
3.4.1 Obtenção de dura-máter intracraniana humana.....	40
3.4.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	40
3.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS I.....	41
3.5.1 Dura-máter intracraniana humana.....	42
3.5.2 Identificação de mastócitos pela coloração de azul toluidina (0,1%).....	42
3.5.3 Identificação de mastócitos pela expressão da Triptase por imuno-histoquímica.....	42
3.5.4 Análise microscópica.....	43
3.5.5 Análise morfofisiológica dos mastócitos.....	43

3.5.6 Análise estatística.....	44
3.6 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS II.....	44
3.6.1 Amostras.....	44
3.6.2 Conservação da dura-máter.....	45
3.6.3 Grupos experimentais.....	45
3.6.4 Tratamento da dura-máter <i>in vitro</i>	46
3.6.5 Liberação <i>in vitro</i> de Óxido Nítrico (NO).....	47
3.6.6 Liberação <i>in vitro</i> de CGRP.....	48
3.6.7 Análise histológica dos mastócitos.....	48
3.6.8 Análise Estatística.....	48
4 RESULTADOS	49
4.1 ANÁLISES MORFOFISIOLÓGICAS DE MASTÓCITOS EM DIFERENTES PARTES DA DURA-MÁTER INTRACRANIANA HUMANA.....	49
4.2 ANÁLISES HISTOLÓGICAS DA DEGRANULAÇÃO DOS MASTÓCITOS DO ESTUDO <i>IN VITRO</i>	56
4.3 ANÁLISES DA LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ÓXIDO NÍTRICO E CGRP.....	56
5 DISCUSSÃO.....	61
5.1 ANÁLISES MORFOFISIOLÓGICAS DE MASTÓCITOS EM DURA-MÁTER INTRACRANIANA HUMANA.....	61
5.2 ANÁLISES HISTOLÓGICAS DA DEGRANULAÇÃO DOS MASTÓCITOS DO ESTUDO <i>IN VITRO</i>	65
5.3 ANÁLISES DA LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ÓXIDO NÍTRICO E CGRP.....	66
6 CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	70
APÊNDICE A – REVISÃO DE LITERATURA.....	87
APÊNDICE B – SHORT COMMUNICATION.....	93
APÊNDICE C – ARTIGO I.....	96
APÊNDICE D – ARTIGO EM COLABORAÇÃO.....	119
APÊNDICE E – ARTIGO EM COLABORAÇÃO.....	120
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	121
ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	122
ANEXO C – ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO.....	124

1 INTRODUÇÃO

A dura-máter intracraniana é uma meninge fibrosa e resistente que recobre o sistema nervoso central (SNC). Ela está localizada entre o crânio e as leptomeninges, e é composta anatomicamente por três camadas: a camada externa ou periosteal, a camada interna ou meníngea e a camada celular da borda dural ou neurotélion subdural. Essas camadas separam-se somente nos seios venosos e na foice cerebral (ADEEB et al 2012; HAINES, 1991; ANDRES et al 1987).

Essa meninge se caracteriza por ser amplamente suprida de vasos sanguíneos, e dentre esses, os principais vasos arteriais são as artérias meníngeas posterior, média (AMM) e anterior. Além disso, os principais vasos venosos da dura-máter estão paralelos ao trajeto das artérias meníngeas, e drenam para vasos na camada periosteal ou nos seios venosos derais (LEVY et al, 2019). Os seios venosos derais são responsáveis por conduzir e controlar o fluxo venoso do cérebro e tem um papel importante na reabsorção do líquido cefalorraquidiano (JOHANSON et al. 2008).

A percepção e a resposta aos estímulos externos da dura-máter humana são realizadas pelas fibras nervosas sensoriais e autonômicas. Essas fibras são localizadas principalmente ao redor de vasos sanguíneos (artérias), tentório do cerebelo e seios venosos (ANDRES et al. 1987; O'CONNOR & VAN DER KOOY, 1986; MESSLINGER et al. 1993; STRASSMAN et al. 2004; LEE et al. 2017; EDVINSSON & UDDMAN, 1982; MAYBERG et al. 1984). Estudos têm demonstrado que a inervação sensorial da dura-máter intracraniana, artérias e seios venosos expressam neuropeptídeos tais como: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a substância P (SP) (STRASSMAN et al. 2004; EDVINSSON et al. 1983; EDVINSSON & UDDMAN, 1981; SAMPAOLO et al. 2017). Já os neurônios autonômicos expressam polipeptídeo ativador de ciclase adenilato pituitária (PACAP), óxido nítrico (NO), polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), norepinefrina, acetilcolina (ACh) e neuropeptídeo Y (NPY) (LEVY et al., 2019; ARTICO E CAVALLOTTI, 2001).

Uma variedade de células imunes, tais como macrófagos, células dendríticas e mastócitos são encontradas na dura-máter (MCMENAMIN, 1999; DIMLICH et al. 1991). Essa população celular em comunicação com fibras nervosas sensoriais e autonômicas tem sido considerado um dos requisitos para a deflagração da inflamação neurogênica estéril durante a dor de cabeça da migrânea, que consiste na liberação de neuropeptídeos, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de proteínas plasmáticas, vasodilatação arterial e ativação de células imunes residentes (STRASSMAN & LEVY, 2006; FRICKE et al. 2001;

MCMENAMIN, 1999; DIMITRIADOU et al. 1997; DIMLICH et al. 1991; MARKOWITZ et al, 1987; MOSKOWITZ et al, 1979).

Os mastócitos são células imunológicas encontradas em abundância na dura-máter de ratos e humanos, que estão localizadas próximas aos nociceptores meníngeos ao redor dos vasos sanguíneos (DIMLICH et al., 1991; ROZNIECKI et al., 1999; ARTICO e CAVALLOTTI, 2001). Essas células são responsáveis por liberar histamina e vários outros mediadores inflamatórios dos seus grânulos e, deste modo, aumentam as alterações inflamatórias meníngeas, a sensibilização das fibras aferentes e sustentam a atividade nociceptiva na patogênese da migrânea (MESSLINGER et al., 2011; ZHANG et al, 2013b). Além disso, moléculas liberadas do mastócito como a histamina, NO, VIP, e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), podem ser responsáveis pela vasodilatação na dor de cabeça da migrânea (ROZNIECKI et al 1999).

O topiramato, um derivado do monossacarídeo D-frutose, é desenvolvido como anticonvulsivante, porém tem sido demonstrado como um medicamento eficaz para a prevenção da migrânea através de um mecanismo mediado pelo ácido *gama*-aminobutírico (GABA), inibindo neurônios do complexo trigeminocervical. Além disso, é visto que o topiramato inibe a liberação de CGRP dos neurônios trigeminais. Tem sido observado que essa droga possui um efeito inibidor sobre canais de cálcio (Ca^{2+}) dependentes de alta-voltagem na substância cinzenta central (BRANDES et al., 2004; DIENER et al., 2004; SILBERSTEIN et al., 2004; MACIEL-JR, 2006). Contudo, ainda não foi esclarecido a ação deste fármaco em locais periféricos, como a dura-máter intracraniana e em células imunes como os mastócitos.

Desta forma, este trabalho tem como finalidade avaliar os aspectos morfofisiológicos de mastócitos, a liberação *in vitro* de óxido nítrico, CGRP e degranulação de mastócitos sob a ação do topiramato na dura-máter intracraniana humana.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

- Investigar os aspectos morfofisiológicos de mastócitos, a liberação *in vitro* de óxido nítrico, CGRP e degranulação de mastócitos sob a ação do topiramato na dura-máter intracraniana humana.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Medir a distância dos mastócitos para vasos arteriais e/ ou venosos;
- Quantificar e comparar a densidade de mastócitos em quatro diferentes áreas da dura-máter intracraniana humana;
- Identificar a expressão de triptase em mastócitos nas amostras de dura-máter intracraniana humana;
- Avaliar os níveis de óxido nítrico e de CGRP de dura-máter humana pós-mortem *in vitro* na presença ou ausência do topiramato;
- Analisar e quantificar a porcentagem de mastócitos granulosos e degranulosos em amostras de dura-máter submetidas ou não ao tratamento com topiramato em diferentes concentrações *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

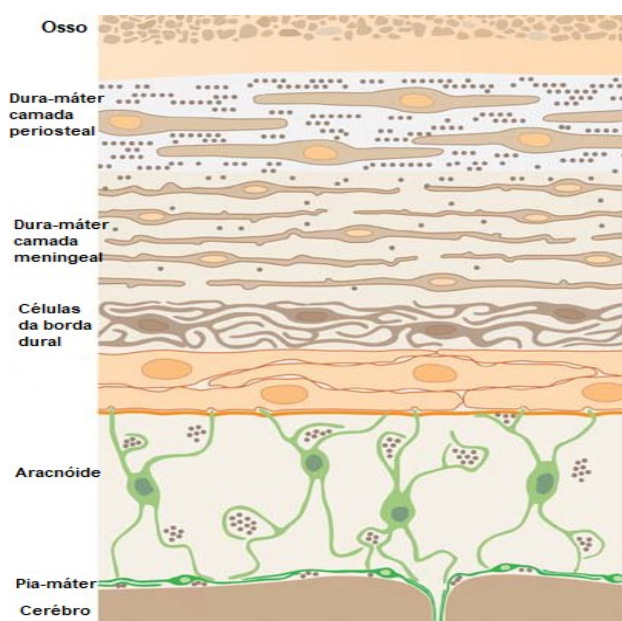
2.1 DURA-MÁTER INTRACRANIANA

2.1.1 Aspectos anatômicos e histológicos da dura-máter humana

O termo “meninges”, é um termo grego que significa “membrana”, e foi descrita primeiramente como uma cobertura membranosa do sistema nervoso central pelo médico e anatomista Erasístrato no século III a. C. Posteriormente, Galeno descreveu duas camadas, os quais nomeou de pacheia e lepte, no segundo século d.C. Um médico árabe e muçulmano anônimo observou essas três meninges e as traduziram como “umm al-dimagh” (mãe do cérebro), e Hali Abbas subdividiu-as em “umm al-ghalida” (mãe forte) e “umm al-raqiqah” (mãe magra). Esses termos foram traduzidos para o latim por Stephen de Antioquia, do século XII, como a dura-máter e a pia-máter. Herófilo no século III a. C mencionou pela primeira vez a palavra aracnóide, e o anatomista holandês Frederik Ruysch descreveu essa mesma meninge no século XVII (KOTHARI & GOEL, 2006; O’RAHILLY & MULLER, 1986).

As meninges intracranianas dividem-se em dura-máter (ou paquimeninge), aracnóide e pia-máter (ou leptomeninge). A dura-máter intracraniana é a camada mais espessa e externa que cobre a cavidade craniana, e está ligada a esta cavidade pelas suturas e saídas dos nervos cranianos. Esta meninge é dividida em três camadas: periosteal, meningeal e as células da borda dural, esta última separa a dura-máter da meninge aracnóide externa (Figura 1) (ADEEB et al, 2012; ANDRES, 1967).

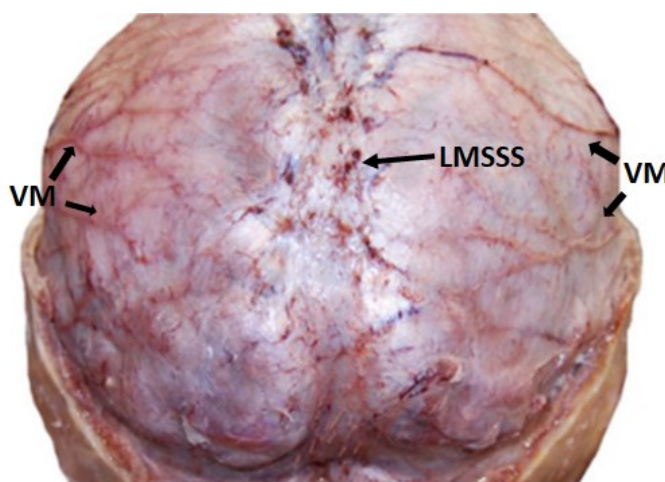
Figura 1 – Representação estrutural das meninges cerebrais.



Fonte: Adaptado de Mack et al, 2009.

A camada periosteal está aderida a calvária na base do crânio, formando o revestimento da superfície interna (SNELL, 2010; MACK et al, 2009; NABESHIMA et al, 1975). Nessa camada encontram-se nervos, vasos sanguíneos (Figura 2) e linfáticos. Ela é contínua ao periósteo na superfície externa do osso do crânio ao nível de seus forames, e aos ligamentos nas suturas cranianas, não havendo comunicação com a dura-máter da medula espinhal (SNELL, 2010; PATEL & KIRMI, 2009). Além disso, há uma presença de fibroblastos alongados nesta camada com amplos espaços intercelulares (KINACI et al, 2020)

Figura 2 – Visão posterior da dura-máter intracraniana humana



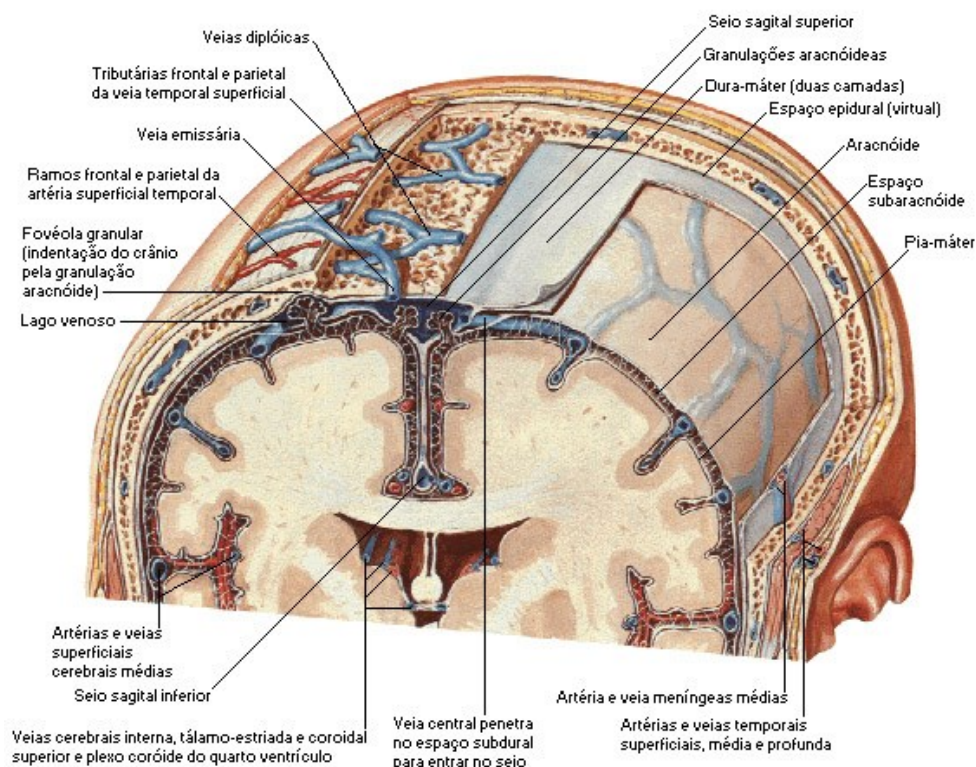
VM- Vasos meníngeos; LMSSS- linha média do seio sagital superior.
Fonte: Adaptado de Adeeb et al 2012.

A camada meníngea, conhecida como camada média, encontra-se aderida em diversos lugares a camada periosteal, exceto nos seios venosos, na foixe cerebral, foixe do cerebelo e tentório do cerebelo. Ao nível do forame magno, essa camada se comunica com a dura-máter da medula espinhal (ADEEB et al, 2012). Além disso, ela possui uma maior quantidade de fibroblastos e menos colágeno do que a camada periosteal, bem como uma maior rede de capilares sanguíneos (KINACI et al, 2020; HAMMERSEN, 1963).

A camada de células da borda dural era conhecida anteriormente como mesotélio subdural, neurotélio, zona superficial, camada de células durais internas, camada de células subdurais e camada limitante da dura. Em sua composição há fibroblastos achatados com poucas junções intercelulares e pouco de colágeno extracelular, além de espaços extracelulares de vários tamanhos e formas. Essa camada está posicionada como interface entre a dura-máter e a aracnóide (KINACI et al, 2020; MACK et al, 2009; HAINES et al, 1993; NABESHIMA et al 1975).

Esta meninge é suprida por artérias, veias, uma rede de capilares e de vênulas pós-capilares capazes de suportar o tráfego de células imunológicas. Os principais vasos sanguíneos percorrem principalmente pela camada periosteal e podem ser divididos de acordo com diferentes áreas do crânio. Em relação aos vasos arteriais, a AMM é considerada a maior e mais importante artéria da dura-máter. Ela entra na cavidade craniana pelo forame espinhoso, e corre em um sulco anterolateral na parte escamosa do osso temporal. Divide-se em três ramos, os ramos anterior, médio e posterior. O ramo anterior corre posterior à sutura coronal, o ramo médio corre ao longo da área do sulco lateral, e o ramo posterior segue a borda inferior do lobo temporal (SHUKLA et al, 2002; KERBER & NEWTON, 1973). Quanto à drenagem venosa da dura-máter, existem duas rotas identificadas: (1) das veias meníngeas que seguem as artérias meníngeas e a (2) das veias que terminam nos seios venosos durais. As duas veias meníngeas seguem de cada lado da artéria meníngea. E as outras veias, por sua vez, terminam seu percurso entrando no seio sagital superior (SSS) ou nos seios transversais, ou ainda nos lagos venosos, que recebem as veias diplóicas, emissárias e intracranianas (STANDRING, 2008; SHUKLA et al, 2002; ROLAND et al, 1987) (Figura 3).

Figura 3 – Vascularização da dura-máter intracraniana.

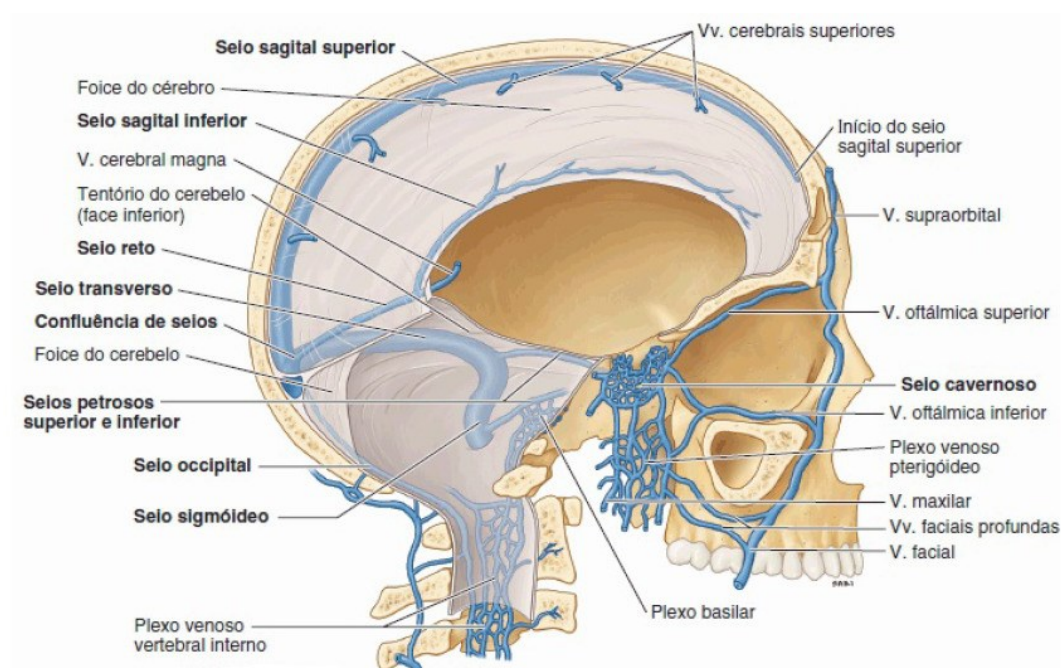


Fonte: NETTER, 2011. Disponível em: <https://anatomia-papel-e-caneta.com/meninges-dura-mater-aracnoide-mater-pia-mater/> Acesso em: 08/06/2020.

Os seios venosos durais são canais revestidos por células endoteliais, lâmina elástica interna e estão localizados entre as camadas periosteal e meníngea da dura-máter. Eles não possuem a camada muscular e adventícia como outras veias, nem válvulas (PARENT, 1996; TOKIGUCHI et al, 1998). Eles recebem sangue das veias cerebrais e o líquido cefalorraquidiano do espaço subaracnóideo através das vilosidades aracnóideas. Além disso, fazem a drenagem das veias extracranianas do crânio pelas veias emissárias e veias diplóicas (SHUKLA et al, 2002; ROLAND et al, 1987; KERBER & NEWTON, 1973; BALO, 1950).

Entre os principais seios venosos está o SSS, que fica na margem superior da foice cerebral (Figura 4). Ele se estende desde a crista *galli* (parte anterior) e termina ao nível da protuberância occipital interna (parte posterior), onde se desvia para o lado direito, e se torna contínuo ao seio transversal correspondente. Na seção transversal, o SSS possui uma forma triangular sendo mais estreito próximo da crista *galli*, e ampliando gradualmente em seu curso. O SSS recebe as veias meníngeas, veias cerebrais superiores e as veias diplóicas pelas lacunas laterais e as veias pericranianas pelos forames parietais (STANDRING, 2008).

Figura 4 – Seios venosos da dura-máter humana.



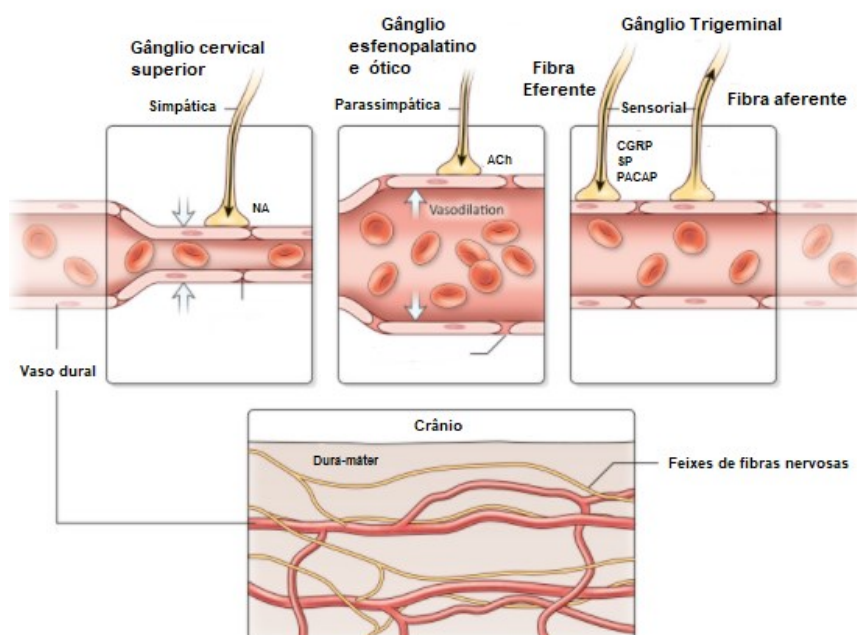
Fonte: MOORE, 2014. Disponível em: <https://anatomia-papel-e-caneta.com/veias-do-encefalo/>
Acesso em 20/07/2021.

A dura-máter intracraniana tem uma rica inervação de fibras nervosas trigeminais, simpáticas e parassimpáticas (Figura 5), os quais originam-se no gânglio trigeminal, gânglio cervical superior, gânglio esfenopalatino e ótico, respectivamente (LV et al, 2014; ANDRES & VON DÜRING, 1974; ARNOLD, 1826). Foi demonstrado que a inervação dural craniana

é fornecida por pequenos fascículos de fibras nervosas mielinizadas (fibras A δ) e não mielinizadas (fibras C). Esses nervos percorrem a camada adventícia dos vasos meníngeos, incluindo a AMM, bem como o SSS e diferentes células meníngeas residentes, e formam uma rede no tecido conjuntivo dural (KEMP et al, 2012; STOEHR, 1928). Os neurônios sensoriais, em geral, seguem ao lado das artérias até seu território de inervação, contudo as fibras nervosas individuais normalmente saem do feixe principal e viajam a alguma distância da artéria antes de atingir seu território de arborização, e a maioria das terminações nervosas não estão próximas às artérias (STRASSMAN et al, 2004; MESSLINGER et al, 2006).

Os estudos com técnicas de imuno-histoquímica, de denervação e rastreamento, identificaram nervos autonômicos que expressam NPY, VIP, enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), ACh e triptofano-5-hidroxilase, assim como nervos trigeminais expressam SP e CGRP (LEVY et al, 2019; COHEN et al, 1992; O'CONNOR & VAN DER KOOY, 1988; EDVINSSON, 1987). A noradrenalina (NA) e o NPY (sistema simpático) podem causar a vasoconstrição dos vasos durais, e por outro lado a vasodilatação, pode ser induzida por estimulação elétrica e neuropeptídeos como VIP e ACh (sistema parassimpático), bem como CGRP e substância P (sistema trigeminal) (Figura 5) (WANG et al 2014).

Figura 5 – Inervação dural.



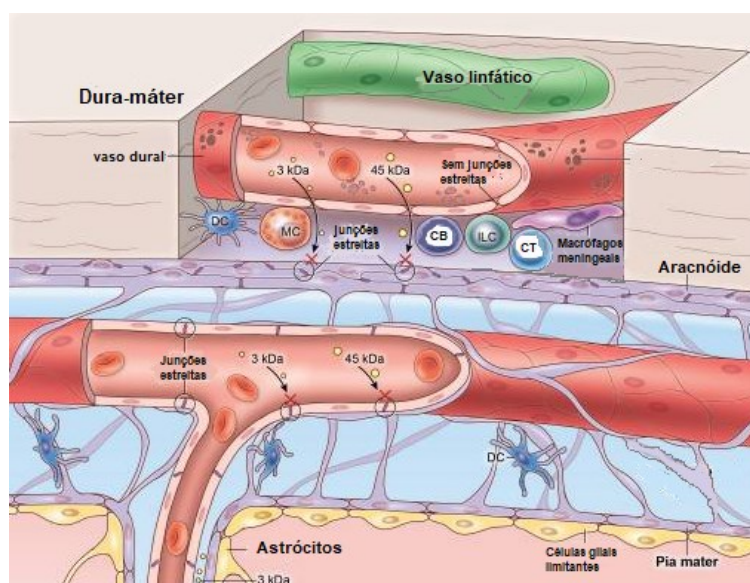
NA: noradrenalina; ACh: Acetilcolina; CGRP: Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina; SP: substância P; PACAP: Polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária.

Fonte: Adaptado de RUA & MCGAVERN, 2018.

A dura-máter possui uma variedade de células imunes, tais como macrófagos meningeais, célula dendrítica, mastócito (MC), linfócito inato, célula T e célula B (Figura 6)

(RUA & MCGAVERN, 2018). Os macrófagos podem ser encontrados ao longo de pequenos vasos durais, e de forma remota em grandes vasos. As células dendríticas, que são células apresentadoras de antígeno, estão localizadas na camada meníngea e no tecido conjuntivo da dura-máter (MCMENAMIN, 1999). Além disso, essa meninge também possui uma abundante população de mastócitos, que podem ser encontrados na camada periosteal e geralmente estão associados a vasos sanguíneos e as fibras sensoriais durais que expressam CGRP ou substância P, bem como as fibras simpáticas (ROZNIECKI et al, 1999; KELLER & MARFURT, 1991; KELLER et al 1985).

Figura 6 – Células imunes da dura-máter.



DC: Célula dendrítica; MC: Mastócito; CB: Célula B; CT: Célula T.
 Fonte: Adaptado de RUA & MCGAVERN, 2018.

2.1.2 Migrânea

A Classificação Internacional de Distúrbios de Dor de Cabeça (ICHD) tem sido um dos recursos mais utilizados para critérios de diagnóstico de migrânea. De acordo com os critérios diagnósticos que foram estabelecidos pela ICHD (3ª edição – versão beta) as cefaleias estão separadas em três grupos: primárias, secundárias e um grupo pelas dores craniais neuropáticas, outras dores faciais e outras cefaleias (ICHD, 2013).

A migrânea, popularmente, conhecida como enxaqueca, é considerada como um dos tipos de cefaleia primária, e tem sido associada a um grande ônus social e financeiro. Tem afetado principalmente pessoas com menos de 50 anos e em especial mulheres, devido ao ciclo hormonal, em uma proporção de 3:1 (mulheres: homens). Além disso, este distúrbio

neurovascular encontra-se em uma posição central das dez principais causas de incapacidade no mundo (STEINER et al, 2016; GBD, 2016; GBD, 2015; GBD,2013; LIPTON & BIGAL 2005).

Esta doença neurovascular é classificada em dois tipos: migrânea sem aura (MSA) e migrânea com aura (MCA). A MSA tem características específicas e sintomas associados tais como: dor de cabeça unilateral, pulsante, de intensidade moderada, náusea, fotofobia, fonofobia e duração de 4 a 72 horas. A MCA apresenta além das características da migrânea sem aura, uma fase premonitória que ocorre horas ou dias antes da dor de cabeça e/ou uma fase pós-drômica após a dor de cabeça. Os sintomas premonitórios e pós-drômicos consistem em: hiperatividade, hipoatividade, depressão, desejos por determinados alimentos, bocejo repetitivo, fadiga, rigidez do pescoço e/ou dor (ICHD-3, 2018).

A migrânea pode se apresentar de forma episódica, onde a frequência dos ataques é crucial para determinar a carga da doença e a abordagem terapêutica: as baixas frequências (1 a 3/mês), que podem ser tratadas apenas com medicamentos abortivos (triptanos, analgésicos, não esteroides, anti-inflamatórios) e altas frequências (4-14/mês) precisam de medicamentos profiláticos, além de sintomáticos, para evitar a cronificação (≥ 15 dias de dor de cabeça/ mês). A forma crônica é de maior complexidade, por conta de poucos medicamentos preventivos funcionarem nessa fase e por ocorrer abuso de sintomas, que conduzem à complicação da dor de cabeça por uso excessivo de medicamentos e a um aumento exponencial dos riscos relacionados a medicamentos (eventos cardiocerebrovasculares renais e gastrointestinais) (GIAMBERARDINO et al, 2017)

Por muitos anos a migrânea foi considerada como um distúrbio vascular resultante da vasodilatação meníngea. Contudo, os avanços recentes vêm aceitando uma teoria neurovascular, os quais demonstram que uma inflamação local estéril nas meninges intracranianas seja um evento-chave que medeia a ativação e sensibilização prolongadas dos aferentes meníngeos e a origem da dor de cabeça da migrânea. (LEVY, 2010; WAEBER & MOSKOWITZ, 2005; STRASSMAN et al, 1996)

Apesar de não haver evidências diretas da ocorrência da inflamação meníngea durante o ataque de enxaqueca, alguns achados clínicos vêm mostrando um aumento nos níveis de mediadores inflamatórios na circulação intracraniana durante o ataque de migrânea (LEVY, 2009; SARCHIELLI et al, 2006; GOADSBY & EDVINSSON, 1993), assim como a eficácia terapêutica de medicamentos anti-inflamatórios não esteroides no término deste ataque (WENZEL et al, 2003).

2.1.3 Relação da dura-máter e a inflamação estéril na fisiopatologia da migrânea

Nas últimas décadas diversos estudos experimentais em humanos e animais vêm evidenciando que a ativação dos neurônios aferentes, a liberação de neuropeptídeos e a inflamação estéril dural exercem papéis relevantes na dor de cabeça da migrânea. Tais estudos foram realizados pela ativação de neurônios aferentes, seja em doença ou em condições que mimetizem experimentalmente a doença com estímulo elétrico, ou pela ativação de receptores nociceptivos expressos em terminais nervosos periféricos que causam a liberação de neuropeptídeos pró-inflamatórios. Desta forma, esses neuropeptídeos interagem com uma variedade de células tais como mastócitos, músculo liso dos vasos sanguíneos, células endoteliais e outras células do sistema imunológico, iniciando uma cascata de eventos inflamatórios (BURGOS-VEGA et al., 2015; GEPPETTI et al., 2012; BUZZI & MOSKOWITZ, 2005; PEROUTKA, 2005).

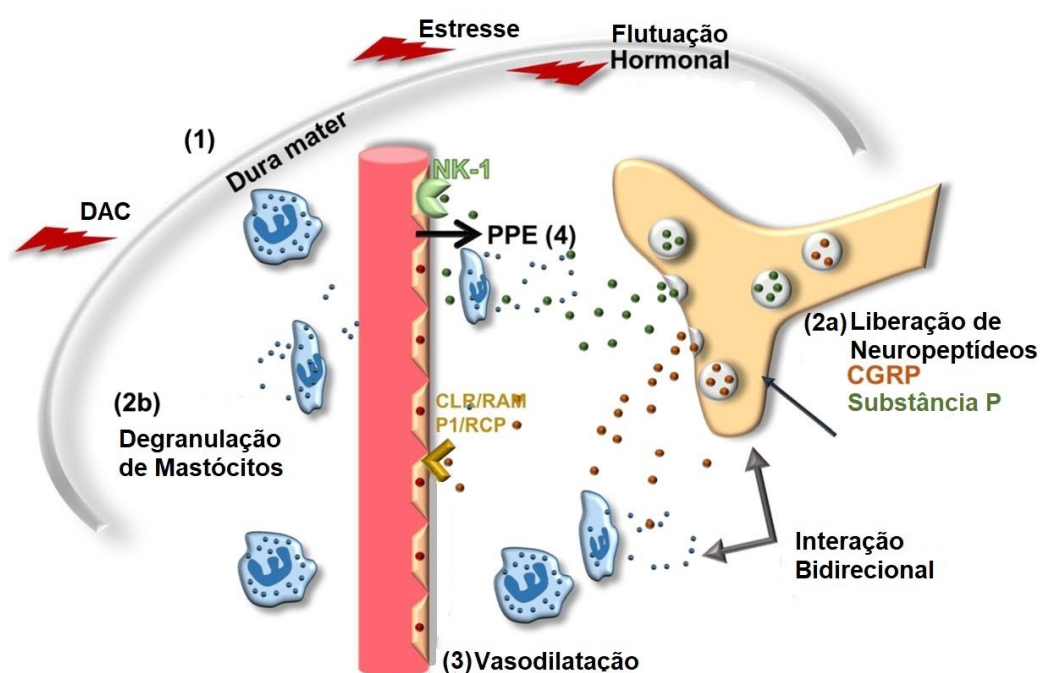
Embora não exista um consenso quanto a fisiopatologia da migrânea, tem sido bem aceito que esse distúrbio neurovascular pode resultar da ativação e sensibilização do sistema trigeminovascular (GOADSBY et al., 2017a, b). As fibras aferentes trigeminais são ativadas e liberam CGRP e SP, que por sua vez causam inflamação neurogênica estéril. Essa inflamação tem como principais características: a vasodilatação dos vasos meníngeos, o aumento da permeabilidade vascular, o extravasamento de proteínas plasmáticas e a degranulação de mastócitos (BORAN & BOLAY, 2013; ERDENER & DALKARA, 2014).

A inflamação estéril dural pode ser induzida experimentalmente por aplicação tópica de agentes inflamatórios. Estudos com coquetel inflamatório (histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandina E2) foi usado para elucidar a fisiopatologia da enxaqueca e verificar a eficácia de tratamentos desenvolvidos para a migrânea (ZHANG & LEVY, 2008; YAN et al, 2018). Foi demonstrado em um estudo de ressonância magnética funcional que a aplicação de coquetel inflamatório em dura-máter de ratos obteve respostas idênticas a pacientes com migrânea (BECERRA et al., 2017). A inflamação estéril meníngea pode surgir como resultado de uma depressão alastrante cortical (DAC). A ativação de nociceptores de fibras sensoriais meníngeas e de mastócitos podem ser causados pela liberação de mediadores (potássio e glutamato) durante uma DAC (WAEBER & MOSKOWITZ, 2005; BOGDANOV et al., 2011; KARATAS et al., 2013; PIETROBON & MOSKOWITZ, 2013).

Em um estudo recente foi apresentada hipóteses de mecanismos de inflamação neurogênica na dura-máter (RAMACHANDRAN, 2018). Ele sugeriu que a DAC, flutuações hormonais ou fatores de estresses (Figura 7, [1]) conduzem os eventos inflamatórios por duas

vias: o sistema trigeminal é ativado e os neuropeptídeos são liberados (Figura 7, [2a]), e os mastócitos são ativados e degranulados sensibilizando os nociceptores (Figura 7, [2b]). Essas duas vias seja por neuropeptídeos (CGRP e SP) ou por mediadores dos mastócitos, induzem a vasodilatação meníngea e consequentemente causam o extravasamento de proteínas plasmáticas (Figura 7, [3 e 4]). Essa liberação de neuropeptídeos inflamatórios e vasoativos pelas fibras nervosas e a ativação dos mastócitos, resultam em um ciclo vicioso que conduz à inflamação neurogênica e à dor.

Figura 7 – Hipóteses de mecanismos de inflamação neurogênica na dura-máter.



DAC: depressão alastrante cortical, CGRP: peptídeo relacionado com o gene da calcitonina, NK-1: neuroquinina 1, CLR: receptor semelhante à calcitonina, RAMP1: proteína moduladora da atividade do receptor 1, RCP: proteína componente do receptor, PPE: extravasamento de proteína plasmática.

Fonte: Adaptado de RAMACHANDRAN, 2018.

2.2 O CGRP E SEU PAPEL NA DURA-MÁTER INTRACRANIANA

O peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) é um neuropeptídeo que em sua forma madura tem 37- aminoácidos, e está localizado principalmente em fibras sensoriais C e Aδ, conhecido como o mais potente dilatador de vasos (MAGGI, 1995; HARGREAVES, 2007). Pode também estar localizado nos vasos periféricos e cerebrais do sistema trigeminovascular, e nos corpos celulares nos gânglios trigeminais. Além disso, o CGRP pode

estar armazenado em vesículas localizadas nas terminações nervosas centrais e periféricas, e seu conteúdo pode ser secretado na medula espinhal dorsal ou em vários tecidos periféricos, principalmente em vasos sanguíneos adjacentes, modulando o tônus vascular (ROSENFELD et al, 1983).

Em seres humanos, o CGRP se apresenta de duas isoformas: α -CGRP e β -CGRP. Possuem estruturas e atividades biológicas semelhantes, mas são sintetizados a partir de dois genes distintos, em diferentes locais no cromossomo 11 (VAN ROSSUM et al, 1997; JUANEDA et al, 2000). O α -CGRP é considerado a principal forma encontrada no sistema nervoso central e periférico, ao passo que β -CGRP é encontrado em geral no sistema nervoso entérico (BRAIN & GRANT, 2004).

O receptor do CGRP possui uma complexa estrutura proteica composto por: um receptor acoplado à proteína G denominado receptor tipo receptor de calcitonina (CLR); uma única proteína acessória transmembrânica denominada proteína 1 modificadora da atividade do receptor (RAMP1), e a proteína do componente receptor (RCP) (AIYAR et al, 1996; MCLATCHIE et al, 1998). O acoplamento do CGRP com seu receptor desencadeia a estimulação da adenil ciclase e o aumento da adenosina monofosfato cíclico (cAMP), causando uma vasodilatação por meio do relaxamento direto do músculo liso vascular (MIYOSHI & NAKAYA, 1995)

Tem sido estabelecido que a síntese de CGRP é modulada pelo fator de crescimento nervoso (NGF) e pelo óxido nítrico (NO), e o controle serotoninérgico é responsável por regular a liberação do CGRP. Além disso, foi mostrado que há uma colocalização entre o CGRP e a SP em neurônios sensoriais periféricos (BELLAMY et al 2006; GIBBINS et al, 1985).

Esse neuropeptídeo apresenta uma ampla gama de funções biológicas tais como a contratilidade cardíaca, o crescimento ósseo e desenvolvimento de mamíferos, a captação de glicose e a estimulação da glicólise nos músculos esqueléticos (VAN ROSSUM et al, 1997). Tem sido visto em estudo com homens e animais, que a estimulação elétrica do nervo trigeminal faz com que o CGRP seja liberado das terminações do nervo perivascular na veia jugular externa. Em um outro estudo, foi demonstrado que a estimulação do seio sagital superior (SSS) leva ao aumento do fluxo sanguíneo cerebral, juntamente com níveis elevados de CGRP na veia jugular externa de gatos (ZAGAMI et al 1990).

O CGRP está envolvido em muitos dos processos patofisiológicos, incluindo a dilatação de vasos sanguíneos cerebrais e da dura-máter, a liberação de mediadores inflamatórios a partir de mastócitos, e a transmissão de informação nociceptiva a partir de vasos sanguíneos intracranianos para o sistema nervoso (DURHAM, 2004). Além disso, áreas cerebrais como

hipotálamo, tálamo, substância cinzenta periaquedutal, colículos superior e inferior, amígdala, complexo trigeminocervical (TCC) e cerebelo, podem estar associadas à fisiopatologia da enxaqueca, considerando a capacidade do CGRP de alterar a atividade sináptica e neuronal no TCC e a transmissão de sinais nociceptivos para as áreas do tálamo e córtex (STORER et al 2004; GOADSBY, 2007).

Estudos têm relatado que na fase de dor de cabeça da enxaqueca os níveis de CGRP são elevados, reforçando assim, o conceito de enxaqueca como um fenômeno neurovascular. Deste modo, este neuropeptídeo é reconhecido como um dos principais mediadores responsável pela vasodilatação neurogênica e desempenha um papel significativo na fisiopatologia da enxaqueca (DURHAM, 2004; GOADSBY et al 2004). Comumente, o CGRP é considerado um alvo farmacológico de grande relevância para o tratamento da enxaqueca (PETERS, 2019). Antagonistas de CGRP atuam através da inibição da liberação de CGRP, bloqueando a vasodilatação e a inflamação neurogênica (TEPPER, 2018).

2.3 O ÓXIDO NÍTRICO E SEU PAPEL NA DURA-MÁTER INTRACRANIANA

O óxido nítrico (NO) é gás altamente lábil que pode ser gerado a partir do aminoácido L-Arginina e por três enzimas óxido nítrico sintase (NOS) dependentes de calmodulina (NOS): NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS indutível (iNOS). A produção dessa molécula ocorre principalmente em células tais como macrófagos, mastócitos, células endoteliais e neuronais. Esse gás participa de uma variedade de processos biológicos dentre eles a inflamação, imunorregulação, vasodilatação dependente do endotélio, inibição plaquetária e transmissão neuronal no SNC e no sistema nervoso periférico (BREDT, 1999).

Acredita-se que o NO exerça um papel na regulação do fluxo sanguíneo cerebral, na neurotransmissão e no acoplamento do metabolismo do fluxo sanguíneo do sistema nervoso central (SNC). Esta molécula pode ter participação em mecanismos da memória, do aprendizado, da nocicepção, da modulação de funções neuroendócrinas e da atividade comportamental. Além disso, diversos estudos experimentais clínicos e em animais, vêm apoiando que o NO seja usado como um dos mecanismos de gatilho molecular subjacente às dores de cabeça primárias, como enxaqueca e cefaleia em salvas (SZABÓ, 1996; OLESEN, 2008).

Por uma ação direta da via do monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) o NO pode levar a fase inicial da dor de cabeça da enxaqueca, induzindo vasodilatação cerebral (cGMP), bem como pode desencadear a fase tardia da dor de cabeça, provocando a liberação de CGRP

e a sensibilização dos nociceptores perivasculars e dos neurônios nociceptivos centrais no sistema trigeminovascular. O NO pode facilitar a síntese e liberação de CGRP e SP de fibras aferentes nociceptivas durais, e desta forma provocar a inflamação neurogênica perivascular (JOHNSON et al, 2003).

Tem sido sugerido que o NO tem um papel modulador na inflamação neurogênica devido este gás estimular a atividade promotora do gene CGRP nos neurônios trigeminais por meio da via de sinalização da proteína quinase ativada por mitogênio (MAP) e canais de cálcio tipo T (RAMACHANDRAN et al, 2014). Os efeitos estimuladores do NO na atividade e liberação do gene promotor de CGRP têm sido suprimidos pelo tratamento com sumatriptano. Da mesma forma tem sido observado que a aplicação de inibidores não seletivos neuronais da nNOS diminui parcialmente a vasodilatação neurogênica (KLEDE et al, 2003).

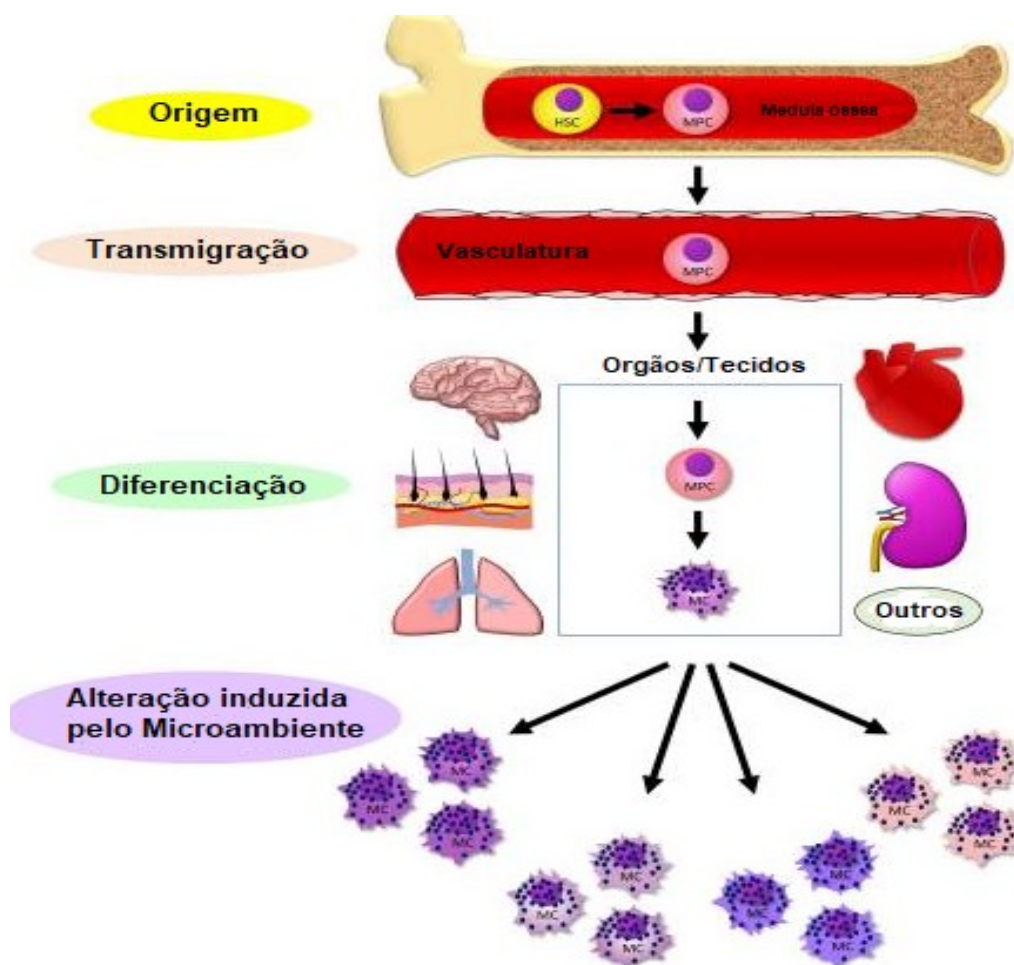
Estudos mostram que pacientes com enxaqueca e cefaleia em cluster tem tido um aumento significativo nos níveis de nitrato no plasma. Portanto, esses achados têm indicado que há uma ligação funcional entre cefaleias vasculares graves, a produção de NO e a liberação de neuropeptídeos (GULDIKEN, 2009).

2.4 MASTÓCITOS

2.4.1 Origem, desenvolvimento, localização dos mastócitos

Os mastócitos são células que derivam da medula óssea da linhagem mielóide de células-tronco hematopoéticas (HSC) (Figura 8) (GALLI et al, 2005). Essas células não estão presentes no sangue como a maioria das células dessa linhagem, mas em geral residem em tecidos. As HSCs vão se diferenciar em precursores de mastócitos (MCP) na medula óssea, e posteriormente transmigram para os tecidos através dos vasos sanguíneos. Nos tecidos, os MCPs se diferenciam em mastócitos e se proliferam. Os mastócitos têm uma alta capacidade de propagação em microambientes o que confere a eles um efeito duradouro e sustentado. Os mastócitos possuem uma grande heterogeneidade, dependendo da espécie, do microambiente e da localização anatômica (MOON et al, 2010; METCALFE et al 1997).

Figura 8 – Origem e diferenciação dos mastócitos.



HSC: Célula tronco hematopoietica; MPC: Célula progenitora mielóide; MC: Mastócitos.

Fonte: Adaptado de GUPTA & HARVIMA, 2018.

Os mastócitos maduros são encontrados em quase todos os tecidos. Em geral, eles são observados próximos de ambientes em contato com o meio externo tais como: bordas epiteliais, paredes vasculares e mucosas. Esses granulócitos e as células dendríticas fazem parte da primeira linha de defesa contra patógenos, antígenos e alérgenos, ou toxinas ambientais. Essas células podem se deslocar de locais periféricos para o sistema nervoso central (SNC) (SILVERMAN et al, 2000). No SNC, os mastócitos podem ser encontrados ao redor de vasos sanguíneos nas meninges, no plexo coróide, no bulbo olfatório, no mesencéfalo e no parênquima da região talâmica-hipotalâmica (NELISSEN et al, 2013).

Essas células estão presentes nas mais diversas patologias inflamatórias tais como asma, alergia, doença inflamatória intestinal, mastocitose sistêmica, artrite, endometriose, entre outras (SANT et al, 2007; THEOHARIDES et al, 2008 , 2010 , 2012a ; GALLI & TSAI, 2012 ; KRITIKOU et al., 2016 ; SUURMOND et al., 2016). E está envolvido também em condições neuropatológicas, os quais incluem a migrânea, lesão cerebral, doença de

Parkinson, doença de Alzheimer, traumatismo crânio-encefálico, cefaleia, condições de estresse, distúrbios do sono, hemorragia intracerebral (HIC), distúrbios neuropsíquicos (THEOHARIDES et al., 1995, 2005, 2016; SAYED et al., 2011; KARAGKOUNI et al., 2013; GRAZIOTTIN et al, 2014; KEMPURAJ et al, 2016 a, b; MORETTI et al, 2016).

2.4.2 Características histomorfológicas, ativação dos mastócitos

Os mastócitos são células de formato ovóide ou alongado, que medem até 20 µm de diâmetro. Eles possuem grânulos citoplasmáticos abundantes contendo sulfato de heparina que podem ser mostrados usando corantes metacromáticos, tais como azul de toluidina, azul Alcian, azul de metileno e Giemsa, que resultam em coloração púrpura ou roxa dos grânulos vistas ao microscópio de luz. Além disso, os mastócitos também podem ser detectados por imuno-histoquímica usando anticorpos direcionados a mediadores associados a grânulos pré-formados, como histamina, heparina, quimase e triptase (NELISSEN et al 2013).

Esses granulócitos expressam diversos receptores de superfície celular tais como: receptor c-kit (receptor para fator de célula tronco), receptor de imunoglobulina (Ig) E de alta afinidade (FcεRI), receptores ativadores como o de imunoglobulina G (IgG) FcγRIIIa no estado de repouso, e o de alta afinidade FcγRI na presença de interferon-γ, receptores de complemento, receptores quimiossensoriais, receptores Toll-like e o receptor padrão molecular associado a micróbios. Além disso, os mastócitos são sensíveis à temperatura e à pressão, degranulando em resposta a estímulos físicos nocivos pelo mecanismo dependente de canal potencial do receptor transiente-2 (TRPV2) (STONE et al, 2010; FORSYTHE, 2019).

Existe dois tipos de mastócitos maduros em roedores baseado na sua localização, no conteúdo do mediador pré-formado e na dependência da ativação das células T: mastócitos de tecido conjuntivo (CTMCs) e mastócitos de mucosa (MMCs). Os CTMCs estão localizados principalmente na pleura, no peritônio e na pele, possuem uma maior quantidade de heparina em seus grânulos, e são independentes de células T. Os MMCs são encontrados na mucosa nasal e gastrointestinal, têm pouca ou nenhuma heparina, e são muito sensíveis à estimulação de células T (NELISSEN et al, 2013). Em humanos, os mastócitos podem ser divididos em pelo menos três subtipos baseados em seu conteúdo de proteases específicas: mastócitos que contêm apenas triptase, mastócitos que contêm apenas quimase e aqueles que contêm triptase, quimase, carboxipeptidase e catepsina G (KRISHNASWAMY et al 2006).

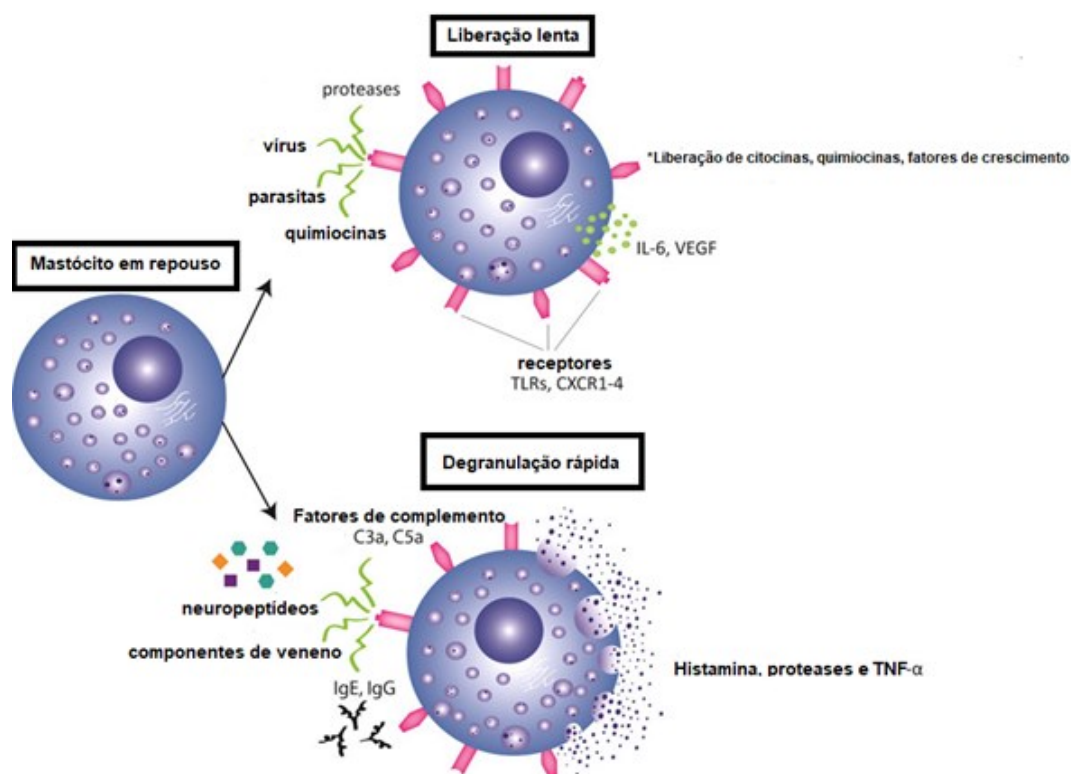
Esses mastócitos possuem uma vida longa (semanas a meses) e as composições de diferentes fatores que atuam no desenvolvimento deles dentro do microambiente de diferentes

locais corporais leva à heterogeneidade fenotípica que se estende para além dos subtipos descritos, com características morfológicas e histoquímicas específicas do tecido; conteúdo de mediadores e responsividade da célula a estímulos ou drogas (METCALFE et al 1997, FORSYTHE & ENNIS, 2000). Além disso, eles têm a capacidade de sofrer inúmeros ciclos de liberação de mediadores, podendo permanecer no tecido por alguns meses. (TAYLOR & METCALFE, 2001).

Os mastócitos respondem a diversos estímulos físicos, químicos e biológicos tais como trauma, fatores de complemento (C3a e C5a), peptídeos endógenos e exógenos, citocinas, outros mediadores inflamatórios, substâncias tóxicas, alérgenos, lipopolissacarídeo e componentes de parasitas (GILFILLAN & BEAVEN, 2011). A ativação do mastócito mais conhecida é pelo receptor de alta afinidade FcεRI, que exerce um papel relevante na anafilaxia e em outras doenças alérgicas (RIVERA et al, 2008).

Os mastócitos podem ser ativados e liberar seus mediadores através de três tipos de respostas. A primeira é uma resposta imediata que acontece segundos após ativação, onde há liberação de mediadores pré-formados armazenados nos grânulos citoplasmáticos. Entre os mediadores pré-formados incluem a histamina, a serotonina, a heparina, as proteases, os proteoglicanos, a catepsina G e as citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α). A segunda resposta é uma nova síntese rápida de mediadores lipídicos. Por fim, a fase tardia é considerada a terceira resposta, que envolve a liberação de citocinas e quimiocinas recém-sintetizadas. Essas respostas podem ocorrer de forma explosiva com a liberação aguda de mediadores para o espaço extracelular (degranulação em larga escala), e de modo mais controlado com uma liberação bastante seletiva dos mediadores (degranulação fragmentada) (NELISSEN et al, 2013; FORSYTHE, 2019) (Figura 4).

Figura 9 – Representação esquemática de degranulação do mastócito de forma rápida ou controlada.



TLRs – Receptores toll-like; CXCR1–4 – Receptor de quimiocina CXC 1-4; VEGF – fator de crescimento endotelial vascular; IL-6 – interleucina-6; TNF - α – fator de necrose tumoral α .

Fonte: Adaptado de NELISSEN et al 2013.

Existe também outro processo conhecido como translocação de pseudópode ou transgranulação, os quais se referem ao contato dos mastócitos com células adjacentes e transferência de grânulos para a outra célula (VUKMAN et al 2017 , GREENBERG & BURNSTOCK, 1983). Esse processo pode envolver a transferência de grânulos dos mastócitos para as células nas proximidades por exocitose, acompanhada de ingestão pela célula receptora ou de liberação de mediadores para o microambiente. Esse tipo de comunicação dos mastócitos foi visto em sistema vascular e neural (WILHELM et al, 2005; DINES & POWELL, 1997; GREENBERG & BURNSTOCK, 1983).

As principais funções que os mediadores exercem são de propriedades inflamatórias, os quais incluem: recrutamento e ativação de células inflamatórias, vasodilatação e extravasamento de plasma. Esses mediadores também podem atuar na degradação ou remodelação local dos elementos estruturais dos tecidos. Além disso, mediadores como IL-10 e TGF- β , têm propriedades anti-inflamatórias ou imunossupressoras (NELISSEN et al 2013).

2.4.3 Papel dos mastócitos na dura-máter intracraniana

Os mastócitos localizam-se adjacentes ao sistema nervoso periférico e o cérebro, onde se encontram alinhados funcional e anatomicamente, com neurônios e processos neuronais em todo o corpo. A densidade desses granulócitos são especialmente altos em tecidos inervados por fibras sensoriais A δ e C de pequeno calibre, que são responsáveis pela transmissão da dor. Além disso, as associações anatômicas entre mastócitos e nervos são principalmente mais evidentes em locais de inflamação (XU et al, 2020; SPANOS et al, 1997; UNDEM et al 1995).

A ativação neuroimune e a interação parácrina entre mastócitos, macrófagos e terminais nervosos tem sido um papel chave na indução de inflamação neurogênica meníngea (DIMLICH et al, 1991). A dor de cabeça é um dos principais sintomas associados a condições como rinite, mastocitose e asma, destacando assim, que os mastócitos estão envolvidos na indução de dores de cabeça (BIGAL et al, 2002; SMITH et al, 2011).

O CGRP quando liberado de aferentes nociceptores meníngeos pode contribuir para degranulação de mastócitos e assim liberar histamina (ROZNIECKI et al 1999; OTTOSSON; EDVINSSON, 1997). A histamina, por sua vez, é conhecida por ativar as fibras C, e estimular a liberação de CGRP e de substância P por reflexo axônico (GROETZNER & WEIDNER, 2010). Além disso, em porquinhos-da-índia, é visto que a histamina injetada na mucosa nasal causa liberação de CGRP em nervos aferentes periféricos do trigêmeo, sugerindo assim uma interação bidirecional entre o CGRP e a histamina (TANI et al, 1990).

Nas últimas décadas tem sido suposto que os mastócitos podem favorecer o estado inflamatório estéril nas meninges, estimulando a sensibilização dos aferentes meníngeos e à liberação meníngea de peptídeos como SP e CGRP. Além disso, tem sido mostrado em estudo eletrofisiológicos que a administração sistêmica do composto 48/80 promove a degranulação dos mastócitos na dura-máter e ativa as fibras C e as fibras A-delta de nociceptores meníngeos. Com isso, foi proposto que os mastócitos não só iniciaram, mas foram capazes de manter a ativação desses nociceptores por um longo tempo, possivelmente por sua comunicação bidirecional neuroimune (ZHANG et al, 2007; LEVY et al, 2007).

Em estudos imuno-histoquímicos, é visto que a degranulação de mastócitos ativa fibra nervosas contendo CGRP. Após essa ativação de nociceptores meníngeos é observada a ativação central dos neurônios nociceptivos no núcleo caudal do trigêmeo (LEVY et al, 2007).

A determinação do papel de cada mediador de mastócito na evocação de um impulso pro-nociceptivo, tem sido registrada de uma única unidade de nociceptores meníngeos. Dentre

os mediadores, a serotonina, a prostaglandina I₂ e a histamina foram propostas como atuantes na promoção da dor da enxaqueca. Desse modo, os mastócitos por si mesmo, podem estimular uma cascata de eventos inflamatórios associados, culminando na ativação trigeminovascular (ZHANG et al, 2011a, 2007; ZHANG & LEVY, 2008).

Em mastócitos de ratos, mas não em humanos, é notada a presença de receptores CGRP. Em estudos *in vitro*, o peptídeo ativador da adenilato ciclase hipofisária (PACAP), estimulou a degranulação de mastócitos em dura-máter de ratos. Além disso, foi também observado em dura-máter de ratos que a infusão intravenosa de nitroglicerina, um doador de óxido nítrico, causou a degranulação de mastócitos. Todos esses fatores indicam que eventos neuroinflamatórios nas meninges podem ser resultantes de uma comunicação neuroimune complexa e que podem caminhar juntos para manter o estado de hipersensibilidade, como na enxaqueca. (BAUN et al 2012; PEDERSEN et al, 2015)

O estresse, a depressão alastrante cortical (DAC) e hormônios são os principais fatores desencadeantes de eventos que levam à inflamação neurogênica. O estresse por contenção é visto causar a degranulação dos mastócitos intracranianos em estudos pré-clínicos com roedores. A DAC foi proposta ser responsável em causar inflamação neurogênica meníngea em 15 a 20% dos pacientes que sofrem de enxaqueca com aura por induzir degranulação intracraniana de mastócitos e por promover a ativação de nociceptores meníngeos (KARATAS et al, 2013; ZHAO & LEVY, 2015; ZHANG et al, 2011b). Um dos recrutadores e mediadores da degranulação de mastócitos em dura-máter são os hormônios. Em estudos com ratas, o nível hormonal de estrogênio no ovário demonstrou flutuações na densidade dos mastócitos durais ao longo do ciclo estral, provocando um aumento na população de mastócitos. (BOES & LEVY, 2012)

2.5 TRATAMENTO PROFILÁTICO DA MIGRÂNEA

O tratamento profilático é geralmente recomendado quando as crises são mais frequentes, prolongadas, incapacitantes ou quando não respondem ao tratamento agudo. A medicação deve ser usada durante alguns meses e mantida de forma sucessiva. Muitos pacientes conservam o benefício mesmo depois de interromperem o tratamento. A escolha da medicação profilática depende do perfil do doente, se há patologia associada, que possa indicar ou contraindicar o seu uso, e dos efeitos adversos (MARTINS, 2009).

Utilizam-se várias classes de diferentes de substâncias, dentre esses são considerados os de primeira linha e de eficácia comprovada: os beta-bloqueadores, os antidepressivos tricíclicos e os antiepilépticos (PARSEKYAN, 2000).

2.5.1 Antiepilépticos

O uso de antiepilépticos para o tratamento preventivo da migrânea tem sido garantido por várias vias de ação que se conectam com a modulação de sistemas de dor geral, como também, a sistemas envolvidos na fisiopatologia da migrânea (SILBERSTEIN et al, 2008; WIFFEN et al, 2010). Entre os fármacos disponíveis com um papel profilático para migrânea incluem acetazolamida, carbamazepina, carisbamate, clonazepam, divalproato de sódio, gabapentina, oxcarbazepina, topiramato (TP), valproato, ácido valpróico, e zonisamida (BAGNATO & GOOD, 2016).

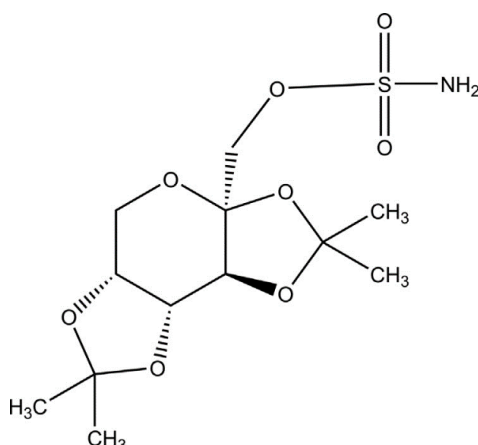
A eficácia profilática desta classe depende do efeito modulador sobre o ácido *gama*-aminobutírico (GABA) e glutamato, e do papel importante em receptores N-metil D-Aspartato (NMDA) corticais, responsáveis pelo desencadeamento e progressão da depressão alastrante cortical, bem como em receptores do núcleo trigeminal caudal (MACIEL-JR, 2006).

2.5.1.1 Topiramato

O topiramato (TP) é um monossacárido substituído por sulfamato (2,3: 4,5 – bis - O - (1-metiletilideno) – b – D – fruto – piranose sulfamato) derivado do açúcar de ocorrência natural D-frutose (Figura 10) (EDVINSSON & LINDE, 2010). Apresenta fórmula $C_{12}H_{21}NO_8S$, massa molecular 339,36 g.mol⁻¹, e é uma substância solúvel em acetona, clorofórmio, dimetilsulfóxido e etanol (KHALIL et al, 2019).

Esse fármaco foi sintetizado a partir de um projeto para descobrir análogos da frutose-1,6-difosfato capazes de inibir a enzima frutose 1,6-bisfosfatase e a gliconeogênese. O TP foi preparado como um intermediário sintético e não possuía atividade hipoglicêmica. No entanto, devido a semelhança estrutural da porção 0-sulfamato com a porção sulfonamida na acetazolamida foi feita uma avaliação dos possíveis efeitos anticonvulsivantes, e observou-se uma alta atividade no teste de crise de eletrochoque máximo em camundongos e ratos e sua ação teve uma longa duração (SHANK et al, 1994; MARYANOFF et al, 1987; GARDOCKI et al, 1986). Posteriormente, o desenvolvimento desse fármaco como uma droga antiepiléptica (AED) foi aprimorado com base em sua potência, duração de ação e elevado índice neuroprotetor (Figura 10) (SHANK et al, 2000).

Figura 10 – Estrutura molecular do topiramato.



Fonte: KHALIL et al, 2019.

O topiramato é conhecido como anticonvulsivante ou antiepilético, e tem sido usado individualmente ou acompanhado de outros medicamentos para prevenir e controlar convulsões. Ademais, ele é bastante utilizado na prevenção de migrânea em crianças, no tratamento da síndrome de Lennox-Gastaut, em combinação com a fentermina no tratamento e controle da obesidade e tratamento de transtornos relacionados ao uso de álcool. Esse fármaco é administrado pela via oral e a dosagem usada varia de 25 – 200 mg/dia (ARZIMANOGLU et al, 2016; KOLOTKIN et al, 2016; GUGLIELMO et al, 2015; MULLENERS et al, 2015; GUERRINI & PARMEGGIANI, 2006; SUPPES, 2002).

O uso do topiramato na prevenção da migrânea se baseia em diversos aspectos patogénéticos comuns entre a epilepsia e migrânea, os quais incluem: as anormalidades na função dos canais de sódio (Na⁺) e cálcio (Ca⁺⁺) dependentes de voltagem, a diminuição da inibição mediada por GABA em níveis pré e pós-sinápticos, o aumento da excitação mediada pelo glutamato em níveis pré e pós-sináptico, o baixo limiar para indução de depressão alastrante e de alterações a longo prazo na excitabilidade neuronal (CALABRESI et al, 2007; PAPPAGALLO, 2003).

O topiramato evidencia um amplo espectro de atividades moleculares em modelos experimentais e sua eficácia na migrânea pode ser mediada por inúmeros mecanismos de ação: (1) alteração na excitabilidade dos neurônios, comunicando-se com o canal de Na⁺ dependente de voltagem, inibindo o disparo repetitivo durante a despolarização (MCLEARN et al, 2000); (2) inibição dos canais de Ca⁺⁺ do tipo L ativados por alta voltagem, reduzindo a despolarização da membrana e a liberação de neurotransmissores (ZHANG et al, 2000); (3) modulação negativa nos receptores de glutamato subtipo AMPA/kainato, reduzindo a despolarização somática ou da membrana dendrítica (WHITE, 2005; KAMINSKI et al, 2004); (4) modulações positivas conectando-se a um sítio diferente no receptor GABA_A,

intensificando as correntes de cloreto mediadas por GABA (WHITE et al, 2000), que resulta em um elevado limiar convulsivo e um aumento na hiperpolarização da membrana e, conseqüentemente redução no disparo focal (HERRERO et al, 2002); (5) Inibição da anidrase carbônica (AC), tipo II e IV, que pode cooperar para sua ação anticonvulsivante por meio da modulação da voltagem dependente do pH e dos canais iônicos do receptor-porta (WHITE, 2005; PASTERNAK et al, 1993); (6) ativação da hiperpolarização de potássio (K^+) que está em parte relacionada à sua capacidade de inibir AC (HERRERO et al, 2002). Esses mecanismos podem proteger os neurônios vulneráveis em condições de uma elevada demanda energética, como a hiperatividade neuronal e o comprometimento metabólico, e assim atenuar a excitabilidade cerebral anormal relacionada à migrânea (FERRARI et al, 2011).

3 MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental.

3.2 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi conduzido no Serviço de Verificação de Óbito (SVO) do Centro de Ciências da Saúde (CCS), no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) e no Laboratório de Histotecnologia e de Análise de imagens e Morfometria da Pós-graduação em Saúde Translacional da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), localizado na Cidade Universitária, em Recife, Pernambuco.

3.3 PERÍODO DO ESTUDO

Os dados da pesquisa foram coletados no período de agosto de 2016 a agosto de 2021.

3.4 POPULAÇÃO DO ESTUDO

3.4.1 Obtenção e coleta da dura-máter intracraniana humana

Foram coletadas 12 amostras de dura-máter intracraniana frescas obtidas do Serviço de Verificação de Óbitos (SVO/UFPE) com a aprovação do comitê de ética em pesquisas envolvendo seres humanos (CAAE nº 57692216.5.0000.5208 – ANEXO I) entre 7 e 24 horas no pós-morte, com o intuito de se avaliar a condição secretora de CGRP e óxido nítrico após a morte, bem como se os mastócitos continuavam granulados ou degranulados.

3.4.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídas amostras durais frescas com idade variando de 18 a 90 anos de ambos os sexos. Foram excluídas amostras de dura-máter cuja causa morte apresentaram etiologia infectocontagiosa.

3.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS I

3.5.1 Dura-máter intracraniana humana

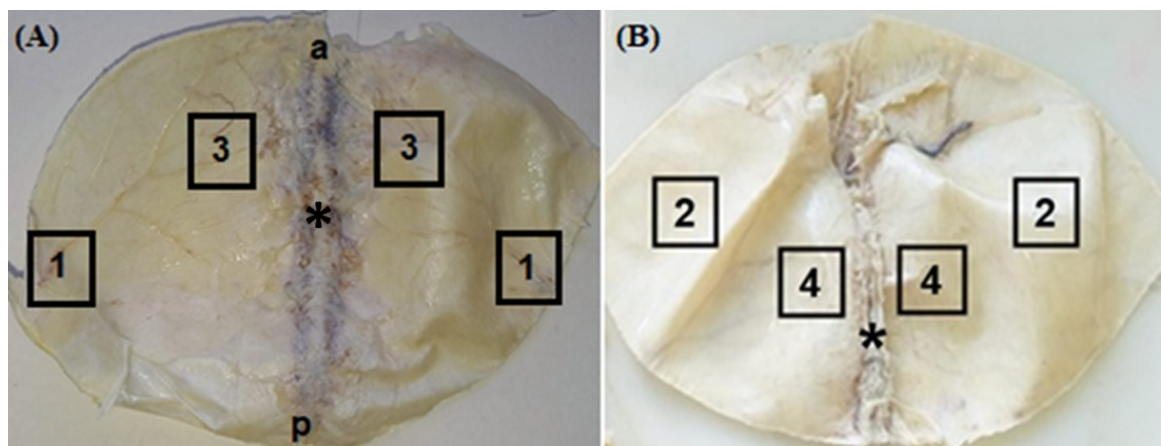
As amostras de dura-máter intracraniana humana foram obtidas de oito cadáveres (Faixa etária: 22 a 84 anos; sexo: 4 mulheres, 4 homens) do Serviço de Verificação de Óbitos (SVO) da UFPE. As causas de morte foram: acidente vascular cerebral hemorrágico (AVC) (2), problemas cardíacos (2), câncer (2) e problemas pulmonares (2) (Tabela 1). Após a coleta, as amostras ainda inteiras foram fixadas em formol tamponado a 10% por 48 horas, e posteriormente, dois fragmentos de 1,5 cm² cada, foram cortados de quatro distintas áreas da convexidade da dura-máter, contendo um segmento da artéria meníngea média (AMM), totalizando 64 fragmentos. As quatro áreas diferentes da convexidade da dura-máter foram: 1) Região distal ao seio sagital superior e da camada periosteal (Figura 11A, número 1); 2) Região distal ao seio sagital superior e da camada meníngea (Figura 11B número 2); 3) Região proximal ao seio sagital superior e da camada periosteal (Figura 11A, número 3); 4) Região proximal ao seio sagital superior e da camada meníngea (Figura 11B, número 4). Esses fragmentos passaram pelos processos de desidratação, diafanização (clarificação), parafinização. Posteriormente, o emblocamento foi realizado de modo que os fragmentos de dura-máter foram posicionados longitudinalmente de acordo com a camada desejada: virados para vista superior (camada periosteal) ou para vista inferior (camada meníngea).

Tabela 1 – Informações sobre as amostras de dura-máter intracraniana humana.

Dura-máter (n)	Sexo	Idade (anos)	Causa da morte	Tempo de pós morte (horas)
1	Feminino	22	Choque cardiogênico	9
2	Feminino	48	Morte súbita cardíaca	10
3	Feminino	67	Câncer	8
4	Feminino	80	Edema pulmonar	19
5	Masculino	59	AVC Hemorrágico	19
6	Masculino	64	Câncer	21
7	Masculino	81	AVC	24
8	Masculino	84	Embolia Pulmonar	13

Nota: AVC – Acidente vascular cerebral. Fonte: a autora, 2021.

Figura 11 – Localização das áreas analisadas para histomorfometria dos mastócitos em dura-máter intracraniana humana.



(A) Vista superior da dura-máter intracraniana humana com as artérias meníngeas médias direita e esquerda (setas pretas), seio sagital superior (*asterisco), parte anterior (a), parte posterior (p) após a fixação. (1) Região distal ao seio sagital superior e camada periosteal; (3) Região proximal ao seio sagital superior e camada periosteal; (B) Vista inferior da dura-máter intracraniana com o seio sagital superior (*asterisco) após fixação. (2) Região distal ao seio sagital superior e camada meníngea; (4) Região proximal ao seio sagital superior e camada meníngea. Fonte: a autora, 2021

3.5.2 Identificação de mastócitos pela coloração de azul toluidina (0,1%)

Para a coloração de azul de toluidina, as amostras em blocos de parafina foram cortadas em espessura de 10 µm, e foram conduzidas a estufa para adesão na lâmina de vidro. Em seguida, os cortes foram desparafinizados (xilol I, álcool-xilol, álcool 100%, 90%, 80% e 70%), hidratados e corados com azul de toluidina a 0,1%. Por fim, as preparações foram desidratadas, clareadas e montadas com lamínula e cola sintética.

3.5.3 Identificação de mastócitos pela expressão da Triptase por imuno-histoquímica

As amostras de dura-máter emblocadas foram submetidas a microtomia com cortes de 5 µm de espessura, montadas em lâminas de vidro. As lâminas foram desparafinizadas em xilol (I, II), banhadas em solução decrescente de álcool etílico (100%, 90%, 80% e 70%) e água corrente por 5 minutos cada etapa. Foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato (10 mM, pH 6,0) em banho maria a 60°C por 60 minutos. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens com tampão fosfato-salino (PBS) (100 mM, pH 7,2) por 5 minutos após cada etapa da imuno-histoquímica. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de metanol/peróxido 3% por 30 minutos. Aplicou-se a solução de bloqueio do kit (BosterBio SA 1021) por 20 minutos. Depois, incubou-se com o anticorpo primário anti-triptase mastócitos (AA1- abcam 2378; na diluição 1:100) em câmara úmida, overnight, a 4°C.

Posteriormente, aplicou-se o anticorpo secundário (IGG Biotinilado) e terciário (Complexo Avidina-biotina - SABC) a 25°C por 20 minutos em cada amostra. Os tecidos foram incubados com o revelador DAB e contracolorados com hematoxilina. Imediatamente, as amostras foram lavadas em água corrente, em solução alcoólicas gradativas (70%, 80%, 90% e 100%), xilol e montadas. No controle negativo utilizou-se o mesmo protocolo sem o anticorpo primário. Para controle positivo foram usadas amostras de intestino delgado humano.

3.5.4 Análise microscópica

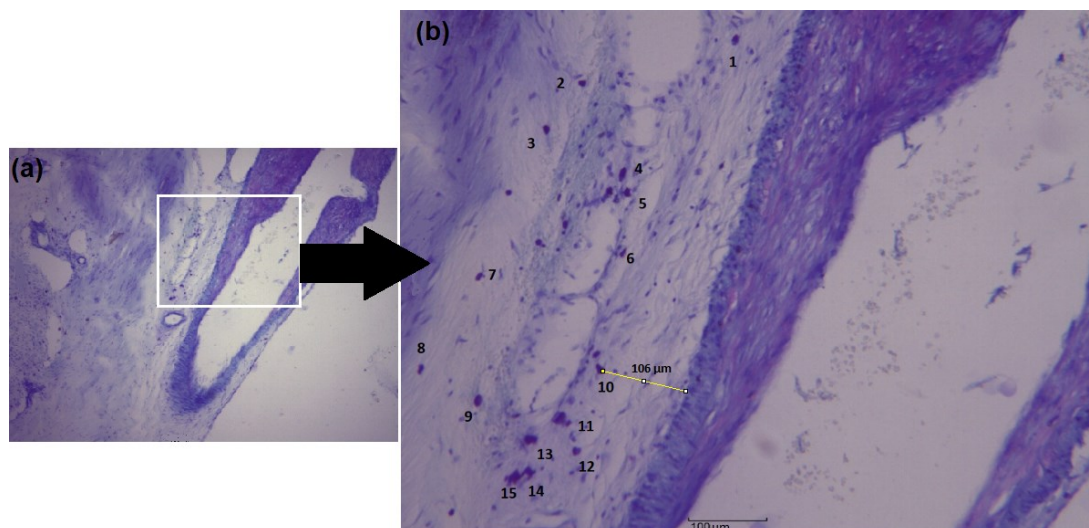
As análises em microscópio de luz foram realizadas por um observador de forma independente, sem o conhecimento das condições experimentais. As amostras de dura-máter foram analisadas por imagem digitalizadas (Motic Images Plus 2.0 software), obtidas com um aumento de 100× e 400× e auxílio de um microscópio Olympus BX-50, acoplado à câmera digital (moticom 1000, 1.3M Pixel USB 2.0). Os mastócitos foram considerados degranulados quando os grânulos estavam no exterior da célula (mais de 5 grânulos), ou perda de coloração da célula (mais de 50%), ou ainda apresentavam um aspecto fantasmagórico (ROZNIECKI et al. 1999). Foram analisados cinco campos de 0,59 mm² de cada amostra.

3.5.5 Análise morfofisiológica dos mastócitos

De cada preparação com o fragmento de dura-máter foram obtidas cinco fotomicrografias medindo 0,59 mm² de áreas aleatórias com mastócitos e vasos duros (arteriais e/ou venosos), que foram armazenadas por meio do programa Motic Images Plus (2.0) e do microscópio Olympus na magnitude de 100× (Fig. 12a). Os mastócitos foram identificados e enumerados na magnitude 400×. As medidas de distâncias dos mastócitos para os vasos venosos e/ou arterial foram realizadas com o Software ImageJ® 1.52a (2019). Cada imagem selecionada foi calibrada a partir da escala padrão (100µm) e posteriormente foram realizadas as medidas de distância da membrana do mastócito ao vaso arterial (túnica média da artéria meníngea média e/ou arteríola descendente) e/ou vaso venoso (túnica média das veias e/ou células endoteliais de vênulas) (Fig. 12b), e em seguida os dados foram transferidos para planilhas do Windows Excel (Fig. 12c). Para estabelecer a densidade quanto ao distanciamento do mastócito em relação ao vaso (próxima, média e distante) foi realizada uma análise da distância mínima e máxima obtida entre o mastócito e o vaso (mínimo = 0; máximo = 750 µm). Para quantificar a densidade de mastócitos por mm² foram determinados os seguintes intervalos: 0 - 150 µm, 151 - 300 µm, 301 - 750 µm. A partir disso, foram feitas as

análises estatísticas com as médias e desvio padrão de quatro diferentes áreas da convexidade da dura mater intracraniana humana.

Figura 12 – Resumo esquemático das análises morfofisiológicas.



(a) Fotomicrografias de áreas aleatórias com mastócitos e vasos derais (arteriais e/ou venosos) de aumento de 100x, coradas com azul de toluidina (0,1%), foram armazenadas no programa Motic Images Plus (2.0) Software. (b) Os mastócitos foram identificados e enumerados com aumento de 400x. As medições das distâncias dos mastócitos aos vasos venosos e/ou arteriais foram realizadas com o software ImageJ® 1.52a (2019). Cada imagem foi calibrada a partir da escala padrão (100 μm) e posteriormente foram feitas medições da distância (linha amarela) da membrana dos mastócitos ao vaso arterial (túnica média da artéria meníngea média e/ou arteríola descendente) e/ou vaso venoso (túnica média das veias e/ou células endoteliais das vênulas). Os dados das medidas de distância e quantificação dos mastócitos foram inseridos em planilhas do Windows Excel. Fonte: a autora, 2021.

3.5.6 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o software Graphpad prism versão 8.0.3. A distribuição das variáveis quantitativas foi analisada pela aplicação do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição normal e não normal foram avaliados respectivamente, por testes paramétricos (teste t Student pareado, teste t Student não pareado e teste ANOVA One Way com teste de múltiplas comparações de Dunnett's) e não paramétricos (teste Kruskal Wallis com teste de múltiplas comparações de Dunn's). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$ e o intervalo de confiança (IC) mostrado foi de 95%.

3.6 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS II

3.6.1 Amostras

Este experimento foi realizado com dura-máter ($n=4$) obtida de cadáveres do Serviço de verificação de óbitos da Universidade Federal de Pernambuco (SVO/UFPE). As amostras foram coletadas de dois homens e duas mulheres, com idades variando de 46 a 75 anos, tendo

como causas principais de morte: AVC, problemas cardíacos, câncer e embolia pulmonar e tempo de pós-morte entre 16 e 23hs.

3.6.2 Conservação da dura-máter

A dura-máter intracraniana intacta foi incubada à temperatura ambiente (25°C) durante trinta minutos com o fluido intersticial sintético (SIF) com a seguinte composição (em mM): 108 NaCl, 3,48 KCl, 3,5 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 11,7 NaH₂PO₄, 1,5 CaCl₂, 9,6 Na⁺gluconate, 5,5 Glucose, 7,6 Sucrose, diluído em água ultrapura. Este procedimento teve finalidade retirar o excesso de sangue e preservar o tecido até a realização do experimento *in vitro*. Após esse período, foram retirados quatorze fragmentos da convexidade da dura-máter (sete do lado direito; sete do lado esquerdo) contendo a artéria meníngea (Figura 13).

Figura 13 – Amostra de dura-máter humana intracraniana pós-morte.



Vista superior de dura-máter humana intracraniana pós-morte contendo artérias meníngeas.
Fonte: a autora, 2021.

3.6.3 Grupos experimentais

As amostras foram segregadas em oito grupos, sendo: controle negativo (recebeu SIF), controle positivo (KCl 60 mM), veículo (etanol a 0,1%, 0,001% e 0,00001%) e topiramato (10^{-6} M, 10^{-8} M, 10^{-10} M). Os fragmentos foram distribuídos uniformemente entre os grupos: Grupo controle negativo; Grupo controle positivo; Grupos veículos - aplicação de etanol nas seguintes concentrações: 0,1%, 0,001% e 0,00001%; Grupos experimentais topiramato – aplicação do fármaco nas concentrações: 10^{-6} M, 10^{-8} M e 10^{-10} M. Cada grupo recebeu sete fragmentos de dura-máter humana medindo cada um 1,5 cm², seguindo a distribuição da tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2 – Grupos experimentais e seus estímulos/tratamentos.

Grupos	Tipo de estímulo/ tratamento
Controle negativo (n=7)	Sem estímulo (Apenas SIF)
Controle positivo (n=7)	Estímulo com KCl 60mM
Veículo 1 (n=7)	Estímulo com KCl/ etanol (0,00001%)
Veículo 2 (n=7)	Estímulo com KCl/ etanol (0,001%)
Veículo 3 (n=7)	Estímulo com KCl/ etanol (0,1%)
Topiramato 1 (n=7)	Estímulo com KCl/ topiramato 10^{-10} M
Topiramato 2 (n=7)	Estímulo com KCl/ topiramato 10^{-8} M
Topiramato 3 (n=7)	Estímulo com KCl/ topiramato 10^{-6} M

SIF – fluido intersticial sintético; KCl – Cloreto de potássio. Fonte: a autora, 2021.

3.6.4 Tratamento da dura-máter *in vitro*

Cada fragmento foi colocado em microtúbulos (2 mL) mantido em banho-maria à $37.0 \pm 1^\circ\text{C}$. As etapas dos experimentos foram separadas da seguinte forma: pré-incubação, incubação e estimulação. Todas as amostras receberam 800 μL de cada meio de acordo com cada etapa (Tabela 3). Os fragmentos do grupo controle negativo contendo apenas fluido intersticial (SIF) proporcionaram a liberação de óxido nítrico e CGRP basal. Os fragmentos dos grupos veículos e topiramato permaneceram sob o tratamento com etanol ou topiramato (em diferentes concentrações) por 30 minutos. Após esse período, os grupos veículos, topiramato e controle positivo tiveram uma substituição de meio por uma concentração elevada de KCl (60 mM) com a seguinte composição (mM): 108 NaCl, 60 KCl, 3,5 MgSO_4 , 26 NaHCO_3 , 11,7 NaH_2PO_4 , 1,5 CaCl_2 , 9,6 Na^+ gluconate, 5,5 Glucose, 7,6 Sucrose, diluído em água ultrapura. Este meio tinha o intuito de despolarizar os terminais neuronais e provocar liberação de neuropeptídeos e óxido nítrico. Ao término de cada etapa, os sobrenadantes foram coletados com uma pipeta, transferidos para outros microtúbulos e armazenados a -80°C para posterior análise da concentração de óxido nítrico e CGRP, através do método colorimétrico da reação de Griess e o método de ELISA, respectivamente.

As amostras de dura-máter após experimento foram transferidas para o formol tamponado a 10%, e assim realizou-se o processamento histológico de rotina. Posteriormente, a análise histológica dos mastócitos foi observada em microscopia óptica.

Tabela 3 – Etapas de cada grupo experimental *in vitro*.

Grupos	Etapa/tempo Pré-incubação (1) (15 min)	Etapa/tempo Incubação (2) (30 min)	Etapa /tempo Estimulação (3) (30 min)
Controle negativo	SIF	SIF	SIF
Controle positivo	SIF	SIF	KCl 60mM
Veículo 1 (etanol a 0,00001%)	SIF	Etanol diluído a 0,00001% em SIF	Etanol diluído a 0,00001% em KCl 60mM
Veículo 2 (etanol a 0,001%)	SIF	Etanol diluído a 0,001% em SIF	Etanol diluído a 0,001% em KCl 60mM
Veículo 3 (etanol a 0,1%)	SIF	Etanol diluído a 0,1% em SIF	Etanol diluído a 0,1% em KCl 60mM
Topiramato 10^{-10} M	SIF	TPM diluído a 10^{-10} M em SIF	TPM diluído a 10^{-10} M em KCl 60mM
Topiramato 10^{-8} M	SIF	TPM diluído a 10^{-8} M em SIF	TPM diluído a 10^{-8} M em KCl 60mM
Topiramato 10^{-6} M	SIF	TPM diluído a 10^{-6} M em SIF	TPM diluído a 10^{-6} M em KCl 60mM

M- Molar; SIF – fluido intersticial sintético; KCl – Cloreto de potássio; min – minutos; mM – milimolar.
Fonte: a autora, 2021.

3.6.5 Liberação *in vitro* de Óxido Nítrico (NO)

A análise da liberação de NO foi feita pelo método colorimétrico quantitativo baseado na reação de Griess (DING, 1988), e os resultados foram expressos em μM . Este método se baseia na utilização de alíquotas de 100 μL dos sobrenadantes do estudo *in vitro* incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos com 100 μL de reagente de Griess preparados imediatamente (50 μL de sulfanilamida a 1% e 50 μL naftiletileno a 0,1% em ácido ortofosfórico a 5%). A absorbância foi mensurada a 540 nm por leitor microplaca. A concentração de nitrito foi verificada a partir de uma curva padrão construída com nitrito de sódio nas concentrações de 0-10 μM . Todas as amostras foram avaliadas em relação a um branco que corresponde ao SIF que foi incubado com a dura-máter.

3.6.6 Liberação *in vitro* do CGRP

O teor de CGRP liberado foi quantificado pelo protocolo do kit ELISA. Em resumo, a adição de 100 μL de amostra foi seguido pela adição de 100 μL do marcador (fornecido com

o kit). A reação foi incubada a 4°C durante 16-20 horas. Depois de lavar cuidadosamente o sobrenadante, os poços foram incubados com 200 µl de reagente de Ellman. Os poços foram cobertos com uma folha de alumínio e colocados num local escuro durante 30 min à temperatura ambiente antes da medição da densidade óptica, que é diretamente proporcional ao teor de CGRP da amostra. A densidade óptica foi medida a 414 nm usando um fotômetro de microplacas (GUPTA et al 2010).

3.6.7 Análise histológica dos mastócitos

Amostras de dura-máter foram processadas e coradas com Azul de toluidina a 2% (pH 2.5) durante 10 min. Em seguida, foram desidratadas, clareadas e montadas para serem examinadas em microscópio de luz (Olympus BX-50) por um observador, de forma independente, sem prévio conhecimento das condições experimentais. A degranulação de mastócitos foi definida como o conteúdo de grânulos visível no exterior da célula ou perda de mais de 50% de coloração celular ou ambas (ROZNIECKI et al, 1999). A contagem dos mastócitos degranulados foi realizada em 10 campos de modo randomizado e com uso de uma grade quadriculada, onde cada quadrado possuía 1 mm².

3.6.8 Análise Estatística

Para análise estatística foi utilizado o software *Graphpad prism* versão 8.0.3. Os dados foram representados em média± desvio padrão. As distribuições das variáveis quantitativas foram analisadas pela aplicação dos testes Qui-quadrado (χ^2) e de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição normal e não normal foram avaliados respectivamente, por testes paramétricos One Way ANOVA e não paramétricos Kruskal Wallis com múltiplas comparações de Sidak e de Dunn's, respectivamente. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$, e intervalo de confiança (ic) de 95%.

4 RESULTADOS

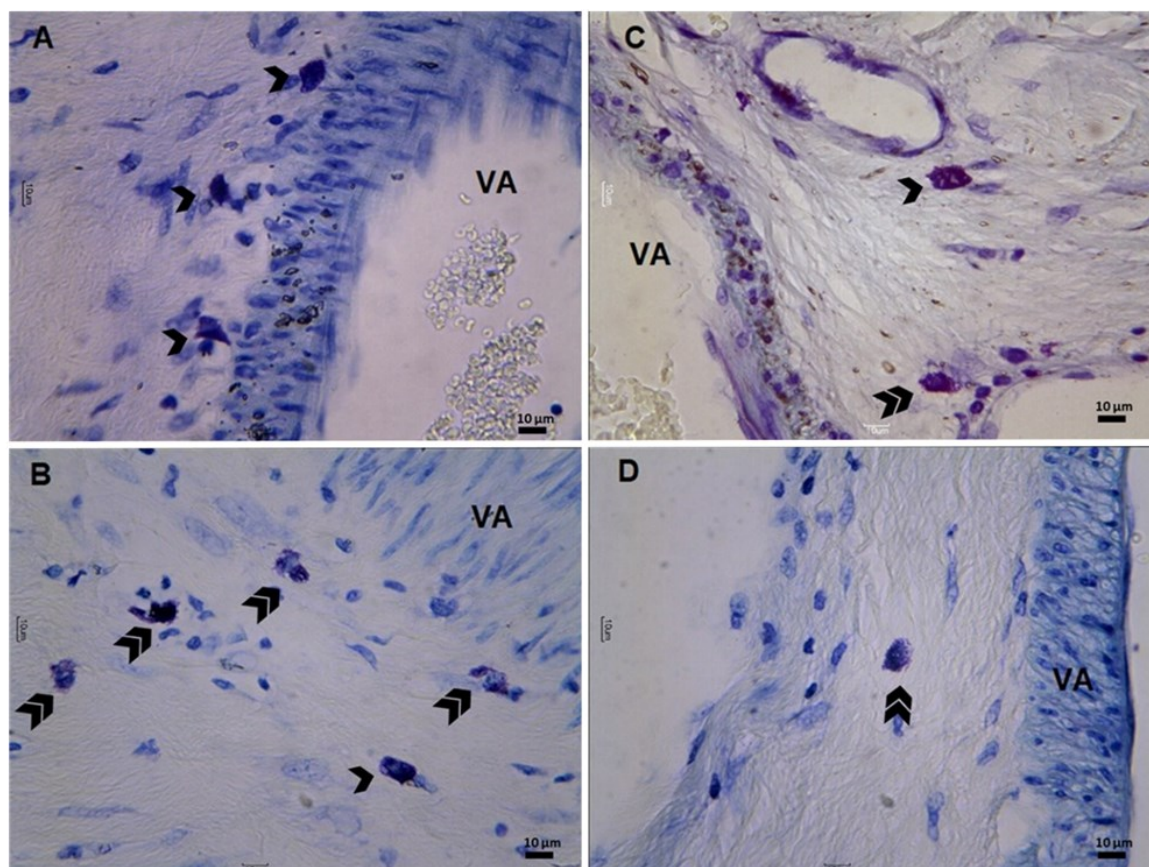
4.1 ANÁLISES MORFOFISIOLÓGICAS DE MASTÓCITOS EM DURA-MÁTER INTRACRANIANA HUMANA

Os mastócitos foram facilmente identificados nas amostras durais pelo corante azul de toluidina, apresentando coloração azul ou magenta (Fig. 14 e 15), bem como pelo marcador triptase, apresentando a cor marrom (Fig. 17). Encontradas ao redor dos vasos sanguíneos (arteriais e venosos) (Fig. 14, 15 e 17), essas células apresentavam um perfil celular compacto e intensamente corado, com grânulos intracelulares visíveis ($25,1\% \pm 0,06$) como mostrado na tabela 4. Contudo, em sua maioria, os mastócitos apresentavam manchas pálidas e grânulos extrusos ao redor do corpo celular, caracterizando o processo de degranulação, que foi de $74,9\% \pm 0,06$ (Fig. 14, 15 e 16; Tabela 4). O perfil de degranulação foi praticamente o mesmo para ambos os sexos, sendo observado cerca de $75,6\% \pm 0,05$ de células degranuladas nas amostras do sexo feminino e $74,3\% \pm 0,03$ nas do sexo masculino (Tabela 4).

Dentre as distâncias estabelecidas para averiguar a densidade de mastócitos, foi constatado que a maior quantidade de mastócitos foi encontrada bem próxima ($0 - 150 \mu\text{m}$) de ambos os vasos (arterial e venoso) em todas as áreas analisadas da convexidade da dura-máter intracraniana humana (Tabelas 5 e 6; Fig. 14 e 15).

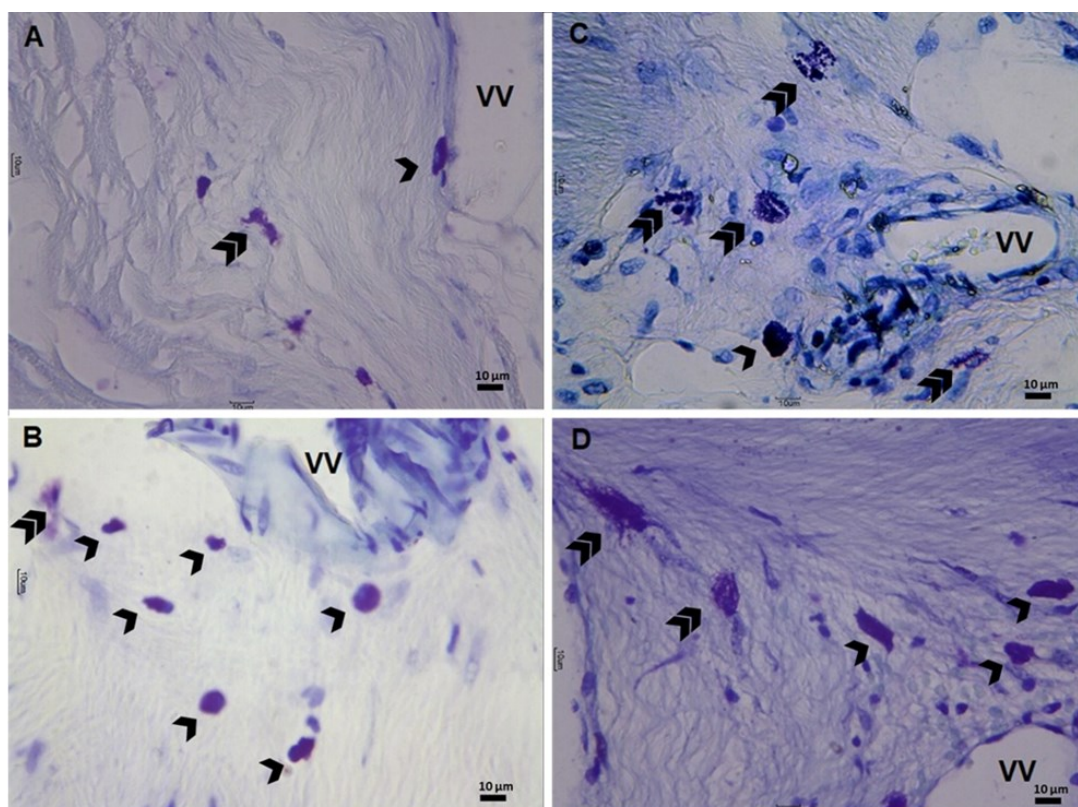
Como a maioria dos mastócitos estava entre 0 e $150 \mu\text{m}$ de distância para ambos os vasos arterial e venoso, foram realizadas comparações entre as diversas áreas da convexidade para saber onde havia a maior densidade de mastócitos em relação às camadas periosteal e meníngea, e a posição quanto ao SSS (proximal ou distal). Foi observado uma maior quantidade de mastócitos próximos aos vasos venosos na camada periosteal ($17,0 \pm 10,1$ células/ mm^2) quando comparada a camada meníngea ($14,1 \pm 7,0$ células/ mm^2) ($p < 0,05$) (Tabela 7). Além disso, na camada periosteal, a densidade de mastócitos foi maior nas proximidades dos vasos venosos ($17,0 \pm 10,1$ células/ mm^2) do que nos vasos arteriais ($12,05 \pm 7,6$ células/ mm^2) ($p < 0,05$) como descrito na Tabela 7. Quanto a localização em relação ao SSS (proximal versus distal), foi observada uma maior densidade de mastócitos próximos aos vasos venosos ($16,7 \pm 10,1$ células/ mm^2) do que aos vasos arteriais ($11,2 \pm 7,5$ células/ mm^2) na região proximal do SSS ($p < 0,05$) (Tabela 8). Já em relação ao sexo não houve diferenças de densidade de mastócitos nas diferentes áreas analisadas (Tabela 9).

Figura 14 – Fotomicrografias de mastócitos próximos aos vasos arteriais na dura-máter humana.



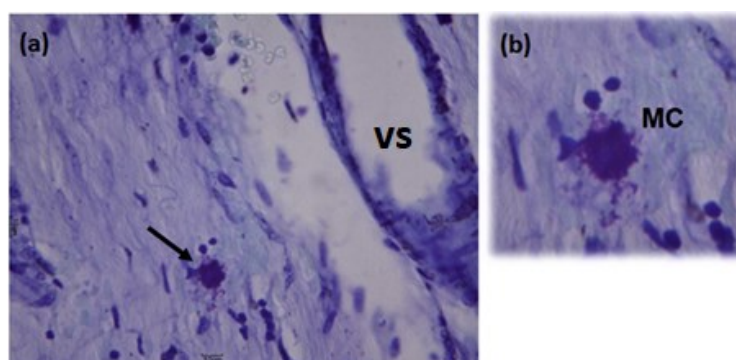
A) Região distal ao seio sagital superior e da camada periosteal, com presença de vaso arterial (VA) e três mastócitos granulados (uma seta preta); B) Região proximal ao seio sagital superior e da camada periosteal, com presença de vaso arterial (VA) e cinco mastócitos, sendo quatro degranulados (duas setas pretas) e um granulado (uma seta preta); C) Região distal ao seio sagital e da camada meníngea, com presença de um mastócito granulado (uma seta preta) e outro degranulado (duas setas pretas); D) Região proximal ao seio sagital superior e da camada meníngea, com presença vaso arterial (VA) e de um mastócito degranulado (duas setas pretas). Coloração azul de toluidina (0,1%). Barra de escala 10 µm. Fonte: a autora, 2021.

Figura 15 – Fotomicrografias de mastócitos próximos aos vasos venosos na dura-máter humana.



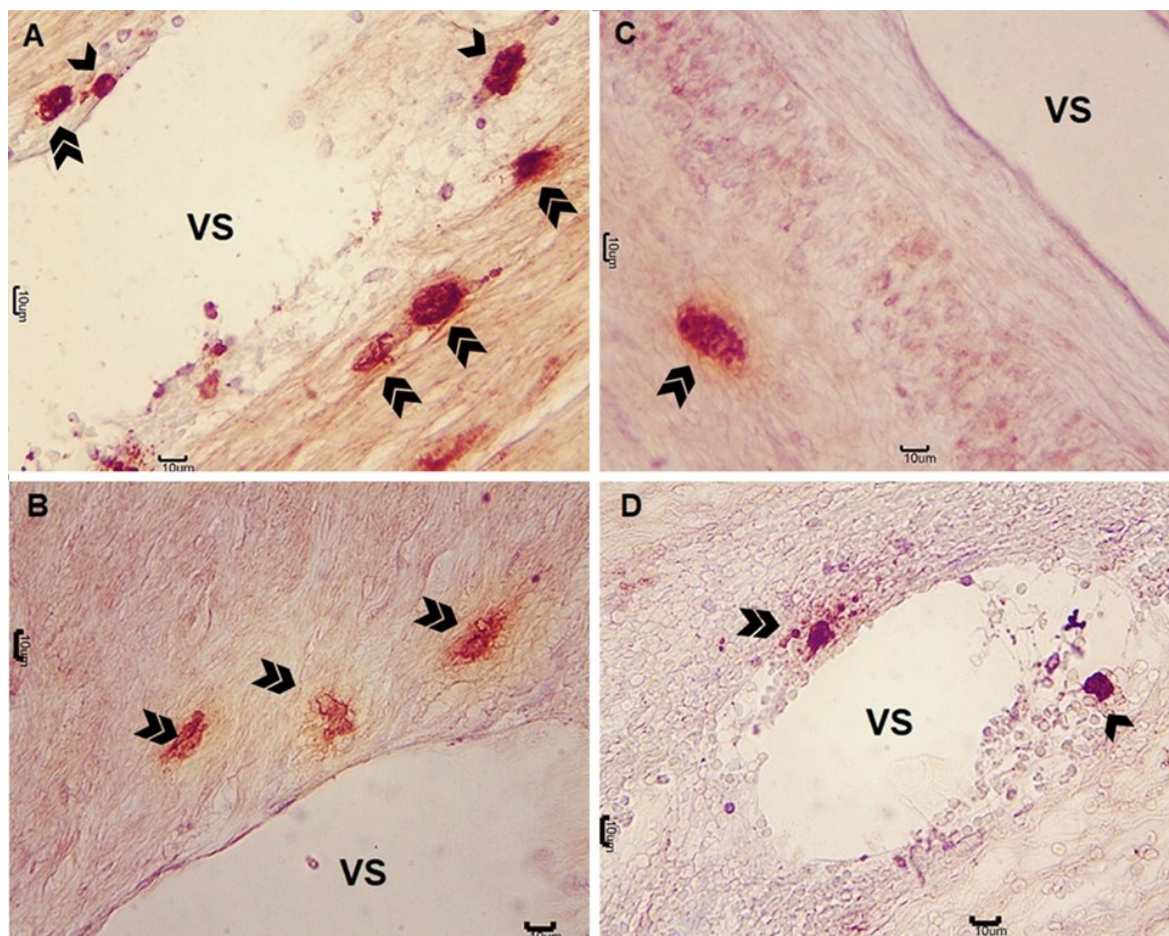
A) Região distal ao seio sagital superior e da camada periosteal, com presença de vaso venoso (VV) e dois mastócitos, sendo um granulado (uma seta preta) e um degranulado (duas setas pretas); B) Região proximal ao seio sagital superior e da camada periosteal, com presença de vaso venoso (VV) e sete mastócitos, sendo seis granulosos (uma seta preta) e um degranulado (duas setas pretas); C) Região distal ao seio sagital e da camada meníngea, com presença de vaso venoso (VV) e cinco mastócitos, sendo quatro degranulados (duas setas pretas) e um granulado (uma seta preta); D) Região proximal ao seio sagital superior e da camada meníngea, presença de vaso venoso (VV) e cinco mastócitos, sendo dois degranulados (duas setas pretas) e três granulosos (uma seta preta). Coloração azul de toluidina a 0,1%, magnitude 400x, barra de escala 10 μ m. Fonte a autora, 2021.

Figure 16 – Fotomicrografia de mastócito degranulado.



(a) Mastócito degranulado (seta preta) próximo ao vaso sanguíneo (VS); (b) Mastócito degranulado (MC) com maior aumento, evidenciando os grânulos liberados. Coloração de azul de toluidina a 0,1%, magnitude 400x. Fonte: a autora, 2021.

Figura 17 – Fotomicrografias de mastócitos marcados por triptase próximos a vasos sanguíneos na dura-máter humana.



A) Região distal ao seio sagital superior e da camada periosteal, com presença de vaso sanguíneo (VS) e seis mastócitos, sendo dois granulosos (uma seta preta) e quatro degranulados (duas setas pretas); B) Região proximal ao seio sagital e da camada periosteal, com presença de vaso sanguíneo (VS) e três mastócitos degranulados (duas setas pretas); C) Região distal ao seio sagital superior e da camada meníngea, com presença de vaso sanguíneo e um mastócito degranulado (duas setas pretas); D) Região proximal ao seio sagital superior e da camada meníngea, presença de vaso sanguíneo e dois mastócitos, sendo um degranulado (duas setas pretas) e um granulado (uma seta preta). Coloração de Imuno-histoquímica para anticorpo anti-triptase, magnitude 400x, barra de escala 10 µm. Fonte: a autora, 2021.

Tabela 4 – Análise comparativa dos tipos de parâmetros morfofisiológicos de mastócitos em estudos com dura-máter intracraniana em diferentes espécies.

Espécies	Densidade				Degranulação (%)	Granulação (%)	Referências (Autor/ Ano)
	Tipos de vasos	Tipos de camadas	SSS (Localização)	Sexo			
Humano (Pós-mortem)	Venoso e Arterial	Periosteal e Meningeal	Proximal and distal	Feminino e Masculino	Geral – $74,9 \pm 0,06$ Feminino – $75,6\% \pm 0,05$ Masculino – $74,3\% \pm 0,03$	Geral – $25,1 \pm 0,06$ Feminino – $24,4\% \pm 0,05$ Masculino – $25,7\% \pm 0,03$	Estudo atual
Humano (Pós-mortem)	ND	Periosteal e Meningeal (Dados numéricos não relatados)	NM	NM	NM	NM	Varathaj et al 2012
Rato	NM	NM	NM	Fêmea e Macho	Dados numéricos não relatados, apenas gráficos	NM	Boes & Levy, 2012
Rato	ND	NM	NM	NM	NM	NM	Artico & Cavallotti, 2001
Rato	NM	NM	NM	NM	Controle – 36 ± 8 Estresse – 68 ± 8 Estresse anti-CRH - 35 ± 8 NRS + estresse 54 ± 12 Antalarmina + estresse 42 ± 8	NM	Rozniecki et al. 1999
Rato, Porco Humano (Pós-mortem)	Arterial	NM	NM	NM	Rato – 69,19% Porco – 100% Humano – 76,8 %	NM	Otosson & Edvinsson, 1997
Rato	Arterial	NM	NM	NM	Imuno-histoquímica, perfusão fixação Esquerdo - 11.1 ± 3.9 / Direito - 36.1 ± 6.4 Técnica de ácido glioxílico (GA) sem fixação de perfusão Esquerdo- 78.6 ± 2.4 / Direito- 77.2 ± 2.3 Contra-corado com sulfato de berberina, sem fixação de perfusão Esquerdo - 90.3 ± 1.2 / Direito - 88.0 ± 1.6	NM	Dimlich et al. 1991

Nota: SSS – Superior sagittal sinus; NM- Não mostrado; ND – Não distinguido; NRS – soro de coelho normal. Dimlich et al. (1991) escolheram utilizar o termo “dispersão” em substituição ao termo “degranulação”, porém, na prática, ambos tem significado semelhante. Fonte: a autora, 2021.

Tabela 5 – Análise quantitativa da densidade dos mastócitos em diferentes distâncias em relação ao vaso arterial nas camadas e posições quanto ao seio sagital superior da dura-máter intracraniana correspondente a convexidade de oito cadáveres humanos.

Número de amostras [†] (n)	Distância(μm) entre vaso arterial e mastócitos	Camada periosteal distal (1)	Camada meníngea distal (2)	Camada periosteal proximal (3)	Camada meníngea proximal (4)
8	0 – 150	12,4 ± 5,8	13,7 ± 11,6	11,7 ± 9,2	10,7 ± 5,6
8	151 – 300	5,6 ± 3,7***	5,3 ± 3,3**	4,9 ± 4,1*	5,8 ± 3,5**
8	301 – 750	3,5 ± 2,7***	2,7 ± 2,5***	4,7 ± 5,6**	4,2 ± 3,2***

Nota: *p<0,05, 0 -150 μm vs 151 – 300 μm área (3); **p<0,01, 0 -150 μm vs 151 – 300 μm área (2) e (4); ***p<0,01, 0 – 150 μm vs 301 – 750 μm área (3); ***p<0,001, 0 -150 μm vs 151 – 300 μm área (1); 0 -150 μm vs 301 – 750 μm área (1), (2) e (4). Área (1) e (4): Teste ANOVA One Way com teste de múltiplas comparações de Dunnett's. Área (2) e (3): Teste Kruskal Wallis com teste de múltiplas comparações de Dunn's. As áreas foram avaliadas conforme a disposição e os dados são mostrados como média ± desvio padrão. [†]Lados direito e esquerdo de oito espécimes de dura-máter pós-morte. Fonte: a autora, 2021.

Tabela 6 – Análise quantitativa da densidade dos mastócitos em diferentes distâncias em relação ao vaso venoso nas camadas e posições quanto ao seio sagital superior da dura-máter intracraniana correspondente a convexidade de oito cadáveres humanos.

Número de amostras [†] (n)	Distância (μm) entre vaso venoso e mastócitos	Camada Periosteal/ Distal (1)	Camada Meníngea/ Distal (2)	Camada Periosteal/ Proximal (3)	Camada Meníngea/ Proximal (4)
8	0 – 150	16,4 ± 7,4	12,5 ± 6,6	17,7 ± 12,5	15,7 ± 7,1
8	151 – 300	3,6 ± 2,3***	3,5 ± 3,3***	2,9 ± 2,5***	3,7 ± 3,1***
8	301 – 750	1,8 ± 1,6***	4,0 ± 3,8***	1,4 ± 1,8***	2,0 ± 2,4***

Nota: ***p<0,001, 0 – 150 μm vs 151 – 300 μm todas as áreas; 0 – 150 μm vs 301 – 750 μm todas as áreas. Área (1): Teste ANOVA One way com teste de múltiplas comparações de Dunnett's. Área (2), (3) e (4): Teste Kruskal Wallis com teste de múltiplas comparações de Dunn's. As áreas foram avaliadas conforme a disposição e os dados são mostrados como média ± desvio padrão. [†]Lados direito e esquerdo de oito espécimes de dura-máter pós-morte. Fonte: a autora, 2021.

Tabela 7 - Análise quantitativa da densidade dos mastócitos a uma distância de 0 a 150 µm dos vasos em relação aos tipos de camadas da dura-máter intracraniana correspondente a convexidade de oito cadáveres humanos.

Número de amostras† (n)	Tipo de vaso sanguíneo	Camada Periosteal	Camada Meníngea
32	Arterial	12,1 ± 7,6*	12,2 ± 9,1
32	Venoso	17,0 ± 10,1	14,1 ± 6,9#

Nota: *p<0,05, 0 – 150 µm do vaso venoso camada periosteal vs 0 – 150 µm do vaso arterial camada periosteal. Teste t Student não pareado. #p<0,05, 0 – 150 µm do vaso venoso camada periosteal vs 0 – 150 µm do vaso venoso camada meníngea. Teste t Student pareado. As áreas foram avaliadas conforme a disposição e os dados são mostrados como média ± desvio padrão. †Lados direito e esquerdo/ Posição proximal e distal do seio sagital superior de oito espécimes de dura-máter pós-mortem. Fonte: a autora, 2021.

Tabela 8 - Análise quantitativa da densidade dos mastócitos a uma distância de 0 a 150 µm dos vasos em relação as posições quanto ao seio sagital superior (distal e proximal) da dura-máter intracraniana correspondente a convexidade de oito cadáveres humanos.

Número de amostras† (n)	Tipo de vaso sanguíneo	Distal	Proximal
32	Arterial	13,0 ± 9,0	11,2 ± 7,5**
32	Venoso	14,4 ± 7,2	16,7 ± 10,0

Nota: **p<0,01, 0-150 µm do vaso venoso proximal do seio sagital superior vs 0-150µm do vaso arterial proximal ao seio sagital superior. Teste Kruskal Wallis com teste de múltiplas comparações de Dunn's. †Lados direito e esquerdo/ Camadas periosteal e meníngea de oito espécimes de dura-máter pós-mortem. Fonte: a autora, 2021.

Tabela 9 – Análise quantitativa da densidade dos mastócitos a uma distância de 0 a 150 µm dos vasos em relação ao sexo da dura-máter intracraniana correspondente a convexidade de oito cadáveres humanos.

Número de amostras† (n)	Área	Feminino Vaso Arterial	Feminino Vaso Venoso	Masculino Vaso Arterial	Masculino Vaso Venoso
8	Camada periosteal/ Distal (1)	10,8 ± 5,0	14,6 ± 8,6	13,9 ± 6,5	18,7 ± 7,2
8	Camada Meníngea/ Distal (2)	10,0 ± 5,1	12,5 ± 8,6	17,3 ± 15,2	12,6 ± 4,3
8	Camada Periosteal/ Proximal (3)	10,8 ± 6,2	13,8 ± 8,3	12,6 ± 11,9	19,5 ± 14,1
8	Camada Meníngea/ Proximal (4)	12,6 ± 6,4	16,3 ± 5,4	8,7 ± 4,3	15,3 ± 8,9

Nota: As áreas foram avaliadas conforme a disposição e os dados são mostrados como média ± desvio padrão. †Lados direito e esquerdo de oito (quatro do sexo masculino/ quatro do sexo feminino) espécimes de dura-máter pós-mortem. Fonte: a autora, 2021.

4.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS NO ESTUDO *IN VITRO*.

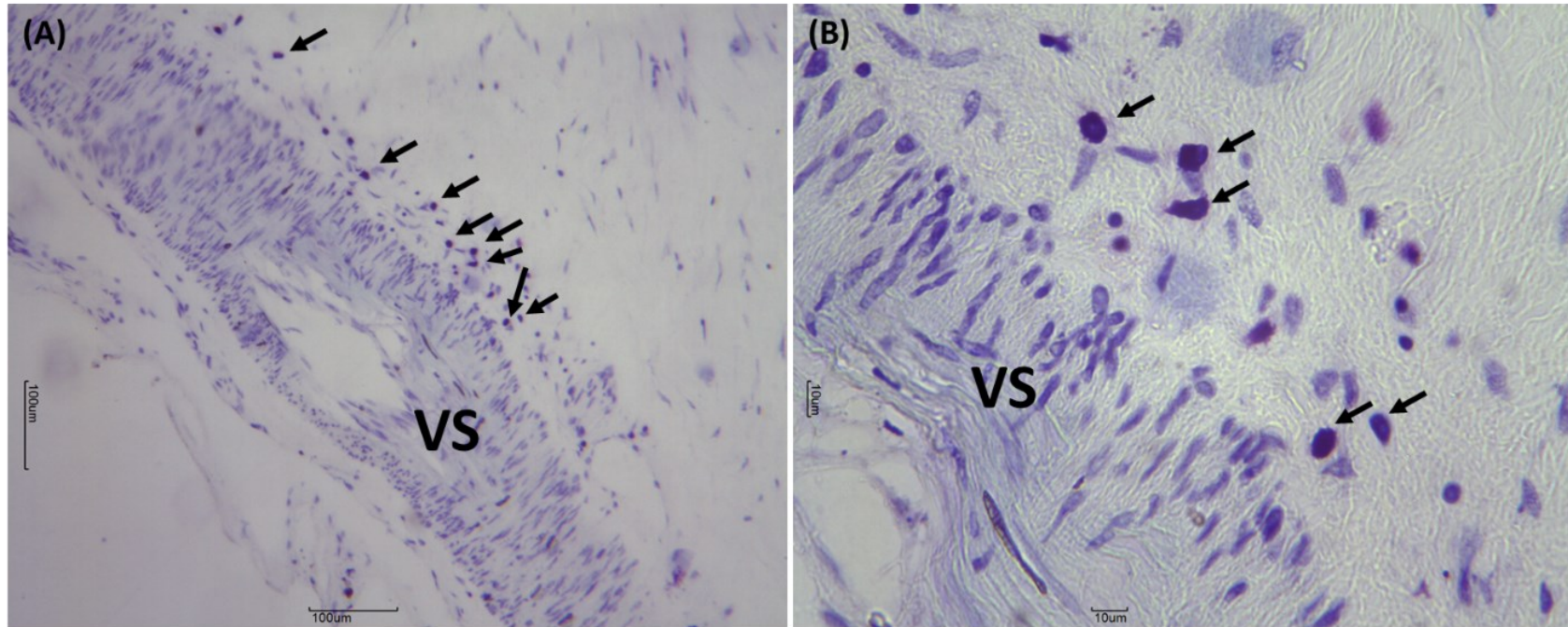
Os dados demonstraram que o tratamento com topiramato na menor concentração (10^{-10} M) apresentou uma menor porcentagem de mastócitos degranulados por mm^2 ($75,39\% \pm 0,27$), quando comparado com o grupo controle positivo (KCl 60 mM) (100%) (* $p=0,0259$, Tabela 10). As duas menores concentrações de topiramato 10^{-8} M e 10^{-10} M apresentaram uma maior porcentagem de mastócitos granulados por amostragem 57,14% e 71,43%, respectivamente ($p=0,041$; $p=0,006$; Tabela 11; Figura 18), bem como uma maior porcentagem no total de mastócitos granulados encontrados nas amostras (25% e 38,95%) quando comparados ao grupo Controle (junção dos grupos controle positivo, negativo e veículos) ($p<0,0001$; $p<0,0001$, Tabela 12).

4.3 ANÁLISE DA LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE ÓXIDO NÍTRICO E DE CGRP

A Tabela 13 apresenta os resultados da liberação *in vitro* de óxido nítrico pela dura-máter intracraniana humana das três etapas dos oito grupos experimentais, nos quais não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos tratados e suas etapas quando comparados com seus respectivos veículos.

Não foram observadas diferenças significativas na liberação *in vitro* de CGRP pela dura-máter intracraniana humana na etapa de incubação dos grupos experimentais veículo (etanol a 0,1%, 0,001%, 0,00001%) e topiramato (10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} M) conforme está demonstrada na Tabela 14.

Figura 18 – Fotomicrografias de amostra de dura-máter intracraniana humana tratada com topiramato 10^{-10} M.



(A) Presença de mastócitos granulados (setas pretas) próximos a um grande vaso sanguíneo (VS), magnitude 100x. (B) Presença de mastócitos granulados (setas pretas) próximos a um grande vaso sanguíneo (VS), magnitude 400x. Coloração de azul de Toluidina a 2%. Barra de escala 100µm (A) e 10µm (B). Fonte: a autora, 2021.

Tabela 10 – Densidade e porcentagem de mastócitos granulados e degranulados por mm² da dura-máter intracraniana dos grupos experimentais.

Grupos de tratamento	Mastócitos granulados/mm²	Mastócitos Granulados (%)	Mastócitos degranulados/mm²	Mastócitos degranulados (%)
Controle (SIF)	0,03 ± 0,05	3,60% ± 0,07	0,43 ± 0,55	96,40% ± 0,07
KCL 60 mM	0	0	0,84 ± 0,36	100,00%
Veículo 1 (Etanol a 0,00001%)	0,04 ± 0,05	5,71% ± 0,08	0,63 ± 0,27	94,29% ± 0,08
Veículo 2 (Etanol a 0,001%)	0,05 ± 0,09	16,67% ± 0,29	0,45 ± 0,42	83,33% ± 0,29
Veículo 3 (Etanol a 0,1%)	0	0	0,30 ± 0,27	100,00%
TP 10 ⁻¹⁰ M	0,48 ± 0,69	24,61% ± 0,27	0,75 ± 0,42	75,39% ± 0,27*
TP 10 ⁻⁸ M	0,08 ± 0,08	24,83% ± 0,24	0,24 ± 0,11	75,17% ± 0,24
TP 10 ⁻⁶ M	0	0	0,40 ± 0,23	100,00%

Nota: Os dados representam a média ± desvio padrão. SIF – fluido intersticial sintético; KCl 60mM – cloreto de potássio concentrado a 60 milimolar; M- molar; mm² – milímetro quadrado. TP – Topiramato. *p= 0,0259, grupo KCl 60 mM versus grupo TP 10⁻¹⁰ M. Teste Kruskal Wallis com múltiplas comparações de Dunn's. Fonte: a autora, 2021.

Tabela 11 – Fração e porcentagem da presença de mastócitos granulados por amostragem de dura-máter intracraniana humana nos grupos experimentais.

Grupos de tratamento	Mastócitos Granulados (%) (Amostras com mastócitos Granulados/Total de amostras)	p
Controle	7/35 (20%)	-
TP 10 ⁻¹⁰ M	5/7 (71,43%)	p=0,006
TP 10 ⁻⁸ M	4/7 (57,14%)	p=0,041

TP – Topiramato; M- molar. Controle = Junção dos grupos experimentais Controles positivo, Controle negativo e veículos 1, 2, 3. *p=0,041, Controle versus TP 10⁻⁸ M; **p=0,006, Controle versus TP 10⁻¹⁰ M. Teste Qui-quadrado (χ^2). Fonte: a autora, 2021.

Tabela 12 – Fração e porcentagem de mastócitos granulados encontrados em amostras de dura-máter.

Grupos de tratamento	Mastócitos Granulados (%) (Quantidade de mastócitos granulados/ total de mastócitos)	p
Controle	9/212 (4,25%)	-
TP 10 ⁻¹⁰ M	37/95 (38,95%)	p<0,0001
TP 10 ⁻⁸ M	6/24 (25%)	p<0,0001

TP – Topiramato; M- molar. Controle = Junção dos grupos experimentais Controles positivo, negativo e veículos 1, 2, 3. ****p<0,0001, Controle versus TP 10⁻⁸ M; ****p<0,0001, Controle versus TP 10⁻¹⁰ M. Teste Qui-quadrado (χ^2). . Fonte: a autora, 2021.

Tabela 13 – Liberação *in vitro* de Óxido Nítrico (μM) pela dura-máter intracraniana humana das três etapas experimentais dos grupos ao longo do tempo.

Grupos de tratamento	Pré-incubação (15 min) Etapa 1	Incubação (30 min) Etapa 2	Estimulação (30 min) Etapa 3
Controle (SIF)	$0,326 \pm 0,111$	$0,114 \pm 0,090$	$0,109 \pm 0,178$
KCl 60 mM	$0,395 \pm 0,160$	$0,104 \pm 0,093$	$0,125 \pm 0,073$
Veículo 1 (Etanol a 0,00001%)	$0,246 \pm 0,097$	$0,141 \pm 0,086$	$0,239 \pm 0,119$
Veículo 2 (Etanol a 0,001%)	$0,165 \pm 0,141$	$0,094 \pm 0,060$	$0,028 \pm 0,045$
Veículo 3 (Etanol a 0,1%)	$0,161 \pm 0,083$	$0,061 \pm 0,068$	$0,067 \pm 0,086$
TP 10^{-10} M	$0,224 \pm 0,096$	$0,126 \pm 0,082$	$0,117 \pm 0,084$
TP 10^{-8} M	$0,119 \pm 0,086$	$0,083 \pm 0,065$	$0,066 \pm 0,063$
TP 10^{-6} M	$0,168 \pm 0,032$	$0,042 \pm 0,048$	$0,037 \pm 0,039$

Nota: Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de triplicatas de cada amostra. M – Molar; SIF – fluido intersticial sintético; KCl 60mM – cloreto de potássio concentrado a 60 milimolar; TP – Topiramato; min – minutos. Teste Kruskal Wallis com múltiplas comparações de Dunn's e Teste One Way ANOVA com múltiplas comparações de Sidak. Fonte: a autora, 2021.

Tabela 14 – Liberação *in vitro* de CGRP (pg/mL) de dura-máter intracraniana humana da etapa incubação dos grupos experimentais.

Grupos de tratamento	CGRP (pg/mL)
Veículo (etanol a 0,1%, 0,001%, 0,00001%) (n=9)	$18,58 \pm 18,64$
TP 10^{-10} M (n=7)	$18,28 \pm 24,64$
TP 10^{-8} M (n=7)	$34,19 \pm 36,74$
TP 10^{-6} M (n=7)	$20,11 \pm 9,25$

Nota: Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão. M – Molar; n – número de amostras; TP- Topiramato; pg/mL – picograma por mililitro. Teste Kruskal Wallis com múltiplas comparações de Dunn's. Fonte: a autora, 2021.

5 DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES MORFOFISIOLÓGICAS DE MASTÓCITOS EM DURA-MÁTER INTRACRANIANA HUMANA

O atual estudo teve como objetivo principal avaliar a densidade de mastócitos em relação à distância entre essas células e os tipos de vasos (arteriais e venosos) nas camadas periosteal e meníngea, e em regiões próximas ou distantes do seio sagital superior de dura-máter intracraniana humana pós-mortem. Foi observado que os mastócitos se encontravam em maior quantidade a uma distância entre 0-150 μm de ambos os tipos de vasos sanguíneos, e que houve uma maior densidade dessas células próximo ao vaso venoso da camada periosteal e em regiões próximas ao seio sagital superior.

Os mastócitos, inicialmente considerados impulsioneiros essenciais das reações alérgicas, são, na realidade, um tipo especial de células que pode ter estado funcionalmente envolvido em muitos outros processos fisiopatológicos. Sua localização perivascular típica é uma pista no controle dos processos vasoativos, e isso, na dura-máter, pode ser associado à patogênese da cefaleia.

Os estudos acerca da temática abordada (Tabela 4) não relatam, até o presente momento, uma contagem diferencial dos mastócitos de acordo com os tipos de vasos sanguíneos. Otolsson & Edvinsson (1997) demonstraram em seu estudo com dura-máteres cranianas de oito cadáveres humanos que mastócitos foram encontrados nas proximidades dos vasos sanguíneos com uma média de 7,4 mastócitos por campo visual. No entanto, eles realizaram a contagem em uma distância com maior abrangência (de até 500 μm de cada lado da AMM). A proximidade entre mastócitos e vasos sanguíneos permite que os mediadores liberados atuem diretamente em células endoteliais e, possivelmente, também entrem nos vasos sendo levados a locais mais distantes, promovendo tanto efeitos locais como sistêmicos (KUNDER et al. 2011).

Em contrapartida, os mastócitos duros de ratos foram encontrados em abundância próximos ou distantes dos vasos sanguíneos (OTOSSON & EDVINSSON, 1997), bem como próximos a fibras aferentes com imunorreação para substância P (SP) (ROZNIECKI et al. 1999). Dimlich e colaboradores (1991) mostraram que essas células duros de ratos se apresentavam alinhadas em paralelo à artéria meníngea média na camada periosteal e na camada meníngea, também eram paralelas à ramos do nervo trigeminal, e algumas não eram adjacentes a nenhuma das estruturas. Esse mesmo estudo mostrou que em secções transversais de dura-máter intracraniana, os mastócitos eram alinhados na interface entre as duas camadas. Com isso, supõem-se que, em ratos, os mastócitos podem ter funções relacionadas ao tecido

conjuntivo, como no processo do desenvolvimento normal, bem como na resposta inflamatória a lesões e reparo de feridas (DIMLICH et al. 1991).

Em outro estudo com mastócitos durais de ratos, foi observado uma maior densidade nas proximidades de fibras nervosas catecolaminérgicas, porém, apresentando uma maior fluorescência dessas células na zona basal em relação à zona apical da dura-máter. Da mesma forma, a fluorescência aumenta no sentido da zona vasal para as zonas perivasal e intervalsal, demonstrando uma relação inversa entre quantidade de mastócitos e de fibras nervosas catecolaminérgicas fluorescentes (ARTICO & CAVALLOTTI, 2001). A implicação das regulações autonômicas sobre a função dos mastócitos possui possivelmente um padrão de distribuição próximo aos vasos durais, que recebem diferentes fibras neurais (KLEIJ & BIENENSTOCK, 2005). A comunicação funcional entre os nervos durais e os mastócitos é fortemente sugerida. Muitas substâncias podem ser liberadas de nervos não colinérgicos autônomos ou não adrenérgicos, influenciando o recrutamento, proliferação e ativação de leucócitos (KLEIJ & BIENENSTOCK, 2005). Por sua vez, as células inflamatórias também podem modular a função neuronal (KLEIJ & BIENENSTOCK, 2005).

Varathaj et al. (2012) investigaram a densidade de mastócitos na dura-máter intracraniana humana e as alterações associadas à hemorragia subdural (SDH). Neste estudo foram usados casos de dura-máter sem sangramento dural e casos com hemorragia dural fresca e antiga. A densidade analisada nestes três casos demonstrou que a hemorragia dural está associada ao aumento na quantidade de mastócitos durais e parece aumentar com a cronicidade do sangramento. Varathaj et al. (2012) ainda consideraram que os mastócitos apresentavam a tendência de serem encontrados em torno dos vasos sanguíneos, contudo os tipos de vasos não foram identificados, além de serem mais frequentes na camada periosteal do que na camada meníngea (dados numéricos não informados). Esse mesmo estudo mostrou que a maioria dessas células se encontravam granuladas e poucas degranuladas ou ativadas (percentuais não informados). Em nosso estudo foi especificado o tipo de vaso, se arterial ou venoso, e foi observado que existia uma maior densidade de mastócitos próximos ao vaso venoso na camada periosteal do que na camada meníngea. É adequado saber o tipo de vaso em que esses mastócitos se encontram na dura-máter, pois em processos inflamatórios, a histamina liberada por mastócitos próximos a vasos venosos (vênulas pós-capilares, por exemplo), alteram a permeabilidade vascular e facilitam a passagem de leucócitos para o local (KUNDER et al. 2011; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017). Além disso, a degranulação de mastócitos em vênulas pós-capilares de dura-máter pode ser provocada a partir de uma estimulação elétrica do gânglio trigeminal, que conduz a liberação de neuropeptídeos e,

consequentemente, o extravasamento plasmático, a ativação de células endoteliais, agregação e adesão plaquetária (BUZZI & MOSKOWITZ, 1991).

Os mastócitos são reconhecidos como células-chave das reações de hipersensibilidade do tipo I (CRIVELLATO et al, 2004). No entanto, várias linhas de evidência indicam que os mastócitos expressam funções efetoras críticas em distúrbios alérgicos clássicos associados a IgE e desempenham papéis essenciais na defesa do hospedeiro contra parasitas, bactérias e vírus. Essas células podem contribuir para a defesa do hospedeiro no contexto de respostas imunes adquiridas e inatas, liberando uma miríade de moléculas pró-inflamatórias e imunorreguladoras e expressando um amplo espectro de receptores de superfície para citocinas e quimiocinas. Além disso, há evidências crescentes de que os mastócitos exercem funções não imunológicas distintas, desempenhando um papel relevante na homeostase, remodelação e fibrose dos tecidos, bem como nos mecanismos de angiogênese dos tecidos (CRIVELLATO et al, 2004; CRIVELLATO & RIBATTI, 2010; RIBATTI & CRIVELLATO, 2016; RIBATTI et al. 2019). Os mastócitos também estão implicados na progressão das neoplasias, interagindo com as células tumorais (CRIVELLATO et al, 2004; CRIVELLATO & RIBATTI, 2010; RIBATTI & CRIVELLATO, 2016; RIBATTI et al, 2019).

Sendo uma estrutura importante da dura-máter, o seio sagital superior, após estimulação elétrica causa dor em humanos (FEINDEL et al, 1960), havendo aumento do fluxo sanguíneo cerebral mais do que a estimulação realizada em gânglio trigeminal (GOADSBY et al, 1997). Além disso, a estimulação elétrica do SSS também produz liberação de CGRP e peptídeo intestinal vasoativo (VIP), de neurônios trigeminais e de neurônios parassimpáticos, respectivamente (ZAGAMI et al, 1990). Devido a importância do SSS, o nosso estudo, pioneiro nesta temática até o momento, dentre as principais literaturas do tema (Tabela 4), mostrou que há uma maior população de mastócitos próximos à vasos venosos na região proximal ao SSS.

Queremos discutir as implicações funcionais potenciais de nossos resultados da presença de mastócitos na dura-máter de humanos. Uma inflamação estéril na patogênese da enxaqueca foi postulada, e vários estudos observaram a dura-máter como um possível local envolvido na geração da dor da migrânea. A descoberta de mastócitos na dura-máter é um tanto intrigante, sugerindo fortemente um papel neste processo de inflamação com vasodilatação ou constrição que pode ocorrer durante uma crise de enxaqueca. Uma comunicação bidirecional deve ocorrer entre os vasos sanguíneos durais e os mastócitos; da mesma forma, as trocas de substâncias entre os mastócitos e os terminais neurais devem inervar a dura-máter, particularmente os vasos sanguíneos.

Dentre as cefaleias primárias mais conhecidas, a migrânea, é o tipo de ocorrência mais comum em mulheres (STOVNER et al. 2007), e o estrogênio pode desempenhar um papel fundamental na mediação dessa suscetibilidade (MACGREGOR, 2009). Estudos têm demonstrado a presença de receptores de estrogênio em mastócitos da bexiga humana (PANG et al. 1995) e em mastócitos de dura-máter de rato (ROZNIECKI et al. 1999). Além disso, já foi constatado que o estradiol pode aumentar a degranulação dos mastócitos por composto 48/80 e carbacol (VLIAGOFTIS et al. 1992; THEOHARIDES et al, 1993). Em ratos, a densidade dos mastócitos duros intracranianos em relação ao sexo é maior em fêmeas (BOES & LEVY, 2012). No presente estudo, com amostras de dura-máter intracraniana humana pós-morte, não foi observado diferenças entre os sexos quanto as densidades de mastócitos nas áreas analisadas da convexidade da dura-máter, nem quanto a porcentagem de mastócitos degranulados.

No atual estudo verificou-se que as amostras de dura-máter humana pós-morte tinham uma porcentagem de mastócitos degranulados de quase 75%. Resultados semelhantes foram encontrados por Otosson e Edvinsson (1997) que estudando amostras de dura-máter intracraniana pós-morte de humano, rato e porco observaram porcentagens de mastócitos degranulados de 76,8%, 69,19% e 100%, respectivamente. A degranulação dos mastócitos também pode ser decorrente da retirada da dura-máter do crânio (OTTOSSON & EDVINSSON, 1997), mas não podemos comprovar essa hipótese.

Um fenômeno intrigante é que encontramos mastócitos em ambas as formas - granulosos e degranulados - o que sugere a existência de um ciclo entre esses dois estágios. Não sabemos quanto tempo um mastócito vive na dura-máter após a morte, na literatura afirma-se que esta célula vive de semanas a meses (TAYLOR & METCALFE, 2001). Além disso, não se sabe quanto tempo é o ciclo entre a degranulação e a recuperação da célula ao seu estado granular neste órgão, até o momento foi descrito que este ciclo em cultura de tecido pulmonar vai de três a quarenta e oito horas (DVORAK et al, 1987). Esse ciclo provavelmente pode estar relacionado à duração de uma crise de enxaqueca se essa inflamação estéril permanecer por toda a duração de uma crise de migrânea de 4 horas a 3 dias normalmente.

Por fim, outro aspecto potencial a ser comentado diz respeito a uma caracterização ultraestrutural dos mastócitos perivasculars. Isso permitiria o reconhecimento de diferentes tipos de grânulos e diria mais sobre potenciais implicações funcionais e modalidades de degranulação e poderia aumentar consideravelmente o valor do presente estudo. Estudos futuros estão planejados para avaliar mais tais questões.

5.2 ANÁLISES HISTOLÓGICAS DA DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS NO ESTUDO *IN VITRO*

A atual pesquisa é um estudo inédito que visou a utilização do topiramato em amostras de dura-máter intracraniana pós-morte para analisar seu efeito sobre a degranulação de mastócitos e liberação de óxido nítrico e CGRP, o qual observou-se um efeito protetivo deste fármaco nas menores concentrações sobre a porcentagem de mastócitos granulosos. Até o momento, não há estudos relacionando ações do topiramato e mastócitos.

Nas últimas décadas, tem sido sugerido que mastócitos exercem papéis vasoativos e neurosensibilizantes na fisiopatologia da migrânea. Estudos clínicos com humanos mostram que há um aumento nos níveis de histamina em pacientes com migrânea e que esses podem ser tratados de modo específico pelo receptor H1 por anti-histamínicos profiláticos (AICH et al 2015; HAIMART et al, 1987; HEATLEY et al 1982; SJAASTAD & SJAASTAD, 1977). Mediadores inflamatórios tais como endotelina-1, TNF α e IL-6 e leucotrienos, foram encontrados associados à migrânea em seres humanos (SARCHIELLI et al, 2006; SHEFTELL et al, 2000; HASSELBLATT et al, 1999) . Deste modo, os MCs podem exercer um papel relevante para a dor da enxaqueca por inúmeros mecanismos (AICH et al, 2015)

Otosson & Edvinsson (1997) fizeram um estudo *in vitro* semelhante com oito dura-máteres de cadáveres humanos e de outras duas espécies (porco e rato), e nele analisaram se o composto 48/80, e os neuropeptídeos tais como SP, CGRP, VIP e NPY provocavam liberação de histamina de mastócitos. O resultado desse estudo indicou que não havia liberação de histamina nem de humano nem de porco, e isso tinha relação com a alta espontaneidade de liberação desse mediador das dura-máteres de ambas as espécies, o que explicaria a difícil demonstração de algum efeito por parte desses agentes sobre a histamina. Além disso, a remoção da dura-máter de humanos e porco do osso craniano (craniotomia) pode provocar degranulação (OTOSSON & EDVINSSON, 1997; MARKOWITZ et al, 1989).

Rodriguez-Lopez e colaboradores (2020), demonstraram que um outro antiepiléptico, o ácido valpróico (VPA), foi capaz de reduzir significativamente a degranulação de mastócitos derivados de medula óssea dependente de IgE e a liberação de citocinas. Nesse mesmo estudo, o VPA induziu uma redução significativa na expressão do receptor de alta afinidade IgE (Fc ϵ RI) e receptor do fator de crescimento de mastócitos (CD117) da superfície celular e inibiu a fosforilação de fosfolipase C gama 2 (PLC γ 2), que é uma importante molécula de sinalização envolvida na degranulação mediada por IgE e secreção de citocinas (RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al 2020).

Um outro antiepiléptico, o gabapentina, em estudo com camundongos foi capaz de reduzir o edema de pata induzido por dextrana, que é dependente da ativação do mastócito (DAMASCENO et al, 2014). Outra pesquisa estudou o papel do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR- γ) nos efeitos anti-inflamatórios mediados pela gabapentina em um modelo experimental de colite em ratos. Nesse estudo a gabapentina foi capaz de reduzir os parâmetros inflamatórios macroscópicos e microscópicos, bem como diminuiu marcadores de estresse oxidativo e citocinas como IL-1 β e TNF- α , assim como enzima de óxido nítrico sintase indutível, ciclooxigenase 2 e o regulador gênico inflamatório (Fator nuclear kappa B – NF κ B). Além disso, foi visto que esses efeitos foram perdidos na presença do inibidor específico de PPAR- γ . Com isso, foi atribuído que gabapentina regula a sinalização dos mastócitos pelo PPAR- γ e inibe a inflamação intestinal. (DE BRITO et al, 2020).

Entre os inúmeros mecanismos neuromodulatórios do topiramato usados na migrânea se destacam: a modulação dos canais iônicos de Na⁺ e Ca²⁺ dependentes de voltagem, modulação da sinalização nociceptiva através dos receptores gama- aminobutírico (GABA_A), a modulação da neurotransmissão excitatória através de receptores de glutamato (AMPA/kainato), inibição de algumas isoenzimas II e IV da anidrase carbônica e o bloqueio da ativação de neurônios trigeminais (ROSAS et al, 2018; AURORA & BRIN, 2017; SPRITZER et al, 2011; CASUCCI et al., 2008). Possivelmente o topiramato pode ter esse efeito protetivo sobre a degranulação de mastócitos, ou de forma semelhante aos fármacos de mesma classe como VPA e gabapentina, ou pela inibição de canais iônicos (Ca²⁺) ou receptores que estão presentes nos mastócitos tais como: CGRP, GABA (XU et al, 2020), ou por outras vias que ainda precisam ser investigadas.

Afrim e colaboradores (2015) em sua revisão fez um copilado de medicamentos usados em transtornos neuropsiquiátricos que possuem alto risco comprovado ou teórico de ativação de mastócitos e dentre eles estava o topiramato, contudo os experimentos que comprovem isso não foram publicados.

5.3 LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E CGRP NO ESTUDO *IN VITRO*

O atual estudo não evidenciou nenhum efeito do topiramato sobre a liberação de NO nas diferentes concentrações, devido ao tipo de amostra e tempo de morte, bem como o estímulo mecânico gerado na retirada da dura-máter do osso craniano. Nenhum estudo foi encontrado com a dura-máter, topiramato e níveis de óxido nítrico.

Entre os principais gatilhos de dor de cabeça da migrânea está o óxido nítrico. Estudo clínico tem mostrado que existe elevadas concentrações de produtos de degradação de óxido nítrico no fluxo venoso da cabeça durante ataques de migrânea (SARCHIELLI et al, 2000). Tem sido sugerido que o alívio da dor de cabeça da migrânea pode ser bem-sucedida através do bloqueio da geração endógena de NO (LASSEN et al 1997). Além disso, pacientes com migrânea e alguns indivíduos controles demonstraram que a infusão intravenosa de trinitrato de glicerol (GTN), um doador de NO exógeno, causava dor de cabeça imediata e um ataque de migrânea retardada (MESSLINGER, et al 2012).

Estudo com humanos tem evidenciado que a administração de topiramato sozinho ou em conjunto com vitamina “E” diminui os valores de óxido nítrico sérico e óxido nítrico nos rins. Esta diminuição pode se dar pela modulação dos canais de cálcio dependentes de voltagem nos rins, que pode causar a diminuição da produção mitocondrial de óxido nítrico. Com isso, o TP pode exercer efeito protetor sobre o estresse oxidativo e o sistema antioxidante nos rins (ARMAĞAN et al, 2008).

Um estudo com microscopia intravital de modelo animal demonstrou que TP foi capaz de inibir a dilatação dos vasos sanguíneos dural induzida apenas por óxido nítrico (NO) e não por CGRP (AKERMAN e GOADSBY, 2005a). Provavelmente isso se deu pela inibição da liberação de CGRP a partir de neurônios trigeminais, que reduziu a vasodilatação dural. Além disso, esse estudo evidenciou que o topiramato não foi capaz de agir no neurônio pós-sinápticamente dos próprios vasos sanguíneos, pois a dilatação induzida por CGRP não foi modificada (AKERMAN e GOADSBY, 2005a).

O neuropeptídeo CGRP, encontrado principalmente em fibras nervosas trigeminais de ramificações da artéria meníngea média da dura-máter, tem sido considerado um mediador-chave na migrânea e em outras dores de cabeça primárias (MESSLINGER et al, 2012). Esse fato tem sido comprovado com evidências clínicas, os quais foram demonstradas concentrações elevadas de CGRP no sangue venoso jugular (ASHINA et al, 2000) e na saliva (BELLAMY et al, 2006) durante ataques de migrânea e outras dores de cabeça primárias (MESSLINGER et al, 2012). Além disso, ataques de migrânea vem sendo tratados com triptanos que causam redução dos níveis de CGRP, bem como anticorpos monoclonais de receptor de CGRP vem sendo eficaz em pacientes humanos com migrânea (AVONA et al 2019). No atual estudo *in vitro*, buscou-se analisar os níveis de CGRP utilizando fragmentos de dura-máter intracraniana de cadáver contendo artéria meníngea média e fibras imunorreativas para CGRP, contudo os níveis de CGRP não apresentaram diferenças nos grupos topiramato e veículos. Possivelmente, essa liberação do CGRP em amostra de cadáver

pode ser escassa ou ser comprometida devido ao tempo de morte, ou ao mecanismo de retirada desta dura-máter do crânio, bem como não foi possível dosar a última etapa de estimulação com KCl 60 mM.

Estudos experimentais tem demonstrado que TP diminui a liberação de CGRP induzida por KCl, óxido nítrico e próton de forma dose e tempo dependente, em cultura neuronal trigeminal (DURHAM, 2006; DURHAM et al., 2006). Huang e colaboradores (2018) em um estudo *in vivo* com ratos adultos (8-9 semanas) de modelo de migrânea induzida por capsaicina demonstraram que o TP foi eficaz na inibição periférica da expressão de CGRP no gânglio trigeminal (TG), com uma melhor resposta em baixa dosagem em adultos. Além disso, este mesmo estudo sugeriu que o mecanismo preventivo do TP pode envolver a inibição central e periférica do sistema trigeminovascular, sendo uma melhor resposta com uma dose mais alta de TP para a resposta central no complexo trigeminocervical, e na dura-máter (periferia) com uma dose baixa para TG em ratos adultos (HUANG et al, 2018). Estes resultados corroboram com nossos resultados quanto a ação deste fármaco nas menores concentrações, porém isso se deu apenas na degranulação dos mastócitos.

6 CONCLUSÃO

- Mastócitos de dura-máter de cadáver humano apresentaram distâncias dos vasos arteriais e/ ou venosos que variaram de 0 a 750µm;
- Os mastócitos observados na convexidade da dura-máter intracraniana humana estão localizados próximos aos vasos arteriais e venosos, com uma densidade maior dessas células ocorrendo nas proximidades dos vasos venosos na camada periosteal e proximal ao seio sagital superior, o que sugere sua participação em processos neuroinflamatórios, como a enxaqueca, bem como na modulação da permeabilidade vascular, angiogênese e no recrutamento de células de defesa na dura-máter humana;
- Mastócitos foram facilmente identificados por triptase nas amostras de dura-máter intracraniana humana;
- Os níveis de óxido nítrico e de CGRP de dura-máter humana pós-morte *in vitro* não diferenciaram quanto a presença ou não do fármaco topiramato;
- Este estudo *in vitro* mostrou que o tratamento com topiramato nas menores concentrações (10^{-8} M e 10^{-10} M) apresentaram maiores porcentagens de mastócitos granulados, sugerindo que este fármaco exerça ação protetiva sobre esta célula, e isso possivelmente contribui para não deflagrar inflamação estéril dural e consequentemente a dor de cabeça na migrânea.

REFERÊNCIAS

- ADEEB, N.; MORTAZAVI, M M.; TUBBS, R.S.; GADOL, A. A. C. The cranial dura mater: a review of its history, embryology, and anatomy. **Childs Nerv Syst**, n. 28, p. 827–837, 2012.
- AFRIN, L. B.; PÖHLAU, D.; RAITHEL, M.; et al. Mast cell activation disease: An underappreciated cause of neurologic and psychiatric symptoms and diseases. **Brain, Behavior, and Immunity**, n. 50, p. 314–321, 2015.
- AICH, A.; AFRIN, B. L.; GUPTA, K. Mast Cell-Mediated Mechanisms of Nociception. **Int J Mol Sci.**, n. 16, v. 12, p. 29069–29092, 2015.
- AIYAR, N.; RAND, K.; ELSHOURBAGY, N.A.; et al. cDNA encoding the calcitonin gene-related peptide type 1 receptor. **J. Boil. Chem.**, n. 271, p. 11325–11329, 1996.
- AKERMAN, S.; GOADSBY, P.J. Topiramate inhibits trigeminovascular activation: an intravital microscopy study. **Br J Pharmacol.**, v.146, n.1, p. 7-14, 2005a.
- ANDRES, K.H. Über die Feinstruktur der Arachnoidea und Dura mater von Mammalia. **Z Zellforsch**, n. 79, p. 272–295, 1967.
- ANDRES K.H., VON DÜRING, M. Interferenzphänomene am osmierten Präparat für die systematische elektronenmikroskopische Untersuchung. **Mikroskopie** 3: 139–149, 1974.
- ANDRES, K.H., VON DURING, M., MUSZYNSKI, K.; SCHMIDT, R.F. Nerve fibers and their terminals of the dura mater encephali of the rat. **Anatomy and Embryology** (Berl.), v. 175, p. 289-301, 1987.
- ARMAĞAN, A.; KUTLUHAN, S.; YILMAZ, M.; YILMAZ, N.; et al. Topiramate and Vitamin E Modulate Antioxidant Enzyme Activities, Nitric Oxide and Lipid Peroxidation Levels in Pentylenetetrazol-Induced Nephrotoxicity in Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 103(2), 166–170, 2008.
- ARNOLD, F. Dissert, departe cephalica nervi sympathici in homine. **Heidelberg**, 1826.
- ARTICO, M.; CAVALLOTTI, C. Catecholaminergic and acetylcholine esterase containing nerves of cranial and spinal dura mater in humans and rodents. **Microscopy Research and Technique**, n. 53, p. 212–20, 2001.
- ARZIMANOGLU, A.; et al. Safety and pharmacokinetic profile of rufinamide in pediatric patients aged less than 4 years with Lennox-Gastaut syndrome: an interim analysis from a multicenter, randomized, active-controlled, open-label study, **Eur. J. Paediatr. Neurol.**, n. 20, v. 3, p. 393–402, 2016.
- ASHINA, M.; BENDTSEN, L.; JENSEN, R.; SCHIFTER, S.; JANSEN-OLESEN, I.; OLESEN J. Plasma levels of calcitonin gene-related peptide in chronic tension-type headache. **Neurology**, n. 55, p. 1335- 1340, 2000.

- AVONA, A.; et al. Dural Calcitonin Gene-Related Peptide Produces Female- Specific Responses in Rodent Migraine Models. **The Journal of Neuroscience**, n. 39, v. 22, p. 4323– 4331, 2019.
- AURORA, S.K, BRIN, M.F. Chronic Migraine: An Update on Physiology, Imaging, and the Mechanism of Action of Two Available Pharmacologic Therapies. **Headache**, v. 57, n. 1, p. 109-125, 2017.
- BAGNATO, M.D.; GOOD, J. The Use of Antiepileptics in Migraine Prophylaxis. – Headache. **The Journal of Head and Face Pain**, p. 603 – 615, 2016.
- BALO, J. The dural venous sinuses. **Anat Rec**, n. 106, p. 319–324, 1950.
- BAUN, M.; PEDERSEN, M.H.; OLESEN, J.; JANSEN-OLESEN, I. Dural mast cell degranulation is a putative mechanism for headache induced by PACAP-38. **Cephalalgia**, n. 32, p. 337–345, 2012.
- BECERRA, L., BISHOP, J., BARMETTLER, G., KAINZ, V., BURSTEIN, R.; BORSOOK, D. Brain network alterations in the inflammatory soup animal model of migraine. **Brain Res**. 1660, 36–46, 2017.
- BELLAMY, J.; BOWEN, E. J.; RUSSO, A.; DURHAM, P.L. Nitric oxide regulation of calcitonin gene-related peptide gene expression in rat trigeminal ganglia neurons. **Eur J Neurosci**, n. 23, p. 2057-2066, 2006.
- BIGAL, M.E.; SHEFTELL, F.D.; RAPOPORT, A.M.; et al. Chronic daily headache: identification of factors associated with induction and transformation. **Headache**, n. 42, p. 575–581, 2002.
- BOES, T.; LEVY, D. Influence of sex, estrous cycle, and estrogen on intracranial dural mast cells. **Cephalalgia**, v. 32, n. 12, p. 924-931, 2012.
- BOGDANOV, V. B., MULTON, S., CHAUVEL, V., BOGDANOVA, O. V., PRODANOV, D., MAKARCHUK, M. Y., et al. Migraine preventive drugs differentially affect cortical spreading depression in rat. **Neurobiol. Dis**. 41, 430–435, 2011.
- BORAN, H. E.; BOLAY, H. Pathophysiology of migraine. **Arch Neuropsychiatry** 50, 1–7, 2013.
- BRAIN, S. D.; GRANT, A. D. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. **Physiological reviews**, v. 84, n. 3, p. 903–934, 2004.
- BRANDES, J. L.; SAPER, J.R.; DIAMOND, M.; et al. Topiramate for migraine prevention: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 291, n. 8, p. 965-973, 2004.
- BREDT, D.S. Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology. **Free Radic Res.**, n. 31, p. 577–596, 1999.
- BURGOS-VEGA, C., MOY, J., AND DUSSOR, G. Meningeal afferent signaling and the pathophysiology of migraine. **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci**. 131, 537–564, 2015.

BUZZI, M. G.; MOSKOWITZ, M. A. The pathophysiology of migraine: year 2005. **J. Headache Pain** 6, 105–111, 2005.

BUZZI, M.G.; MOSKOWITZ, M.A. Evidence for 5-HT_{1B/1D} receptors mediating the antimigraine effect of sumatriptan and dihydroergotamine. **Cephalalgia**, 11(4), 165-168, 1991.

CALABRESI, P.; GALLETTI, F.; ROSSI, C.; et al. Antiepileptic drugs in migraine: from clinical aspects to cellular mechanisms. **Trends Pharmacol Sci**, n. 28, p. 188-195, 2007.

CASUCCI, G.; VILLANI, V.; FREDIANI, F. Central mechanism of action of antimigraine prophylactic drugs. *Neurol Sci.*, n. 29, Suppl 1, p.123-126, 2008.

COHEN, Z.; BOVENTO, G.; LACOMBE, P.; et al. Cerebrovascular nerve fibers immunoreactive for tryptophan-5-hydroxylase in the rat: Distribution, putative origin and comparison with sympathetic noradrenergic nerves. **Brain Res**, 598: 203–214, 1992.

CRIVELLATO, E., BELTRAMI, C. A., MALLARDI, F., RIBATTI, D. The mast cell: an active participant or an innocent bystander? **Histol Histopathol**, 19(1), 259-270, 2004.

CRIVELLATO, E., & RIBATTI, D. The mast cell: an evolutionary perspective. **Biol Rev Camb Philos Soc**, 85(2), 347-360, 2010.

DAMASCENO, S. R.; SILVA, R.O., ARAGÃO KS, SOUZA MH, MEDEIROS JV, BARBOSA AL. Gabapentin, a synthetic analogue of gamma aminobutyric acid, reverses systemic acute inflammation and oxidative stress in mice. **Inflammation**, n. 37, p. 1826–1836, 2014.

DE BRITO, T. V.; JÚNIOR, G. J. D.; DA CRUZ JÚNIOR, J. S.; et al. Gabapentin attenuates intestinal inflammation: Role of PPAR-gamma receptor. **European Journal of Pharmacology**, 873, n. 172974, p. 1-13, 2020.

DVORAK, A. M.; SCHLEIMER, R.P.; LICHTENSTEIN, A. M. Morphologic Mast Cell Cycles. **Cellular Immunology**, n. 105, p. 199-204, 1987.

DIENER, H.C.; TFELT-HANSEN, P.; DAHLOF, C.; et al. Topiramate in migraine prophylaxis – results from a placebo-controlled trial with propranolol as an active control. **J. Neurol.**, n. 251, p. 943–950, 2004.

DIMLICH, R.V.; KELLER, J.T.; STRAUSS, T.A.; FRITTS, M.J. Linear arrays of homogeneous mast cells in the dura mater of the rat. **J Neurocytol.**, n. 20, p. 485–503, 1991.

DING, A.H.; NATHAN, C.F. STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **The Journal of Immunology**, v. 141, n. 7, suppl 1, p. 2407-2412, 1988.

DIMITRIADOU, V.; ROULEAU, A.; TRUNG TUONG, M.D.; et al. Functional relationships between sensory nerve fibers and mast cells of dura mater in normal and inflammatory conditions. **Neuroscience**, 77(3), 829–839, 1997.

DINES, K. C.; POWELL, H. C. Mast cell interactions with the nervous system: relationship to mechanisms of disease. **J Neuropathol Exp Neurol.**, n. 56, p. 627–640, 1997.

DURHAM, P.L. CGRP-receptor antagonists — a fresh approach to migraine therapy? **N Engl J Med.**, n. 350, p. 1073-1074, 2004.

DURHAM, P. L.; NIEMANN, C.; CADY, R. Repression of stimulated calcitonin gene-related peptide secretion by topiramate. **Headache**, n. 46, p. 1291–1295, 2006.

DURHAM, P. L. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and migraine. **Headache**, n. 46, Suppl. 1, p. S3–S8, 2006.

DURING, M.V.; ANDRES, K. H. Sensory nerve fiber terminals in the arachnoid granulations of non-human primates. **Neurosci Lett**, n. 127, p. 121–124, 1991.

EDVINSSON, L.; LINDE, M. New drugs in migraine treatment and prophylaxis: telcagepant and topiramate. **Lancet**, n. 376, v. 9741, p. 645–55, 2010.

EDVINSSON, L. Innervation of the cerebral circulation. **Ann NY Acad Sci**, 519: 334–348, 1987.

EDVINSSON, L., ROSENDAL-HELGESEN, S., UDDMAN, R. Substance P: Localization, concentration and release in cerebral arteries, choroid plexus and dura mater. **Cell and Tissue Research**, 234(1), 1-7, 1983.

EDVINSSON, L.; UDDMAN, R. Immunohistochemical localization and dilatory effect of substance P on human cerebral vessels. **Brain Research**, v. 232, p. 466-471, 1982.

EDVINSSON, L.; UDDMAN, R. Adrenergic, cholinergic and peptidergic nerve fibres in dura mater – involvement in headache? **Cephalalgia**, 1(4), 175-179, 1981.

ERDENER, S. E.; DALKARA, T. Modelling headache and migraine and its pharmacological manipulation. **Br. J. Pharmacol.** 171, 4575–4594, 2014

FEINDEL, W.; PENFIELD, W.; MCNAUGHTON, F. The tentorial nerves and localization of intracranial pain in man. **Neurology**, 10, 555-563, 1960.

FERRARI, A.; et al. Clinical pharmacology of topiramate in migraine prevention. **Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.**, n. 7, v. 9, p. 1169-1181, 2011.

FORSYTHE, P.; ENNIS, M. Clinical consequences of mast cell heterogeneity. **Inflamm. Res.** 49, 147–154, 2000.

FORSYTHE, P. Mast Cells in Neuroimmune Interactions. **Trends Neurosci**, v. 42, n. 1, p. 43-55, 2019.

FRICKE, B.; ANDRES, K.H.; VON DURING, M. Nerve fibers innervating the cranial and spinal meninges: morphology of nerve fiber terminals and their structural integration. **Microsc Res Tech** 53, (2): 96–105, 2001.

GALLI, S. J.; TSAI, M. IgE and mast cells in allergic disease. **Nat. Med.**, n. 18, p. 693–704, 2012.

GALLI S. J.; NAKAE, S.; TSAI, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. **Nat Immunol.**, n. 6, p. 135–142, 2005.

GARDOCKI, J. F.; LABINSKY, L.S.; BROWN, G. L.; MARYANOFF, B. E. Anticonvulsant activity of McN-4853 (M) (2,3:4,5-bis-O-L1-methylethylidenel-P-D-fructopyranose sulfamate in mice and rats. **Epilepsiu**, n. 27, p. 648-649, 1986.

GBD 2013. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, n. 386, p. 743–800, 2015.

GBD 2015. Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**, n. 388, p. 1545–1602, 2016.

GBD 2016. Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet**, n. 390, p. 1211–1259, 2017.

GEPPETTI, P., ROSSI, E., CHIARUGI, A., AND BENEMEI, S. Antidromic vasodilatation and the migraine mechanism. **J. Headache Pain** 13, 103–111, 2012.

GIAMBERARDINO, M. A.; et al. Calcitonin gene-related peptide receptor as a novel target for the management of people with episodic migraine: current evidence and safety profile of erenumab. **J Pain Res.**, n. 10, p. 2751-2760, 2017.

GIBBINS, I.L.; FURNESS, J.B.; COSTA, M.; et al. Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs. **Neurosci Lett.**, n. 57, p. 125-130, 1985.

GILFILLAN, A.M.; BEAVEN, M.A. Regulation of mast cell responses in health and disease. **Crit Rev Immunol**, v. 31, n. 6, p. 475– 529, 2011.

GOADSBY, P. J.; EDVINSSON, L. The trigeminovascular system and migraine: studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats. **Ann Neurol**, n. 33, p. 48–56, 1993.

GOADSBY, P. J.; EDVINSSON, L.; EKMAN, R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. **Ann Neurol.**, n. 28, p. 183-187, 2004.

GOADSBY, P.J. Recent advances in understanding migraine mechanisms, molecules and therapeutics. **Trends Mol. Med.**, n. 13, p. 39–44, 2007.

GOADSBY P. J; HOLLAND, PR, MARTINS-OLIVEIRA, M.; et al. Pathophysiology of migraine: A disorder of sensory processing. **Physiol Rev.**, n. 97, p. 553-622, 2017a.

GOADSBY, P. J., REUTER, U., HALLSTRÖM, Y., BROESSNER, G., BONNER, J. H., ZHANG, F., et al. A controlled trial of erenumab for episodic migraine. **N. Engl. J. Med.**, n. 377, p. 2123–2132, 2017b.

GOADSBY, P.J.; KNIGHT, Y.E.; HOSKIN, K.L.; et al. Stimulation of an intracranial trigeminally-innervated structure selectively increases cerebral blood flow. **Brain Research Reviews**, 751(2), 247-252, 1997.

GRAZIOTTIN, A.; SKAPER, S. D.; FUSCO, M. Mast cells in chronic inflammation, pelvic pain and depression in women. **Gynecol. Endocrinol.**, n. 30, p. 472–477, 2014.

GREENBERG, G.; BURNSTOCK, G. A novel cell-to-cell interaction between mast cells and other cell types. **Exp Cell Res.**, 147:1–13, 1983.

GROETZNER, P.; WEIDNER, C. The human vasodilator axon reflex – an exclusively peripheral phenomenon? **Pain**, n. 149, p. 71–75, 2010.

GUERRINI, R.; PARMEGGIANI, L. Topiramate and its clinical applications in epilepsy. **Expert Opin. Pharmacother.**, n. 7, v. 6, p. 811–823, 2006.

GUGLIELMO, R.; MARTINOTTI, G.; QUATRALE, M.; IOIME, L.; et al. Topiramate in alcohol use disorders: review and update. **CNS Drugs**, n. 29, v. 5, p. 383–395, 2015.

GULDIKEN, B.; DEMIR, M.; GULDIKEN, S.; et al. Asymmetric dimethylarginine and nitric oxide levels in migraine during the interictal period. **J Clin Neurosci.**, n. 16, p. 672–674, 2009.

GUPTA, K.; HARVIMA, I. T. Mast cell-neural interactions contribute to pain and itch. **Immunol Rev.**, n. 282, v. 1, p. 168–187, 2018.

GUPTA, S.; AMRUTKAR, D. V.; MATAJI, A. Evidence for CGRP re-uptake in rat dura mater encephali. **British Journal of Pharmacology**, n. 161, v. 8, p. 1885-1898, 2010.

HAIMART, M.; PRADALIER, A.; LAUNAY, J. M.; DREUX, C.; DRY, J. Whole blood and plasma histamine in common migraine. **Cephalalgia**, n. 7, p. 39–42, 1987.

HAINES, D.E. On the question of a subdural space. **The Anatomical Record**, n. 230, p. 3–21, 1991.

HAINES, D.E.; HARKEY, H.L.; AL-MEFTY, O. The “subdural” space: a new look at an outdated concept. **Neurosurgery**, 32, p. 111–120, 1993.

HAMMERSEN, F. Die Angioarchitektonik der Dura mater encephali. I. Zur Problematik der sogenannten Maander-Gefäße und Knauelarterien. **Z Zellforsch**, n. 59, p. 153–164, 1963.

HARGREAVES, R. New migraine and pain research. **Headache**, v. 47, n. 1, p. S26–S43, 2007.

HASSELBLATT, M.; KOHLER, J.; VOLLES, E.; EHRENREICH, H. Simultaneous monitoring of endothelin-1 and vasopressin plasma levels in migraine. **Neuroreport**. 1999; 10: 423–425

HEATLEY, R.V.; DENBURG, J. A.; BAYER, N.; BIENENSTOCK, J. Increased plasma histamine levels in migraine patients. **Clin. Allergy**., n. 12, p. 145–149, 1982.

HERRERO, A. I.; DEL OLMO, N.; GONZALEZ-ESCALADA, J. R.; et al. Two new actions of topiramate: inhibition of depolarizing GABA(A) mediated responses and activation of a potassium conductance. **Neuropharmacology**, n. 42, p. 210-220, 2002.

HUANG, P.; et al. Age-Dependent Anti-migraine Effects of Valproic Acid and Topiramate in Rats. **Front Pharmacol.**, v. 9, n. 1095, p. 1-9, 2018.

ICHD-3 beta. Headache Classification Committee of the International Headache Society. The international classification of headache disorders, 3rd edition (beta version). **Cephalalgia**, v. 33, n. 9, p. 629–808, 2013.

ICHD-3 beta. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. **Cephalalgia**, v. 38, n. 1, p. 1–211, 2018.

JOHANSON, C.E., DUNCAN, J.A., KLINGE, P.M.; et al. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: new challenges in health and disease. **Cerebrospinal Fluid Research**, 14, 5-10, 2008.

JOHNSON, K.W.; NELSON, D.L.; DIECKMAN, D.K.; et al. Neurogenic dural protein extravasation induced by meta-chlorophenylpiperazine (mCPP) involves nitric oxide and 5-HT_{2B} receptor activation. **Cephalalgia**, n. 23, p. 117–23, 2003.

JUANEDA, C.; DUMONT, Y.; QUIRION, R. The molecular pharmacology of CGRP and related peptide receptor subtypes. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, n. 11, p. 432–438, 2000.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. () Histologia básica: texto e atlas. 12. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2017.

KAMINSKI, R.M.; BANERJEE, M.; ROGAWSKI, M. A. Topiramate selectively protects against seizures induced by ATPA, a GluR5 kainate receptor agonist. **Neuropharmacology**, n. 46, p. 1097-1104, 2004.

KARAGKOUNI, A.; ALEVIZOS, M.; THEOHARIDES, T. C. Effect of stress on brain inflammation and multiple sclerosis. **Autoimmun. Rev.**, n. 12, p. 947–953, 2013.

KARATAS, H.; ERDENER, S.E.; GURSOY-OZDEMIR, Y.; et al. Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels. **Science**., n. 339, p. 1092-1095, 2013.

KELLER, J.T.; SAUNDERS, M.C. BEDUK, A.; JOLLIS, J.G. Innervation of the posterior fossa dura of the cat. **Brain Res Bull**, 14: 97–102, 1985.

KELLER, J.T.; MARFURT, C.F. Peptidergic and serotonergic innervation of the rat dura mater. **J Comp Neurol**, 309: 515–534, 1991.

KEMP, W.J., 3rd et al. The innervation of the cranial dura mater: neurosurgical case correlates and a review of the literature. **World Neurosurg.** 78, 505–510, 2012.

KEMPURAJ, D.; THANGAVEL, R.; FATTAL, R.; et al. Mast cells release chemokine CCL2 in response to Parkinsonian Toxin 1-Methyl-4-Phenyl-Pyridinium (MPP (+)). **Neurochem. Res.**, n. 41, p. 1042–1049, 2016a.

KEMPURAJ, D., THANGAVEL, R., NATTERU, P. A., SELVAKUMAR, G. P., SAEED, D., ZAHOR, H., et al. Neuroinflammation induces neurodegeneration. **J. Neurol. Neurosurg Spine**, n. 1, p. 1003, 2016b.

KERBER, C.W.; NEWTON, T.H. The macro- and microvasculature of the dura mater. **Neuroradiology**, n. 6, p. 175–179, 1973.

KHALIL, N. Y.; et al. Topiramate Comprehensive profile. **Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology**, v. 44, p. 333– 378, 2019.

KINACI, A.; BERGMANN, W.; BLEYS, R.L.; VAN DER ZWAN, A.; VAN DOORMAAL, T.P. Histologic Comparison of the Dura Mater among Species. **Comp Med.** Apr 1;70(2), p. 170-175, 2020.

KLEDE, M.; CLOUGH, G.; LISCHETZKI, G.; SCHMELZ, M. The effect of the nitric oxide synthase inhibitor N nitro- L-arginine-methyl ester on neuropeptide-induced vasodilation and protein extravasation in human skin. **J Vasc Res.**, n. 40, p. 105–14, 2003.

KLEIJ, H. P.; BIENENSTOCK, J. Significance of Conversation between Mast Cells and Nerves. **Allergy, asthma, and clinical immunology: official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology**, n. 1, v. 2, p. 65–80, 2005.

KRISHNASWAMY, G. et al. The human mast cell: an overview. **Methods Mol. Biol.** 315, 13–34, 2006.

KRITIKOU, E.; KUIPER, J.; KOVANEN, P. T.; BOT, I. The impact of mast cells on cardiovascular diseases. **Eur. J. Pharmacol.**, n. 778, p. 103–115, 2016.

KOLOTKIN, R. L.; GADDE, K. M.; PETERSON, C. A.; CROSBY, R. D. Health-related quality of life in two randomized controlled trials of phentermine/topiramate for obesity: what mediates improvement? **Qual. Life Res.**, n. 25, v. 5, p. 1237–1244, 2016.

KOTHARI, M.; GOEL, A. Maternalizing the meninges: a pregnant Arabic legacy. **Neurol India**, n. 54, p. 345–346, 2006.

KUNDER, C.A.; et al. Mast cell modulation of the vascular and lymphatic endothelium. **Blood**, v. 118, n. 20, p. 5383–5393, 2011.

LASSEN, L. H.; ASHINA, M.; CHRISTIANSEN, I.; ULRICH, V.; OLESEN, J. Nitric oxide synthase inhibition in migraine. **Lancet**, n. 349, p. 401– 402, 1997.

- LAI, T.H.; FUH, J.L.; WANG, S.J. Cranial autonomic symptoms in migraine: Characteristics and comparison with cluster headache. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, n. 80, p. 1116-1119, 2009.
- LAMBRU, G.; et al. Emerging drugs for migraine treatment: an update. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 23, n. 4, p. 1-18, 2018.
- LANG, J. Zur Vaskularisation der Dura mater cerebri. **Z Anat Entwickl Gesch**, n. 135, p. 20–34, 1971.
- LEÃO, A.A.P. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. **J Neurophysiol.**, n. 7, p. 359-390, 1944.
- LEE, S.H., SHIN, K.J., KOH, K.S., et al. (2017) Visualization of the tentorial innervation of human dura mater. *Journal of Anatomy*, 231(5), 683-689.
- LEVY, D, et al. Current understanding of meningeal and cerebral vascular function underlying migraine headache. *Cephalalgia*, v. 39, n.13, p. 1606–1622, 2019.
- LEVY, D. Endogenous mechanisms underlying the activation and sensitization of meningeal nociceptors: the role of immuno-vascular interactions and cortical spreading depression. **Curr Pain Headache Rep**, n. 16, p. 270–277, 2012.
- LEVY, D. Migraine pain and nociceptor activation – where do we stand? **Headache**, 50: 909–916, 2010.
- LEVY, D. Migraine Pain, Meningeal Inflammation, and Mast Cells. **Curr Pain Headache Rep**, v. 13, n. 3, p. 237-240, 2009.
- LEVY, D.; BURSTEIN, R.; KAINZ, V.; et al. Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache. **Pain**, n. 130, p. 166–176, 2007.
- LINDE, M.; MULLENERS, W. M.; CHRONICLE, E. P.; MCCRORY, D. C. Topiramate for the prophylaxis of episodic migraine in adults (Review). **The Cochrane Library**, v. 6, p. 1 – 113, 2013.
- LIPTON, R. B, BIGAL, M. E. Migraine: epidemiology, impact, and risk factors for progression. **Headache**, n. 45, Suppl 1, p. S3–S13, 2005.
- LUNDERIUS-ANDERSSON, C.; ENOKSSON, M., NILSSON, G. Mast cells respond to cell injury through the recognition of IL-33. **Front. Immunol.**, n. 3, p. 82, 2012.
- LV, X.; WU, Z.; LI, Y. Innervation of the Cerebral Dura Mater. **Neuroradiol J**, v. 27, n. 3, p. 293–298, 2014.
- MACIEL- JR, J. A. O uso de antiepilépticos na profilaxia da enxaqueca (migrânea). Por que só alguns? **Migrêneas cefaléias**, v. 9, n. 2, p. 50-54, 2006.
- MACGREGOR, E.A. Menstrual Migraine: Therapeutic Approaches. **Ther Adv Neurol Disord.**, n. 2, v. 5, p. 327–336, 2009.

MACK, J.; SQUIER, W.; EASTMAN, J.T. Anatomy and development of the meninges: implications for subdural collections and CSF circulation. **Pediatr Radiol** 39:200–210, 2009.

MAGGI, C. A. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. **Progress in Neurobiology**, v. 45, p. 1–98, 1995.

MALICK, A.; STRASSMAN, R.M.; BURSTEIN, R. Trigeminothalamic and reticulohypothalamic tract neurons in the upper cervical spinal cord and caudal medulla of the rat. **J Neurophysiol.**, n. 84, p. 2078–2112, 2000.

MARKOWITZ, S.; SAITO, K.; MOSKOWITZ, M.A. Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain. **J Neurosci**, n. 7, p. 4129–4136, 1987.

MARKOWITZ, S., SAITO, K., BUZZI, M. G., & MOSKOWITZ, M. A. The development of neurogenic plasma extravasation in the rat dura mater does not depend upon the degranulation of mast cells. **Brain Research**, 477(1-2), 157–165, 1989.

MARTINS, I. P. Enxaqueca Da Clínica para a Etiopatogenia. **Acta Médica Portuguesa**, v. 22, p. 589–598, 2009.

MARYANOFF, B. E.; NORTEY, S. O.; GARDOCKI, J. F.; SHANK, R. P.; DODGSON, S. P. Anticonvulsant 0-alkyl sulfamates: 2,3:4,5-bis-0-(1-methylethylidene)-P-fructopyranoses sulfamate and related compounds. **J Med Chem**, n. 30, p. 880–887, 1987.

MAYBERG, M.R.; ZERVAS, N.T.; MOSKOWITZ, M.A. Trigeminal projections to supratentorial pial and dural blood vessels in cats demonstrated by horseradish peroxidase histochemistry. **J Comp Neurol**, n. 223, p. 46–56, 1984.

MCLEARN, M. J.; BUKHARI, A. A.; WAMIL, A. W. Effects of topiramate on sodium-dependent action-potential firing by mouse spinal cord neurons in cell culture. **Epilepsia**, n. 41 (Suppl 1), p. 21–24, 2000.

MCLATCHIE, L.M.; FRASER, N.J.; MAIN, M.J.; et al. Ramps regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. **Nature**, n. 393, p. 333–339, 1998.

MCMENAMIN, P.G. Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations. **J Comp Neurol**, n. 405, p. 553–562, 1999.

MESSLINGER, K.; LENNERZ, J.K.; EBERHARDT, M.; FISCHER, M.J. CGRP and NO in the trigeminal system: mechanisms and role in headache generation. **Headache**, n. 52, p. 1411–1427, 2012.

MESSLINGER, K.; FISCHER, M.J.; LENNERZ, J.K. Neuropeptide effects in the trigeminal system: Pathophysiology and clinical relevance in migraine. **Keio J Med.**, n. 60, p. 82–89, 2011.

MESSLINGER, K.; DOSTROVSKY, J. O.; STRASSMAN, A. M. Anatomy and physiology of head pain. In: Olesen J, Goadsby PJ, Ramadan NB, Tfelt-Hansen P, Welch KMA (eds) *The headaches*, 3rd edn. Lippincott Williams & Wilkins, **Philadelphia**, p. 95–109, 2006.

MESSLINGER, K.; HANESCH, U.; BAUMGARTEL, M.; et al. Innervation of the dura mater encephali of cat and rat: Ultrastructure and calcitonin gene-related peptide-like and substance P-like immunoreactivity. **Anat Embryol (Berl)**, n. 188, p. 219–237, 1993.

METCALFE, D.D.; BARAM, D.; MEKORI, Y.A. Mast cells. *Physiol Rev*, v. 77, n. 4, p. 1033–1079, 1997.

MIYOSHI, H.; NAKAYA, Y. Calcitonin gene-related peptide activates the K⁺ channels of vascular smooth muscle cells via adenylate cyclase. **Basic Res Cardiol**, n. 90, p. 332–336, 1995.

MOON, T.C.; ST LAURENT, C.D.; MORRIS, K.E.; et al. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. **Mucosal Immunol.**, n. 3, p. 111–128, 2010.

MOORE, K. L. Anatomia orientada para a clínica. **Guanabara Koogan**, 7 ed., Rio de Janeiro, 2014.

MORETTI, R., CHHOR, V., BETTATI, D., BANINO, E., DE LUCIA, S., LE CHARPENTIER, T., et al. Contribution of mast cells to injury mechanisms in a mouse model of pediatric traumatic brain injury. **J. Neurosci. Res.**, n. 94, p. 1546–1560, 2016.

MOSKOWITZ, M.A.; REINHARD, J.F.JR.; ROMERO, J.; et al. Neurotransmitters and the fifth cranial nerve: Is there a relation to the headache phase of migraine? **The Lancet**, 2(8148), 883–885, 1979.

MULLENERS, W. M.; MCCRORY, D. C.; LINDE, V. Antiepileptics in migraine prophylaxis: an updated Cochrane review. **Cephalalgia**, n. 35, v. 1, p. 51–62, 2015.

NABESHIMA, S.; REESE, T.S.; LANDIS, D.M.; BRIGHTMAN, M.W. Junctions in the meninges and marginal glia. **J Comp Neurol**, 164:127–169, 1975.

NELISSEN, S.; et al. The role of mast cells in neuroinflammation. **Acta Neuropathol**, 125, p. 637–650, 2013.

NETTER, F. H. Atlas de Anatomia Humana. 5 ed. Rio de Janeiro, **Elsevier**, 2011.

O'CONNOR, T.; VAN DER KOOY, D. Pattern of intracranial and extracranial projections of trigeminal ganglion cells. **J Neurosci**, n. 6, p. 2200–2207, 1986.

O'CONNOR, T.P.; VAN DER KOOY, D. Enrichment of a vasoactive neuropeptide (calcitonin gene related peptide) in the trigeminal sensory projection to the intracranial arteries. **J Neurosci** 8: 2468–2476, 1988.

OLESEN, J. The role of nitric oxide (NO) in migraine, tension-type headache and cluster headache. **Pharmacol Ther.**, n. 120, p. 157–171, 2008.

O'RAHILLY, R.; MULLER, F. The meninges in human development. **J Neuropathol Exp Neurol** 45:588–608, 1986.

OTTOSSON, A.; EDVINSSON, L. Release of histamine from dural mast cells by substance P and calcitonin gene-related peptide. **Cephalalgia**, v. 17, n. 3, p. 166-174, 1997.

PANG, X.; COTREAU-BIBBO, M.M.; SANT, G.R.; et al. Bladder mast cell expression of high affinity estrogen receptors in patients with interstitial cystitis. **International Brazilian Journal of Urology**, n. 75, v. 2, p. 154-161, 1995.

PAPPAGALLO, M. Newer antiepileptic drugs: possible uses in the treatment of neuropathic pain and migraine. **Clin Ther**, n. 25, p. 2506 – 2538, 2003.

PARENT, A. Cerebral veins and venous sinuses. **Carpenter's Human Neuroanatomy**, 9th ed, Media, PA: Williams and Wilkins, p.120-128, 1996.

PARSEKYAN, D. Migraine prophylaxis in adult patients. **Western Journal of Medicine**, v. 173, p. 341-345, 2000.

PASTERNAK, M.; VOIPIO, J.; KAILA, K. Intracellular carbonic anhydrase activity and its role in GABA-induced acidosis in isolated rat hippocampal pyramidal neurons. **Acta Physiol Scand**, n. 148, p. 229-231, 1993.

PATEL, N.; KIRMI, O. Anatomy and imaging of the normal meninges. **Semin Ultrasound CT MRI** 30:559–564, 2009.

PEDERSEN, S.H.; RAMACHANDRAN, R.; AMRUTKAR, D.V. et al. Mechanisms of glyceryl trinitrate provoked mast cell degranulation. **Cephalalgia**, n. 35, p. 1287–1297, 2015.

PETERS, G.L. Migraine overview and summary of current and emerging treatment options. **Am. J. Manag. Care**, n. 25, p. S23–S34, 2019.

PIETROBON, D.; MOSKOWITZ, M.A. Pathophysiology of migraine. **Annu Rev Physiol.**, n. 75, p. 365–391, 2013.

PEROUTKA, S. J. Neurogenic inflammation and migraine: implications for the therapeutics. **Mol. Interv.** 5, 304–311, 2005.

RAMACHANDRAN, R. Neurogenic inflammation and its role in migraine. **Seminars in Immunopathology**, v. 40, n. 3, p. 301–314, 2018.

RAMACHANDRAN, R.; BHATT, D.K.; PLOUG, K.B.; et al. Nitric oxide synthase, calcitonin gene-related peptide and NK-1 receptor mechanisms are involved in GTN induced neuronal activation. **Cephalalgia**, n. 34, p. 136 – 147, 2014.

RIBATTI, D., & CRIVELLATO, E. The role of mast cell in tissue morphogenesis. Thymus, duodenum, and mammary gland as examples. **Exp Cell Res**, 341(1), 105-109, 2016.

RIBATTI, D., TAMMA, R., & VACCA, A. Mast Cells and Angiogenesis in Human Plasma Cell Malignancies. **Int J Mol Sci**, 20(3), 2019.

RIVERA, J.; FIERRO, N.A.; OLIVERA, A.; SUZUKI, R. New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE. **Adv Immunol**, n. 98, p. 85–120, 2008.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, G. M.; SORIA-CASTRO, R.; CAMPILLO-NAVARRO, M.; et al. The histone deacetylase inhibitor valproic acid attenuates phospholipase C γ 2 and IgE-mediated mast cell activation. **Journal of Leukocyte Biology**, p. 1-8, 2020.

ROLAND, J.; BERNARD, C.; BRACARD, S.; CZORNY, A.; FLOQUET, J.; RACE, J. M. Microvascularization of the intracranial dura mater. **Surg Radiol Anat**, n. 9, p. 43–49, 1987.

ROSAS, E. P.; COSTA, R. F.; PAZ, S. T.; SILVA, A.P. F.; FREITAS, M. F. L.; VALENÇA, M. M. Pharmacological mechanism of topiramate in the prophylaxis and treatment of migraine: a review. **Headache Medicine**, v.9, n.4, p.190-195, 2018.

ROSENFELD, M.G.; MERMOD, J.J.; AMARA, S.G.; et al. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. **Nature**, n. 304, p. 129–135, 1983.

ROZNIECKI, J. J.; DIMITRIADOU, V.; LAMBRACHT-HALL, M.; et al. Morphological and functional demonstration of rat dura mater mast cell-neuron interactions in vitro and in vivo. **Brain Research**, v. 849, p. 1–15, 1999.

RUA, R.; MCGAVERN, D.B. Advances in Meningeal Immunity. **Trends in Molecular Medicine**, v. 24, n. 6, 542-559, 2018.

SAMPAOLO, S.; LIGUORI, G.; VITTORIA, A.; et al. First study on the peptidergic innervation of the brain superior sagittal sinus in humans. **Neuropeptides**, 65, 45-55, 2017.

SANT, G. R.; KEMPURAJ, D.; MARCHAND, J. E.; THEOHARIDES, T. C. The mast cell in interstitial cystitis: role in pathophysiology and pathogenesis. **Urology**, n. 69, p. 34–40, 2007.

SARCHIELLI, P.; ALBERTI, A.; BALDI, A.; et al. Proinflammatory cytokines, adhesion molecules, and lymphocyte integrin expression in the internal jugular blood of migraine patients without aura assessed ictally. **Headache**, n. 46, p. 200–207, 2006.

SAYED, B. A.; WALKER, M. E.; BROWN, M. A. Cutting edge: mast cells regulate disease severity in a relapsing-remitting model of multiple sclerosis. **J. Immunol.**, n. 186, p. 3294–3298, 2011.

SHEFTELL, F.; RAPOPORT, A.; WEEKS, R.; et al. Montelukast in the prophylaxis of migraine: A potential role for leukotriene modifiers. **Headache**, n. 40, p.158–163, 2000.

SHANK, R. P.; GARDOCKI, J. F.; et al. An Overview of the Preclinical Aspects of Topiramate: Pharmacology, Pharmacokinetics, and Mechanism of Action. **Epilepsia**, n. 41(Suppl. I), p. S3-S9, 2000.

SHANK, R. P.; GARDOCKI, J. F.; VAUGHT, J. L.; et al. Topiramate: preclinical evaluation of a structurally novel anticonvulsant. **Epilepsia**, 35:450-60, 1994.

SHUKLA, V.; HAYMAN, L. A.; LY, C.; FULLER, G.; TABER, K. H. Adult cranial dura I: intrinsic vessels. **J Comput Assist Tomogr**, n. 26, p. 1069 – 1074, 2002.

SILBERSTEIN, S.D.; NETO, W.; SCHMITT, J.; JACOBS, D. Topiramate in migraine prevention: results of a large, controlled trial. **Arch. Neurol.**, n. 61, p. 490–495, 2004.

SILBERSTEIN, S.; SAPER, J.; BERENSON, F.; et al. Oxcarbazepine in migraine headache: a doubleblind, randomized, placebo-controlled study. **Neurology**, n. 70, v. 7, p. 548–55, 2008.

SILVERMAN, A.J.; SUTHERLAND, A.K.; WILHELM, M.; SILVER, R. Mast cells migrate from blood to brain. **J Neurosci**, v. 20, n. 1, p. 401–408, 2000.

SKAPER, S. D. Mast cell - glia dialogue in chronic pain and neuropathic pain: blood-brain barrier implications. **CNS Neurol. Disord. Drug Targets**, n. 15, p. 1072–1078, 2016.

SMITH, J.H.; BUTTERFIELD, J.H.; CUTRER, F.M. Primary headache syndromes in systemic mastocytosis. **Cephalalgia**, n. 31, p. 1522–1531, 2011.

SNELL, R.S. Clinical neuroanatomy. Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins, **Philadelphia**, 7ª edição, 2010.

SPANOS, C.; PANG, X.; LIGRIS, K.; LETOURNEAU, R.; ALFERES, L.; ALEXACOS, N.; THEOHARIDES, T. C. Stress-induced bladder mast cell activation: implications for interstitial cystitis. **J Urol.**, n. 157, p. 669–672, 1997.

SPRITZER, S.D.; BRAVO, T.P.; DRAZKOWSKI, J.F. Topiramate for Treatment in Patients with Migraine and Epilepsy. **Headache**, v. 56, n. 6, p. 1081-1085, 2011.

STANDRING, S. Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice, 40th edn. Churchill Livingstone, **Philadelphia**, 2008.

STEINER, T.J.; STOVNER, L.J.; VOS, T. GBD 2015: migraine is the third cause of disability in under 50s. **J Headache Pain**, n. 17: p. 104, 2016.

STOEHR, P.J. Die peripherischen Anteil des vegetativen Nervensystem. In: von Moellendorf W, editor. Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen. **Berlin: Springer Verlag**, p. 263–447, 1928.

STONE, K.D.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D.D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **J Allergy Clin Immunol**, v. 1252, Suppl 2, p. S73–S80, 2010.

STORER, R.J.; AKERMAN, S.; GOADSBY, P.J. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) modulates nociceptive trigeminovascular transmission in the cat. **Br. J. Pharmacol.**, n. 142, p. 1171–1181, 2004.

STOVNER, L.; HAGEN, K.; JENSEN, R; et al. The global burden of headache: a documentation of headache prevalence and disability worldwide. **Cephalalgia**, n. 27, p. 193-210, 2007.

STRASSMAN, A.M.; LEVY, D. Response properties of dural nociceptors in relation to headache. *J Neurophysiol*, 95: 1298–1306, 2006.

STRASSMAN, A.M., WEISSNER, W., WILLIAMS M., et al. Axon diameters and intradural trajectories of the dural innervation in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, 473(3), 364–376, 2004.

STRASSMAN, A. M.; RAYMOND, S.A.; BURSTEIN, R. Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. **Nature**, n. 384, p. 560–564, 1996.

SUPPES, T. Review of the use of topiramate for treatment of bipolar disorders, **J. Clin. Psychopharmacol.**, n. 22, v. 6, p. 599–609, 2002.

SUURMOND, J.; VAN DER VELDEN, D.; KUIPER, J.; BOT, I.; TOES, R. E. Mast cells in rheumatic disease. **Eur. J. Pharmacol.**, n. 778, p. 116–124, 2016.

SZABÓ, C. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. **Brain Res Bull.**, n. 41, p. 131–41, 1996.

TANI, E.; SENBA, E.; KOKUMAI, S. et al. Histamine application to the nasal mucosa induces release of calcitonin gene-related peptide and substance P from peripheral terminals of trigeminal ganglion: a morphological study in the guinea pig. **Neurosci Lett**, n. 112, p. 1–6, 1990.

TAYLOR, M. L.; METCALFE, D. D. Mast cells in allergy and host defense. **Allergy Asthma Proc.**, 22(3):115–119, 2001.

TEPPER, S.J. History and review of anti-calcitonin gene-related peptide (CGRP) therapies: From translational research to treatment. **Headache**, n. 58, Suppl. 3, p. 238–275, 2018.

THEOHARIDES, T. C.; STEWART, J. M.; PANAGIOTIDOU, S.; MELAMED, I. Mast cells, brain inflammation and autism. **Eur. J. Pharmacol.**, n. 778, p. 96–102, 2016.

THEOHARIDES, T. C.; ALYSANDRATOS, K. D.; ANGELIDOU, A.; et al. Mast cells and inflammation. **Biochim. Biophys. Acta**, n. 1822, p. 21–33, 2012a.

THEOHARIDES, T. C.; ZHANG, B.; KEMPURAJ, D.; et al. IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, n. 107, p. 4448–4453, 2010.

THEOHARIDES, T. C., ROZNIECKI, J. J., SAHAGIAN, G.; et al. Impact of stress and mast cells on brain metastases. **J. Neuroimmunol.**, n. 205, p. 1–7, 2008.

THEOHARIDES, T. C.; DONELAN, J.; KANDERE-GRZYBOWSKA, K.; KONSTANTINIDOU, A. The role of mast cells in migraine pathophysiology. **Brain Res. Rev.**, n. 49, p. 65–76, 2005.

THEOHARIDES, T. C.; SPANOS, C.; PANG, X.; et al. Stress-induced intracranial mast cell degranulation: a corticotropin-releasing hormone-mediated effect. **Endocrinology**, n. 136, p. 5745–5750, 1995.

TOKIGUCHI, S. et al. Fatin the dural sinus: CT and anatomical correlations. **Neuroradiology**, Germany, v. 30, n.1, p.78-80, 1998.

UNDEM, B. J.; RICCIO, M. M.; WEINREICH, D.; ELLIS, J. L.; MYERS, A. C. Neurophysiology of mast cell-nerve interactions in the airways. **Int Arch Allergy Immunol.**, n. 107, p. 199–201, 1995.

VAN ROSSUM, D.; HANISCH, U. K.; QUIRION, R. Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 5, p. 649–678, 1997.

VARATHAJ, A.; MACK, J.; DAVIDSON, J.R.; et al. Mast cells in the human dura: effects of age and dural bleeding. **Child's Nervous System**, 28(4), 541-545, 2012.

VLIAGOFTIS, H.; DIMITRIADOU, V.; BOUCHER, W.; et al. Estradiol augments while tamoxifen inhibits rat mast cell secretion. *International Archives of Allergy and Immunology*, 98(4), 398-409, 1992.

VUKMAN, K. V.; FÖRSÖNITS, A.; OSZVALD, Á.; et al. Mast cell secretome: Soluble and vesicular components. **Seminars in Cell & Developmental Biology.**, 67:65–73, 2017.

WAEBER, C.; MOSKOWITZ, M. A. Migraine as an inflammatory disorder. **Neurology**, 64, S9–S15, 2005.

WANG, X. et al. 5-HT₇ receptors are involved in neurogenic dural vasodilatation in an experimental model of migraine. **J. Mol. Neurosci.** 54, 164–170, 2014.

WENZEL, R. G.; SARVIS, C.A.; KRAUSE, M. L. Over-the-counter drugs for acute migraine attacks: literature review and recommendations. **Pharmacotherapy**, 23, 494–505, 2003.

WHITE, H. S. Molecular pharmacology of topiramate: managing seizures and preventing migraine. **Headache**, n. 45 (Suppl 1), p. 48-56, 2005.

WHITE, H. S.; BROWN, S. D.; WOODHEAD, J. H.; et al. Topiramate modulates GABA-evoked currents in murine cortical neurons by a nonbenzodiazepine mechanism. **Epilepsia**, n. 41 (Suppl 1), p. 17-20, 2000.

WIFFEN, P. J.; COLLINS, S.; MCQUAY, H. J.; CARROLL, D.; JADAD, A.; MOORE, R. A. Anticonvulsant drugs for acute and chronic pain. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 1, 2010.

WILHELM, M.; SILVER, R.; SILVERMAN, A. J. Central nervous system neurons acquire mast cell products via transgranulation. **Eur J Neurosci.**, n. 22, p. 2238–2248, 2005.

XU, H.; et al. Neurotransmitter and neuropeptide regulation of mast cell function: a systematic review. **Journal of Neuroinflammation**, n. 17, v. 356, p. 1-15, 2020.

YAN, L.; DONG, X.; XUE, L.; XU, H.; ZHOU, Z.; WAN, Q. Neurogenic dural inflammation induced by inflammatory soup combined with CGRP: a modified animal model of migraine. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 11, 9126–9134, 2018.

ZAGAMI, A.S.; GOADSBY, P.J.; EDVINSSON, L. Stimulation of the superior sagittal sinus in the cat causes release of vasoactive peptides. **Neuropeptides**, n. 16, p. 69–75, 1990.

ZHANG, X.; KAINZ, V.; ZHAO, J.; et al. Vascular extracellular signal-regulated kinase mediates migraine-related sensitization of meningeal nociceptors. **Ann Neurol**, n. 73, p. 741–750, 2013b.

ZHANG, X. C; LEVY, D.; KAINZ, V.; et al. Activation of central trigeminovascular neurons by cortical spreading depression. **Ann Neurol**, v. 69, n. 5, p. 855–65, 2011a.

ZHANG, X.C.; KAINZ, V.; BURSTEIN, R.; LEVY, D. Tumor necrosis factor- α induces sensitization of meningeal nociceptors mediated via local COX and p38 MAP kinase actions. **Pain**, n. 152, p. 140–149, 2011b.

ZHANG, X.; LEVY, D.; NOSEDA, R.; KAINZ, V.; JAKUBOWSKI, M.; BURSTEIN, R. Activation of meningeal nociceptors by cortical spreading depression: Implications for migraine with aura. **J Neurosci.**, n. 30, p. 8807-8814, 2010.

ZHANG, X.C.; LEVY, D. Modulation of meningeal nociceptors mechanosensitivity by peripheral proteinase-activated receptor-2: the role of mast cells. **Cephalalgia**, n. 28, p. 276–284, 2008.

ZHANG, X.C., STRASSMAN, A.M.; BURSTEIN, R.; LEVY, D (2007) Sensitization and activation of intracranial meningeal nociceptors by mast cell mediators. **J Pharmacol Exp Ther**, n. 322, p. 806–812, 2007.

ZHANG, X.; VELUMIAN, A. A.; JONES, O. T.; et al. Modulation of high-voltage-activated calcium channels in dentate granule cells by topiramate. **Epilepsia**, n. 41(Suppl 1), p. 52-60, 2000.

ZHAO, J.; LEVY, D. Modulation of intracranial meningeal nociceptor activity by cortical spreading depression: a reassessment. **J Neurophysiol**, n. 113, p. 2778–2785, 2015.

APÊNDICE A – REVISÃO DE LITERATURA

VIEW AND REVIEW

Mecanismos farmacológicos do topiramato na profilaxia e tratamento da enxaqueca: uma revisão

Pharmacological mechanism of topiramate in the prophylaxis and treatment of migraine: a review

Emanuella Paz Rosas¹, Raísa Ferreira Costa², Silvana Tavares Paz³, Ana Paula Fernandes da Silva¹,
Manuela Fráguas Lyra de Freitas⁴, Marcelo Moraes Valença^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Laboratório de Imunopatologia Kaizo Asami (LIKA),
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil

²Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, UFPE, Brasil

³Programa de Pós-graduação em Saúde Translacional, UFPE, Brasil

⁴Departamento de Anatomia, UFPE, Brasil

Rosas EP, Costa RF, Paz ST, Silva APF, Freitas MFL, Valença MM. Mecanismos farmacológicos do topiramato na profilaxia e tratamento da enxaqueca: uma revisão. *Headache Medicine*. 2018; 9(4): 190-95

RESUMO

Objetivo: Esta revisão buscou trazer evidências de estudos que abordam os mecanismos de ação do topiramato na prevenção e tratamento da enxaqueca. **Introdução:** A enxaqueca é um distúrbio neurovascular que acomete grande parte da população mundial. O uso de profiláticas contribui para a diminuição da frequência e gravidade desta doença. Dentre as fármacos neuromoduladores utilizados, o topiramato vem se mostrando como um dos mais eficazes para o tratamento preventivo de enxaqueca. Apesar dos mecanismos de ação desta droga ainda não estarem bem elucidados na literatura, existem diversos mecanismos moleculares propostos. **Metodologia:** Foi realizada um levantamento na literatura, no período de fevereiro a março de 2018, em diferentes bases de dados, utilizando as seguintes palavras: topiramato, enxaqueca e mecanismos de ação. Após uma seleção criteriosa, 25 artigos foram selecionados para esta revisão. **Resultados:** Estudos apontaram que os principais mecanismos de ação os quais o topiramato atua está relacionada a uma modulação dos canais iônicos de sódio e cálcio voltagem-dependentes, bloqueio da transmissão excitatória da glutamato e inibição através dos receptores Ácido gama-aminobutírico (GABA), AMPA/kainato e de algumas isoenzimas da anidrase carbônica. Além disso, o topiramato está envolvido na supressão da depressão alastrante cortical, na influência da atividade trigemino-vascular e na excitabilidade neuronal. **Conclusão:** Sendo assim, o topiramato poderia estar envolvido na prevenção dos principais eventos da fisiopatologia da enxaqueca. Atuando diretamente na depressão alastrante cortical (DAC), na sinalização trigemino-vascular e na diminuição da sensibilização central da dor da enxaqueca.

Palavras-chave: Topiramato; transtornos de enxaqueca; farmacologia

ABSTRACT

Objective: This review sought to bring evidence of studies addressing the mechanisms of action of topiramate in the prevention and treatment of migraine. **Background:** Migraine is a neurovascular disorder that affects a large part of the world population. The use of prophylactics contributes to the decrease in the frequency and severity of this disease. Among the antiepileptic drugs, the topiramate, has proven to be the most effective for the treatment of migraine. Although the mechanism of action of this drug is still not well elucidated in the literature, there are several molecular mechanisms proposed. **Methodology:** A survey was carried out in the literature, from February to March 2018, in different databases, using the descriptors: topiramate, migraine and mechanisms of action. After a careful selection, 25 manuscripts were chosen for this review. **Results:** Evidence from a number of studies has indicated that the main mechanisms of action of topiramate are related to the modulation of voltage-dependent sodium and calcium ion channels, blockade of excitatory glutamate transmission and inhibition by gamma-aminobutyric acid receptors (GABA), AMPA/kainate and some isoenzymes of carbonic anhydrase. In addition, topiramate is involved in the suppression of cortical spreading depression, besides influencing trigemino-vascular activity, and neuronal excitability. **Conclusion:** Thus, topiramate could be involved in the prevention of major events of the pathophysiology of migraine. Acting directly on cortical spreading depression (DAC), trigemino-vascular signals and decreased central sensitization of migraine pain.

Keywords: Topiramate; Migraine disorders; Pharmacology

INTRODUÇÃO

A enxaqueca é um distúrbio neurológico de natureza multifatorial e de caráter hereditário, que ocorre em todos os indivíduos em algum momento da vida, independente da faixa etária e gênero.⁽¹⁾ Tem sido considerada mais prevalente no sexo feminino, devido principalmente ao ciclo hormonal.⁽²⁾

Episódios de enxaqueca ocorrem em torno de 50% da população ao longo do ano e em geral 90% das pessoas relatam ao menos um episódio durante a vida.⁽³⁾ Devido a constância, este distúrbio é considerado atualmente como a sexta doença mais incapacitante do mundo, por afetar a qualidade de vida e a capacidade funcional, além de trazer prejuízos socioeconômicos.⁽⁴⁾

A etiologia da enxaqueca ainda não está bem evidenciada na literatura científica. Estudos vêm propondo que haja o envolvimento de alguns eventos na patogênese da enxaqueca, sendo estes: (1) depressão alastrante cortical (DAC), (2) ativação do sistema trigeminovascular (nociceptores duralis) e, de alguma forma, (3) sensibilização periférica e central desta via da dor,⁽⁵⁾ que pode ser desencadeada por uma multiplicidade de fatores que contribuem para um aumento da hiperexcitabilidade neuronal. Além disso, a dor ligada à enxaqueca pode ser resultante de uma ativação repetida e inadequada de neurônios nociceptivos dentro do nervo trigeminal, que posteriormente, induz a liberação de neuropeptídeos e um processo inflamatório estável.⁽⁶⁾

A profilaxia na enxaqueca tem sido um método bastante utilizado para reduzir a frequência, a gravidade e as deficiências associadas à esta doença.⁽⁷⁾ Várias medicações são empregadas na prevenção da enxaqueca, incluindo fármacos da classe dos antiepilépticos, dos β -bloqueadores, dos bloqueadores dos canais de cálcio, e dos antidepressivos tricíclicos.^(8,9)

A classe dos antiepilépticos tem sido largamente utilizada para prevenção deste distúrbio, e dentre eles o topiramato (TPM) é um dos mais conhecidos, possuindo um amplo espectro de mecanismos de ação.⁽¹⁰⁻¹²⁾

Estudos vêm provando cada vez mais sua eficácia na enxaqueca com uma redução média de 72% na frequência de dor de cabeça e de 55% na gravidade.⁽¹³⁾ No entanto, os mecanismos de ação desta droga ainda não estão bem esclarecidos. Portanto, o objetivo desta revisão é trazer evidências de estudos que abordam os mecanismos de ação do TPM no tratamento da enxaqueca.

MÉTODO

A presente revisão foi realizada no período de fevereiro a março de 2018. Foram avaliados artigos de diferentes delineamentos disponíveis nas bases de dados Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Scientific Electronic Library Online (SciELO), Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), U.S. National Library of Medicine and the National Institutes Health (PubMed) e Web of Science.

Como estratégia de busca foram utilizadas as seguintes termos livres: "Topiramato" e "Mecanismos de Ação" e "Enxaqueca" e seus equivalentes em inglês ("Topiramate" and "Action Mechanism" and "Migraine") selecionadas mediante consulta ao Medical Subject Headings (MeSH). Apenas os manuscritos que descrevessem os mecanismos de ação do topiramato na profilaxia da migração foram incluídos.

O processo de seleção desta revisão da literatura ocorreu em três etapas. Na primeira foi realizada a leitura dos títulos e resumos dos artigos encontrados. Posteriormente, procedeu-se com a leitura dos artigos e, por último, foram identificados artigos a partir da lista de referências destes manuscritos. Além disso, artigos que não apresentassem mecanismos de ação que não fossem do topiramato ou de doenças que não fossem enxaqueca, e os artigos presentes em mais de uma das bases de dados foram excluídos. Do total de 80 artigos encontrados, 25 foram selecionados para esta revisão.

OS MECANISMOS DE AÇÃO DO TOPIRAMATO NA PROFILAXIA E TRATAMENTO DA MIGRAÇÃO

O topiramato é um derivado do monossacarídeo D-frutose natural, que vem sendo usado não só como uma droga antiepiléptica, mas também como um método preventivo em doenças não epilépticas como a enxaqueca.⁽¹⁰⁻¹²⁾ Devido à semelhança fisiopatológica entre epilepsia e enxaqueca, mecanismos farmacológicos têm sido propostos em ambas as doenças tais como: a modulação dos canais iônicos de sódio dependentes de voltagem^(14,15) e dos canais iônicos de cálcio (Ca^{2+}) dependentes de voltagem^(16,17,20,21-22) e do tipo L,^(15,17,24,26) o bloqueio da transmissão do glutamato excitatório e inibição de algumas isoenzimas II e IV da anidrase carbônica.^(14,16,18,22,24) Estes mecanismos podem influenciar o estado excitatório das células por influenciar os complexos proteicos receptores/canal, induzindo alterações nos seus estados de fosforilação. Tais atuações são conhecidos por influenciar a atividade trigeminovascular.⁽¹⁴⁾

Tabela 1. Resumo dos principais mecanismos de ação do topiramato na enxaqueca

Mecanismos de ação do topiramato na enxaqueca	Referências
Modulação dos canais iônicos de sódio (Na ⁺) dependentes de voltagem	14-24
Modulação dos canais iônicos de Ca ²⁺ dependentes de voltagem	14, 17, 19, 20, 22-25
Inibição de isoenzimas II e IV da anidrase carbônica	14-16, 18, 19, 22, 26
Modulação da sinalização nociceptiva através dos receptores GABA _A	26-28
Modificação da neurotransmissão excitatória através dos receptores de glutamato AMPA/kainato	15, 17, 21, 29
Supressão da depressão alastrante cortical	37, 38, 39
Bloqueio da ativação de neurônios trigeminais	22, 23

Ca²⁺ - cálcio; GABA_A - ácido gama-aminobutírico; AMPA - Ácido-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolopropiônico; DAC - Depressão Alastrante Cortical.

A redução do disparo neuronal no complexo trigeminocortical mediado pelo ácido gama-aminobutírico (GABA) também é um dos mecanismos do topiramato. Por meio dos receptores GABA, o TPM eleva o fluxo de dorso.^(17,21) Em humanos saudáveis, o TPM aumenta os níveis de GABA no cérebro e de forma indireta, intensifica a transmissão mediada pelo GABA.^(1+17,21,22) Além disso, este fármaco pode ter mecanismos de ação complementares como o de interromper o ciclo fisiopatológico da enxaqueca por inibir a sinalização glutamatérgica pelos nervos aferentes do trigêmeo e pela modulação da sinalização nociceptiva através dos receptores GABA_A no núcleo caudal do trigêmeo ou nas vias descendentes do tronco encefálico.⁽²⁴⁻²⁶⁾

Outro efeito observado pelo TPM é sua ação inibitória na excitabilidade dos córtices motor e visual. Com esta ação, o TPM pode impedir o desenvolvimento de DAC reduzindo a transmissão nociceptiva e, na maioria das vezes, inibindo a hiperexcitabilidade neuronal.⁽¹⁴⁾

Entre as outras drogas antiepilépticas (AEDs) que são utilizadas no tratamento da enxaqueca, o TPM é a única droga que possui a capacidade de modificar a neurotransmissão excitatória através dos receptores de glutamato Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolopropiônico (AMPA) subtipo kainato.^(15,17,21,24) Anderson e Goadsby⁽²⁴⁾ avaliaram os efeitos do TPM na ativação trigeminovascular em neurônios de segunda ou terceira ordem do complexo trigeminocortical (TCC) e do núcleo talâmico ventroposteromedial (VPM), bem como sua ação nos receptores de glutamato ionotrópico ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), e AMPA/kainato dentro desses núcleos. Observou-se que nas duas vias houve uma inibição significativa da ativa-

ção trigeminovascular no TCC e VPM. Em ambas as núcleos, a aplicação do TPM diminuiu significativamente a ação induzida pela ativação do receptor kainato, propondo assim que o TPM pode modular a transmissão nociceptiva trigeminovascular na via trigeminotalâmica, e que uma das vias de ação deste fármaco tanto no núcleo do TCC quanto no VPM é o receptor AMPA/kainato.⁽²⁴⁾

A substância cinzenta periaquedutal (PAG) tem sido apontada como relevante na modulação da nocicepção craniovascular e está envolvida no sistema que modula a dor descendente, participando na fisiopatologia da enxaqueca.^(26,28) Os canais de Ca²⁺ em neurônios da PAG modulam a nocicepção trigeminal e sua atividade disfuncional tem certa influência na enxaqueca.⁽²⁶⁾ A ativação de artérias trigeminovasculares das meninges, que ocorre na crise de dor na enxaqueca, e evidências substanciais apontam que o sistema trigeminovascular é também ativado por depressão alastrante cortical, e que é resultante da hiperexcitabilidade neocortical. A alteração na atividade dos canais de Ca²⁺ nos neurônios corticais e da PAG pode representar um alvo para a prevenção da enxaqueca.⁽²²⁾ Matella et al.⁽²⁴⁾ demonstraram em seu estudo que o TPM agiu no bloqueio de canais de Ca²⁺ ativados por alta voltagem, de forma mais potente e eficaz, em neurônios da PAG do que em células piramidais corticais. Essa diferença foi observada porque o TPM inibiu canais do tipo N, P e L da PAG, enquanto que nos neurônios corticais esse fármaco modulou apenas canais do tipo P e L. Esse bloqueio de subtipos específicos de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem pode restaurar a atividade elétrica normal do córtex e o PAG, e assim pode ser uma das abordagens terapêuticas deste fármaco na prevenção da enxaqueca.⁽²⁴⁾

Em um estudo prospectivo, randomizado e duplo-cego realizado por Hebster et al.⁽²⁵⁾ observou-se que TPM diminuiu significativamente a atividade no tálamo e em outras áreas de processamento da dor, bem como foi visto que o TPM aumentou a conectividade funcional entre o tálamo e várias regiões cerebrais, tais como o pré-cuneus bilateral, o córtex cingulado posterior e o córtex somatossensorial secundário. Sugere-se assim, que o TPM tem como alvo um sistema, em vez de uma estrutura única, e exerce efeitos modulatórios no processamento nociceptivo em redes tálamo-corticais durante a dor do trigêmeo.⁽²⁵⁾

Ayata et al.⁽²⁴⁾ avaliaram o TPM na supressão da DAC através da estimulação elétrica e aplicação com cloreto de potássio (KCl) nos hemisférios direito de ratos. Os efeitos dessa droga foram dependentes da dose: 60 e 80 mg/kg/dia reduziram o número de DACs em 30% e 50%, respec-

tramento. Além disso, foi visto que com uma semana de tratamento (80 mg/kg/dia) não foi suficiente para reduzir o número de depressão alastrante, contudo tratamentos mais longos suprimiram. Porém, o TPM reduziu significativamente a velocidade de propagação de DAC após teste agudo de uma única injeção. Esses dados fornecem fortes evidências experimentais que a DAC está implicada na fisiopatologia da enxaqueca, e que o tratamento sistêmico crônico com drogas profiláticas como TPM suprimem a DAC como uma de suas ações farmacológicas.⁽²⁴⁾

No estudo de Wiedemann et al.,⁽²⁴⁾ o TPM foi utilizado para investigar se havia inibição de DAC através de parâmetros da excitabilidade neuronal, tais como a velocidade de espalhamento, latência e distúrbios de gradientes iônicos em ratinas de frangos. O TPM não apresentou efeito sobre a latência entre o estímulo e o início da onda, mas reduziu a velocidade de propagação. Isto pode estar relacionado ao seu efeito inibidor nos receptores AMPA. Portanto, a redução da frequência da DAC pode ser uma via de mecanismo que o TPM atua na prevenção do início da enxaqueca, pois a mesma está diretamente associada a liberação de moléculas durante a propagação de ondas da DAC.⁽²⁴⁾

Em um estudo prospectivo realizado por Akerman e Goadsby⁽²³⁾ utilizaram-se 17 ratos e 13 gatos para observar o efeito do topiramato (10 e 30 mg/kg) na depressão alastrante cortical. No rato, o topiramato (10 mg/kg) não afetou a velocidade de propagação, embora tenha atrasado o início da resposta hiperêmica. No gato, a mesma concentração foi incapaz de impedir a ocorrência de depressão alastrante ou retardar o início da resposta hiperêmica. Em ambos, o topiramato (30 mg/kg) foi capaz de bloquear as alterações no fluxo sanguíneo cerebral e pico cortical das células na depressão alastrante, porém dos 13 gatos apenas oito responderam. Sendo assim, é observado que o topiramato pode agir por mecanismos relacionados à iniciação e propagação da depressão alastrante.⁽²³⁾

Medicamentos que impedem a produção de citocinas ou bloqueiam a liberação de peptídeos vasoativos a partir das terminações vasculares do trigêmeo podem ser úteis no tratamento de enxaqueca.⁽²⁴⁾ A interleucina-6 (IL-6) é uma das quimiocinas responsável por estimular a ativação dos nervos trigêmeos e liberação de peptídeos vasoativos, resultando em inflamação. Em um estudo, realizou-se a medição dos níveis séricos de IL-6 em pacientes com enxaqueca crônica, alguns utilizando o TPM como tratamento preventivo e outros não. Com isso, foi visto que este fármaco não atua em mecanismos da concentração sérica de IL-6 em pacientes com enxaqueca crônica, per-

manecendo sem alterações como os que não utilizaram o tratamento.⁽²⁴⁾

No estudo de Akerman e Goadsby,⁽⁴³⁾ foi avaliado o efeito do TPM na vasodilatação neurogênica dual induzida pelo peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), óxido nítrico (NO) e estimulação elétrica. O TPM foi capaz de inibir a vasodilatação neurogênica dual na estimulação elétrica apenas na maior dosagem e foi capaz de inibir a dilatação dos vasos sanguíneos duais induzida por NO em todas as doses. A dilatação dos vasos sanguíneos induzida por CGRP não foi alterada com o pré-tratamento com TPM em nenhuma das doses que foram usadas. O TPM, portanto, inibe a vasodilatação neurogênica dual influenciando o estado excitatório das células, e, desse modo, impede a liberação de neurotransmissores.⁽⁴³⁾

O estudo de Storer e Goadsby⁽⁴¹⁾ demonstrou que a aplicação local de TPM na sinapse de neurônios de segunda ordem do sistema trigeminovascular de gatos causava uma inibição significativa do disparo de neurônios induzidos por L-glutamato apenas nas maiores correntes microiontoforéticas. Contudo, neste estudo,⁽⁴¹⁾ também foi visto que o TPM, quando administrado sistemicamente, inibia parcialmente este disparo. Posteriormente a administração sistêmica, foi notada uma inibição profunda da ativação de células evocadas pelo L-glutamato no complexo trigeminocervical na sinapse de segunda ordem do sistema trigeminovascular E, com isso, sugere-se que o topiramato pode atuar fora do complexo trigeminocervical, em espécies como o gato.⁽⁴¹⁾

Em seu estudo, Karadas et al.⁽⁴²⁾ avaliaram a eficácia do TPM na atividade vasomotora (VMR) da artéria cerebral média (ACM) (direita e esquerda), e da artéria cerebral posterior (PCA), e o fluxo sanguíneo cerebral antes e após tratamento em pacientes de enxaqueca com aura. Houve também neste mesmo estudo o grupo controle (pessoas sem aura) que foi submetido à medida da VMR com a mesma técnica e usando as mesmas artérias. As velocidades de fluxo obtidas a partir da ACM direita e esquerda e os valores de VMR no grupo tratado com TPM não diferiram daqueles do grupo controle. Desta forma, o TPM mostrou-se um profilático eficaz em pacientes com enxaqueca com aura exercendo um importante papel na regulação do controle autonômico cerebrovascular.⁽⁴²⁾

Esse medicamento anticonvulsante pode bloquear a ativação de neurônios trigeminais.^(23,25) Observou-se no estudo de Storer e Goadsby⁽⁴¹⁾ o efeito do topiramato na ativação trigeminocervical através da estimulação do seio sagital superior (SSS), que resultou em uma inibição dose-dependente na ativação neuronal do SSS com quima

máxima reduzida na dose 50 mg/kg aos 60 minutos e evocou atividade de c-Fos e fluxo sanguíneo do núcleo trigeminocervical. Além disso, o TPM teve um efeito quase máximo em trinta minutos na dose de 5 mg/kg. Essa estimulação do seio sagital superior na presença de topiramato não indica necessariamente uma ação no complexo trigemino-cervical, mas demonstra regiões importantes no mesencéfalo e ponte a ser ativada em ambas as crises episódicas e crônicas. O topiramato pode, portanto, bloquear a ativação de neurônios em um local distante do complexo trigeminocervical.⁽⁶⁾

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do levantamento bibliográfico realizado nesta revisão, estudos sugerem que o topiramato pode atuar em neurônios dentro do sistema trigeminovascular ou secundariamente em um local distante como no tálamo-córtex. Sua ação, além de inibir o disparo excitatório dos neurônios, bloqueando os canais de Na^+ e Ca^{2+} , diminui a liberação de neurotransmissores e peptídeos vasoativos que ajudam na ativação e sensibilização dos neurônios aferentes pirâmicos e centrais da dor de enxaqueca. Além disso, a supressão da DAC e a inibição de algumas isoenzimas de anidrase carbônica, de receptores GABA_A e AMPA/kainato são vias pelas quais o topiramato tem prevenido e tratado a enxaqueca.

Agradecimentos

À CAPES e FACEPE, pelo apoio financeiro dado a este projeto de pesquisa, sem o qual esta pesquisa não poderia ter sido desenvolvida.

REFERÊNCIAS

- Souza NE, Columby ML, Alonzo EO, Nogueira T2S, Pereira ABCNG. Cefaleia: migração e qualidade de vida. *Revista de Saúde*. 2015;06(2):23-26.
- Boss T, Levy D. Influence of sex, estrous cycle and estrogen on intracranial dural mast cells. *Cephalalgia*. 2012;32(12):924-31.
- International Association for the Study of Pain - IASP [Internet]. Epidemiologia da Cefaleia. Outubro 2012. [acesso em 10 fev/2018]. Disponível em: www.iasp-pain.org/files/Content/ContentFolders/GlobalYearAgainstPain2/HeadacheFactSheet/1-Epidemiology_Portuguese.pdf
- Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015;386(9995):743-800.
- Kojic Z, Stojanovic D. Pathophysiology of migraine - From molecular to personalized medicine. *Med Pregl*. 2013;66(1-2):53-7.
- Kon E, Haan J, Ferrari M. Migraine genetics. *Curr Pain Headache Rep*. 2003;7(3):212-7.
- Koca H, Atalay S. Effects of topiramate on neurophysiological and neuropsychological tests in migraine patients. *J Clin Neurosci*. 2009;16(12):1588-91.
- Rizoli P. Preventive pharmacotherapy in migraine. *Headache*. 2014;54(5):364-9.
- Goodby PJ. Therapeutic prospects for migraine: can paradise be regained? *Ann Neurol*. 2013;74(3):423-34.
- Brandes JJ, Saper JR, Diamond M, Couch JR, Lewis DW, Schmitt J, et al; MIGR-002 Study Group. Topiramate for migraine prevention: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2004;291(8):965-73.
- Dwyer HC, Tiele-Hansen E, DeHoff C, Láinez MJ, Sandrini G, Wang SJ, et al; MIGR-003 Study Group. Topiramate in migraine prophylaxis: results from placebo-controlled trial with propranolol as an active control. *J Neurol*. 2004; 251(8):943-50.
- Silberstein SD, Natta W, Schmitt J, Jacobs D; MIGR-001 Study Group. Topiramate in migraine prevention: results of a large controlled trial. *Arch Neurol*. 2004;61(4):490-5.
- Kruer JC, Scott V. Topiramate in the treatment of chronic migraine and other headaches [abstract]. *Headache*. 1999;39:363.
- Aurora SK, Brin MF. Chronic Migraine: An Update on Pathology, Imaging, and the Mechanism of Action of Two Available Pharmacologic Therapies. *Headache*. 2017;57(1):109-25.
- Spritzer SD, Bravo TP, Draskovaki JF. Topiramate for Treatment in Patients with Migraine and Epilepsy. *Headache*. 2016;56(6):1081-5.
- Bagnato F, Good J. The Use of Antiepileptics in Migraine Prophylaxis. *Headache*. 2016;56(3):603-15.
- Cutler FM. Antiepileptic drugs: how they work in headache. *Headache*. 2001;41 Suppl 1:S3-10.
- Hoffmann J, Charles A. Glutamate and Its Receptors as Therapeutic Targets for Migraine. *Neurotherapeutics*. 2018;15(2):361-70.
- Marmura ML. Safety of topiramate for treating migraine. *Expert Opin Drug Saf*. 2014;13(9):1241-7.
- Riva L, Ferrari D. Topiramate in migraine progression. *J J Headache Pain*. 2009;10(6):419-22.
- Galletti F, Cupini LM, Corbelli I, Calabrese P, Sarchielli P. Pathophysiological basis of migraine prophylaxis. *Prog Neurobiol*. 2009;89(2):176-92.
- de Tommaso M, Sordano M, Vecchio E, Serpino C, Stasi M, Ranieri M. Central sensitization phenomena in primary headaches: overview of a preventive therapeutic approach. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2008;7(6):524-35.
- de Tommaso M. Effects of antiepileptic drugs on neurophysiological abnormalities underlying migraine. *Drug Development Research*. 68(6):369-75.
- Ayala C, Jin H, Kudo C, Dalkara T, Markowitz MA. Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis. *Ann Neurol*. 2006;59(4):652-61.
- Johannessen Landmark C. Antiepileptic drugs in non-epilepsy disorders: relations between mechanisms of action and clinical efficacy. *CNS Drugs*. 2008;22(1):27-47.

26. Cosucci G, Villani V, Frediani F. Central mechanism of action of antimigraine prophylactic drugs. *Neural Sci.* 2008;29 Suppl 1, p.123-6.
27. Corbo J. The role of anticonvulsants in preventive migraine therapy. *Curr Pain Headache Rep.* 2003 Feb;7(1): 63-6.
28. Silberstein SD. Preventive treatment of Migraine. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2006;27(8):410-415.
29. Andreou AP, Goadsby PJ. Topiramate in the treatment of migraine: a kainate (glutamate) receptor antagonist within the trigeminothalamic pathway. *Cephalalgia.* 2011 Oct; 31(13): 1343-58.
30. Moskowitz MA. The neurobiology of vascular head pain. *Ann Neurol.* 1984;16(2):157-68.
31. Goadsby PJ, Edvinsson L. The trigeminovascular system and migraine: studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats. *Ann Neurol* 1993;33(1):48-56.
32. Welch KM, Nagash V, Aurora SK, Gelman N. Periaqueductal gray matter dysfunction in migraine: cause or the burden of illness? *Headache.* 2001;41(7):629-37.
33. Calabresi P, Galletti F, Rasi C, Sarchielli P, Cupini LM. Antiepileptic drugs in migraine: from clinical aspects to cellular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28: 188- 95.
34. Martella G, Costa C, Paoletti A, Cupini LM, Bernardi G & Calabresi P. Antiepileptic drugs on calcium currents recorded from cortical and PAG neurons: therapeutic implications for migraine. *Cephalalgia* 2008; 28:1315-1326.
35. Hebestreit JM, May A. Topiramate modulates trigeminal pain processing in thalamo-cortical networks in humans after single dose administration. *PLoS ONE* 2017; 12(10): e0184406.
36. Wiedemann M, Lyha B, Batella JP, Sieber M. The pharmacological control of neuronal excitability in the retinal spreading depression model of migraine. *Curr Med Chem.* 2012;19(2): 298-302.
37. Akerman S, Goadsby PJ. Topiramate inhibits cortical spreading depression in rat and cat: impact in migraine aura. *Neuroreport.* 2005;16(12):1383-7.
38. Perini F, D'Andrea G, Galloni E, Pignatelli F, Billo G, Albo S, et al. Plasma cytokine levels in migraineurs and controls. *Headache.* 2005;45(7):926-39.
39. Kocer A, Memisogullari R, Domaş FM, İlhan A, Kocer E, Okuyucu S, et al. IL-6 levels in migraine patients receiving topiramate. *Pain Pract.* 2009;9(5):375-9.
40. Akerman S, Goadsby PJ. Topiramate inhibits trigeminovascular activation: an intravital microscopy study. *Br J Pharmacol.* 2005; 146(1):7-14.
41. Stoner RJ, Goadsby PJ. Topiramate is likely to act outside of the trigeminocervical complex. *Cephalalgia.* 2013;33(5):291-300.
42. Karadas O, Gul HL, Ozturk B, Englu E, Demirkaya S. The effects of topiramate therapy on cerebral metabolism in migraine with aura patients. *Turk Neurosurg.* 2014; 24(5):704-9.
43. Stoner RJ, Goadsby PJ. Topiramate inhibits trigeminovascular neurons in the cat. *Cephalalgia.* 2004;4:1049-56.

Correspondência

Emanuela Paz Roças.

Av. Prof. Moraes Rego, 1235- Cidade Universitária,

Recife - PE, 50670-901.

E-mail: manu_paz@yahoo.com

telefone: +55 81 2126-8529

Recebido: 6 dezembro 2018

Aceito: 22 de dezembro 2018

APÊNDICE B – SHORT COMMUNICATION

SHORT COMMUNICATION

Histomorphometric analysis of mast cells in different regions of human intracranial dura mater

Análise histomorfométrica de mastócitos em diferentes regiões da dura-máter intracraniana humana

Emanuela Paz Rosa¹
 Silvania Tavares Paz²
 Ana Clara de Souza Neto³
 Raísa Ferreira Costa⁴
 Ana Paula Fernandes da Silva⁵
 Manuela Figueiroa Lyra de Freitas⁶
 Marcelo Moraes Valença^{1*}

¹Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde-LKA/UFPE;

²Programa de Pós-graduação em Saúde Translacional – CCS/UFPE;

³Departamento de Nutrição – CCS/UFPE;

⁴Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – CB/UFPE;

⁵Departamento de Anatomia – CB/UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil.

ABSTRACT

Objective: To analyze mast cell histomorphometry in three different regions of the human intracranial dura mater. **Method:** Three specimens of dura mater were collected after approval by the Ethics Committee (CAAE No. 57692216.5.0000.5208). Each dura mater was obtained from human cadavers between 7 and 24 hours after death. After collection, the samples were fixed, cut into two fragments and longitudinally placed in the following way: external (periosteum) and internal (meningeal) sides. The fragments (1.5 cm²) were taken from three different regions: proximity of the right middle meningeal artery, the proximity of the left middle meningeal artery and superior sagittal sinus. These fragments were submitted to microtomy (10 Qm), stained with 0.1% toluidine blue and analyzed by optical microscopy. The histomorphometric parameters adopted were: the distance from the mast cells to the vessels, the number and if the mast cells were degranulated. Five fields from each case were analyzed. For this analysis, the Image J 1.52a 2019 software was used. **Results:** A higher number of mast cells was observed in the periosteal layer when compared with the meningeal layer ($p=0.026$). When the distribution of the mast cells was evaluated, we observed that the cells were localized in the proximity of the middle meningeal artery ($p<0.05$). **Conclusion:** In human dura mater, the mast cells are localized in the proximity of dural arteries.

Keywords: Mast cell; Dura mater; Human; Meningeal artery; Migraine.

RESUMO

Objetivo: Analisar a histomorfometria dos mastócitos em três regiões diferentes da dura-máter intracraniana humana. **Método:** Três amostras de dura-máter foram coletadas após aprovação pelo Comitê de Ética (CAAE nº 57692216.5.0000.5208). Cada dura-máter foi obtida de cadáveres humanos entre 7 e 24 horas após a morte. Após a coleta, as amostras foram fixadas, cortadas em dois fragmentos e dispostas longitudinalmente da seguinte maneira: face externa (periósteo) e interna (meníngeo). Os fragmentos (1,5 cm²) foram retirados de três regiões diferentes: proximidade da artéria meníngeo média direita, proximidade da artéria meníngeo média esquerda e seno sagital superior. Esses fragmentos foram submetidos à microtomia (10 Qm), corados com azul de toluidina a 0,1% e analisados por microscopia óptica. Os parâmetros histomorfométricos adotados foram: distância dos mastócitos aos vasos, número e se os mastócitos estavam desgranulados. Foram analisados cinco campos de cada espécime. Para esta análise, foi utilizado o software Image J 1.52a 2019. **Resultados:** Observou-se maior número de mastócitos na camada periosteal quando comparada à camada meníngeo ($p = 0,026$). Quando avaliada a distribuição dos mastócitos, observamos que as células estavam localizadas nas proximidades da artéria meníngeo média ($p < 0,05$). **Conclusão:** Na dura-máter humana, os mastócitos estão localizados nas proximidades das artérias durais.

Descritores: Mastócito; Dura-máter; Humano; Artéria meníngeo; Enxaqueca.

*correspondence
 Emanuela Paz Rosa
 E-mail: manu_pazthy@hotmail.com

Received: April 2, 2019.
 Accepted: May 4, 2019.

DOI: 10.5935/2178-7468.20190003

INTRODUCTION

Recent evidence strongly suggests a vital role of dura mater mast cell in the genesis of migraine.^{1,2}

Gupta and Hervima described the mast cells as a "powerhouse" since they release "algogenic and pruritogenic mediators, which initiate a reciprocal communication with specific nociceptors on sensory nerve fibers."³

Mast cells are cells found in abundance in the dura mater and by local mechanism regulates vascular and neural functions, releasing substances such as histamine. Scientific evidence suggests that mast cells participate in the pathophysiology of triggering a migraine attack by inducing local sterile inflammation near the dura mater nociceptors.

Curiously, the mast cells are located in the proximity of the arteries in the dura mater, in close association with neurons. These cells appear to be activated through the trigeminal nerve. It is postulated that many neuropeptides, namely calcitonin gene-related peptide (CGRP), hemokinin A, neurotensin (NT), pituitary adenylyl cyclase-activating peptide (PACAP), and substance P may activate mast cells, resulting in the release of vasoactive and pro-inflammatory mediators, involved in the pathophysiology of migraine.⁴ Mast cells can also release substances with pro-inflammatory and vasoactive actions (e.g., interleukin-6 and vascular endothelial growth factor (VEGF)).⁴

The objective of the present study was to analyze mast cell histomorphometry in three different regions of the human intracranial dura mater.

METHOD

Three specimens of dura mater were collected after approval by the Ethics Committee (CAAE No. 57692216.5.0000.5208).

Each dura mater was obtained from human cadavers between 7 and 24 hours after death.

After collection, the samples were fixed, cut into two fragments and longitudinally placed in the following way: external (periosteum) and internal (meningeal) sides.

The fragments (1.5 cm²) were taken from three different regions: proximity of the right middle meningeal artery, the proximity of the left middle meningeal artery and superior sagittal sinus.

These fragments were submitted to microtomy (10 μ m), stained with 0.1% toluidine blue and analyzed by optical microscopy. The histomorphometric parameters adopted were: the distance from the mast cells to the vessels, the number and if the mast cells were degranulated. Five fields from each case were analyzed. For this analysis, the Image J 1.52a 2019 software was used.

RESULTS AND DISCUSSION

A higher number of mast cells was observed in the periosteal layer when compared with the meningeal layer ($p=0.026$).

When the distribution of the mast cells was evaluated, we observed that the cells were localized in the proximity of the middle meningeal artery (Figure 1), suggesting that there is a significant role played by the mast cells in dura mater to regulate vascular function. Probably the relationship between mast cells and meningeal arteries is an essential component in the migraine pathogenesis.

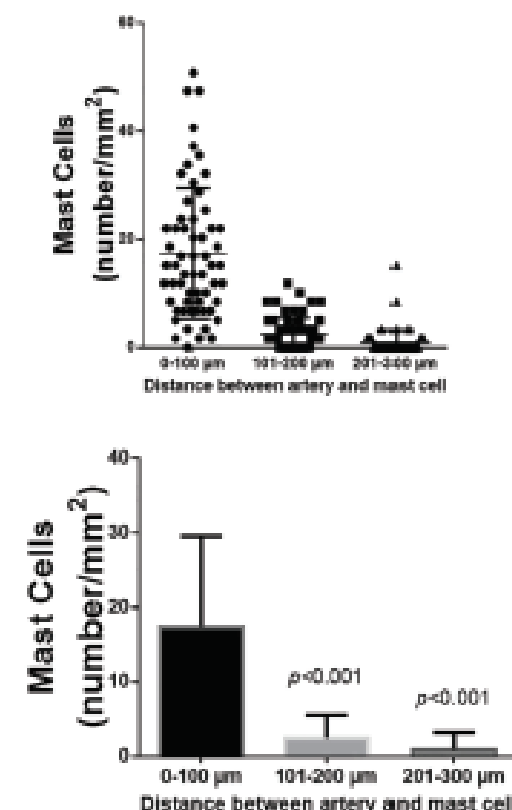


Figure 1. Mast cell density per mm² in relation to the distance to the vessel. P versus 0-100 μ m group, Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons test.

The distance between the artery and the mast cell was measured in 153 cells (57.65 m, min 0 - max 247; median 33, 95%IC 46-67). No differences were observed in the concentration of mast cells in convexity of the dura mater versus the superior sagittal sinus.

In his study, with human dura mater postmortem, 60-70% of the mast cells were degranulated. Migraine is a disorder with significant autonomic dysfunction. Clinically, long-lasting flushing suggests degranulation of mast cells.⁵

In conclusion, in human dura mater, the mast cells are localized in the proximity of dural arteries.

REFERENCES

1. Okregly AJ, Morin SM, DeRose D, Martin AP, Johnson KW, Johnson MP, Benachop RJ. Human mast cells release the



- migraine-inducing factor pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Cephalalgia*. 2018 Aug;38(9):1564-1574. doi: 10.1177/0333102417740563. Epub 2017 Nov 5.
2. Kilinc E, Degistan Y, Kulner A, Yilmaz B, Agus S, Soyler G, Tore F. Salmon calcitonin ameliorates migraine pain through modulation of CGRP release and dural mast cell degranulation in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018 Jun;45(6):536-546. doi: 10.1111/1440-1681.12915. Epub 2018 Feb 13.
 3. Baun M, Pedersen MH, Olesen J, Jensen-Olesen I. Dural mast cell degranulation is a putative mechanism for headache induced by PACAP-38. *Cephalalgia*. 2012 Mar;32(4):337-45. doi: 10.1177/0333102412439354.
 4. Theoharides TC, Donelan J, Kandere-Grzybowska K, Konstantinidou A. The role of mast cells in migraine pathophysiology. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005 Jul;49(1):65-76.
 5. Jensen-Olesen I, Hougaard Pedersen S. PACAP and its receptors in cranial arteries and mast cells. *J Headache Pain*. 2018 Feb 20;19(1):15. doi: 10.1186/s10194-017-0822-2.
 6. Kalpna Gupta, Ilkka T. Hervima. Mast cell-neural interactions contribute to pain and itch. *Immunol Rev*. Author manuscript; available in PMC 2019 Mar 1. Published in final edited form as: *Immunol Rev*. 2018 Mar; 282(1): 168-187. doi: 10.1111/imr.12622

**APÊNDICE C – ARTIGO I – SUBMETIDO E ACEITO PELO JOURNAL OF
ANATOMY**



Concerning: JOURNAL OF ANATOMY

Impact factor: 2.921

ISSN: 1469-7580

Concerning QUALIS CAPES:

Evaluation area: Ciências Biológicas 1.

Classification: B1.

**Histomorphometry of mast cells in the convexity of human intracranial dura
mater**

Emanuela Paz Rosas¹, Silvania Tavares Paz², Raísa Ferreira Costa³, Amanda
Araújo da Silva⁴; Romildo Luciano da Silva⁵; Ana Paula Fernandes da Silva¹;
Sabrina Roberta Santana da Silva⁶; Paloma Lys de Medeiros², Manuela Figueiroa
Lyra de Freitas⁷, Marcelo Moraes Valença^{1,3,4}

1. Postgraduate Program in Biology applied to Health (PPGBAS), Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA) Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil.
2. Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil.
3. Postgraduate Program in Biological Sciences (PPGCB), UFPE, Brazil.
4. Neurosurgery Unit, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil
5. Hospital das Clínicas, Pathological Anatomy Sector, UFPE, Brazil
6. Postgraduate Program in Animal Bioscience (PPGBA), Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Brazil.
7. Department of Anatomy, UFPE, Brazil.

Author's affiliation: Emanuela Paz Rosas, Postgraduate Program in Biology applied to Health (PPGBAS), Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901 - Recife, PE – Brazil.

Author's email: manu_pathy@hotmail.com.br

Abstract

Mast cells, known as pro-inflammatory effector cells, are immunocytes present in the meninges and may be involved in the pathophysiology of migraine. This study aims to evaluate the histomorphometric parameters of mast cells located in the convexity of the human intracranial dura mater. For this, samples of intracranial dura mater from eight human fresh cadavers were collected between 8- and 24-hour post-mortem. The whole samples were fixed, and subsequently, two fragments of 1.5 cm² each were cut from four different areas of the dura mater convexity, containing a segment of the middle meningeal artery (MMA), totaling 64 fragments. After histological processing, the fragments were submitted to microtomy (5 and 10 µm), stained with toluidine blue (0.1%), or immunohistochemically labeled for tryptase, and analyzed using optical microscopy. The following histomorphometric parameters were evaluated: distance from mast cells to vessels, the density of mast cells, and percentage of mast cells with degranulation. Histomorphometric analyzes showed a higher density of mast cells in the vicinity of blood vessels (arterial and venous), with distances around 0 to 150 µm. A greater number of mast cells was detected near venous vessels in the periosteal layer (17.0 ± 10.1 cells/mm²) than in the meningeal layer (14.1 ± 7.0 cells/mm²) ($p < 0.05$). Mast cells from the region close to the superior sagittal sinus were found in greater quantity close to the venous vessels (16.7 ± 10.1 cells/mm²) than to the arterial vessels (11.2 ± 7.5 cells/mm²) ($p < 0.05$). In short, in the convexity of the human intracranial dura mater, mast cells are located close to blood vessels, with a greater number of cells next to the venous vessels of the periosteal layer and in the proximal region of the superior sagittal sinus.

KEYWORDS: *Meninges, Mast cells, Dura mater, Morphology, microscopy, Meningeal arteries, Superior sagittal sinus, Migraine disorders, Cadaver.*

1 | INTRODUCTION

The intracranial dura mater is a thick meningeal barrier of connective tissue located between the skull and leptomeninges. This meninx can be divided into three layers: the periosteal (external), the meningeal (internal), and the subdural neurothelium. Such layers are well joined, separated only in the venous sinuses and the cerebral falx (Haines, 1991).

One of the main characteristics of the dura mater is its wide vascularization, which is supplied mainly by the middle meningeal artery (MMA), in a segment covering the cerebral convexity. In addition, it has veins that, in general, are parallel to the path of the meningeal arteries, which drain into efferent vessels in the periosteal layer or the dural venous sinuses (Levy et al. 2019). Dural venous sinuses are responsible for draining the blood that infuses intracranial structures, such as the brain, and play a crucial role in the reabsorption of cerebrospinal fluid (Johanson et al. 2008).

The dura mater is rich in innervation by trigeminal sensory fibers originating from the superior cervical branches. Studies showed that in the supratentorial dura mater of humans, cats and rodents, nerve fibers were located along the arteries, as well as in the tentorium of the cerebellum and in the venous sinuses (Andres et al. 1987; O'Connor & Van Der Kooy, 1986; Messlinger et al. 1983; Strassman et al. 2004; Lee et al. 2017; Edvinsson & Uddman, 1982; Mayberg et al. 1984). Immunohistochemical techniques observed that sensory neuropeptides, such as calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP), are expressed in axons innervating the cranial dura, cranial arteries, and venous sinuses (Strassman et al. 2004; Edvinsson et al. 1983; Edvinsson & Uddman, 1981; Sampaolo et al. 2017).

This external meninx is considered a part of the protective system because it is sensitive to stimuli that cause pain, possibly participating in the pathophysiology of primary headaches such as migraine. It is a complex tissue with a variety of immune cells, such as macrophages, dendritic cells, and mast cells (Mcmenamin, 1999; Dimlich et al. 1991). In this context, mast cell population has been considered as one of the requirements for the deflagration of sterile neurogenic inflammation, which consists of increased vascular permeability, leading to plasma protein extravasation, arterial vasodilation, and activation of resident immune cells (Mcmenamin, 1999;

Dimlich et al. 1991; Strassman & Levy, 2006; Fricke et al. 2001; Moskowitz et al. 1987; Dimitriadou et al. 1997; Moskowitz et al 1979).

Mast cells are immune cells that originated in the bone marrow, known to play a relevant role in allergic reactions, as well as in immunity and in several neuropathological conditions, which include migraine (Theoharides et al. 2016, 1995, 2005; Sayed et al. 2011; Karagkouni et al. 2013; Graziottin et al. 2014; Kempuraj et al. 2016a, 2016b; Moretti et al. 2016). Mast cells are found in the intracranial dura mater of humans (Otosson & Edvinsson, 1997; Varathaj et al. 2012; Eftekhari et al. 2013), of rodents (Artico & Cavallotti, 2001; Dimlich et al. 1991; Rozniecki et al 1999), and of pigs (Otosson & Edvinsson, 1997), in the vicinity of blood vessels and in close interaction with afferent nociceptive fibers (Rozniecki et al. 1999; Galli 1993). Moreover, these immune cells have granules containing various mediators, such as histamine, tryptase, cytokines, prostaglandins, and leukotrienes, which exert vasodilatory, pro-inflammatory, and neurosensitizing functions and are involved in the pathophysiology of migraine (Rozniecki et al. 1999; Levy et al. 2007; Kunder et al. 2011).

Since the relationship between the vascularity and cell types of the human intracranial dura may play a central role in immune response and neurogenic inflammation, a histomorphometric study of mast cells in the convexity of this meninge was performed. Hence, we aimed to evaluate the density of mast cells in relation to the distance between these cells and the arterial and venous vessels in the periosteal and meningeal layers, in near or far regions from the superior sagittal sinus of the human intracranial dura mater obtained from fresh cadavers. In addition, the percentage of mast cells with degranulation and the tryptase expression of these granulocytes were analyzed.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Human intracranial dura mater

The Ethics Committee for Research Involving Humans - Health Sciences Center/Federal University of Pernambuco (CCS/UFPE) – approved this study (CAAE 57692216.5.0000.5208). The human intracranial dura mater samples were obtained from eight fresh cadavers (ages 22 to 84 years; 4 women, 4 men) from the Division of Postmortem Inspection (SVO), UFPE. The causes of death were stroke (n=2), heart problems (n=2), cancer (n=2), and lung problems (n=2) (Table 1). After collection, the samples were fixed in 10% buffered formalin for 48 hours, and then two fragments of 1.5 cm² each were cut from four different areas of the dura mater convexity, containing a segment of the middle meningeal artery (MMA), totaling 64 fragments. The four different areas of the dura mater convexity were: (1) region distal to the superior sagittal sinus and the periosteal layer (Figure 1A, number 1); (2) region distal to the superior sagittal sinus and the meningeal layer (Figure 1B, number 2); (3) region proximal to the superior sagittal sinus and the periosteal layer (Figure 1A, number 3); and (4) region proximal to the superior sagittal sinus and the meningeal layer (Figure 1B, number 4). These fragments underwent dehydration, clearing, and paraffinization. Subsequently, the embedding was performed to position the dura mater fragments longitudinally according to the desired layer: facing the top view (periosteal layer) or bottom view (meningeal layer).

2.2 | Identification of mast cells by toluidine blue (0.1%) staining

For toluidine blue staining, the samples in paraffin blocks were cut crosswise to visualize the direction of the vessels (in their longitudinal aspect), in 10 µm thickness, and were taken to the oven for adhesion to the glass slide. Then the sections were deparaffinized (xylol I, alcohol-xylol, 100%, 90%, 80%, and 70% alcohol), hydrated, and stained with 0.1% toluidine blue. Finally, the preparations were dehydrated, bleached, and mounted with a coverslip and synthetic glue.

2.3 | Identification of mast cells by the expression of Tryptase by immunohistochemistry.

The embedded dura mater samples were subjected to microtomy with 5 µm thick cuts, mounted on glass slides. The slides were deparaffinized in xylene (I, II), bathed in decreasing ethyl alcohol solution (100%, 90%, 80%, and 70%), and tap

water for 5 minutes each step. Antigen retrieval was performed with citrate buffer (10 mM, pH 6.0) in a water bath at 60°C for 60 minutes. Subsequently, two washes with PBS (100 mM, pH 7.2) were performed for 5 minutes after each immunohistochemistry step. The slides were then immersed in a 3% methanol/peroxide solution for 30 minutes. The blocking solution from the kit (BosterBio SA 1021) was applied for 20 minutes. Then, it was incubated with the primary mast cell anti-tryptase antibody (AA1- Abcam 2378; at 1:100 dilution) in a humid chamber overnight, at 4°C. Subsequently, secondary (Biotinylated IGG) and tertiary antibodies (SABC) were applied to each sample at 25°C for 20 minutes. The tissues were incubated with a DAB developer and counterstained with hematoxylin. Immediately, the samples were washed in running water, in graded alcohol solution (70%, 80%, 90%, and 100%), xylol, and mounted. For the negative control, the same protocol was used without the primary antibody. For the positive control samples of the human small intestine were used.

2.4 | Microscopic analysis

The light microscopic analyses were performed by one observer independently, without knowledge of the experimental conditions. The dura mater samples were analyzed by digitalized images (Motic Images Plus 2.0), obtained at 100x and 400x magnification, and aided by an Olympus BX-50 microscope coupled to a digital camera. The mast cells were considered degranulated when the granules were on the outside of the cell (more than 5 granules), or loss of staining of the cell (more than 50%), or had a ghostly aspect (Rozniecki et al. 1999). Five 0.59 mm² fields from each sample were analyzed.

2.5 | Histomorphometric analysis

The histomorphometric analyses were performed by *Software ImageJ*® 1.52a (2019). The measurement parameters adopted were the distance from the mast cell to the arterial and venous vessel (tunica media or endothelial cells), percentage of degranulated mast cells, and mast cell density by distance (number of cells/mm²). From this last analysis, comparisons were made to know which areas of the convexity of the human intracranial dura mater (periosteal or meningeal layers; proximal or distal regions of the superior sagittal sinus) had the highest density. The density of mast cells was counted according to the distance of this cell to the arterial vessel

(tunica media of the middle meningeal artery and descending arterioles) and venous vessel (tunica media of veins and the endothelial layer of venules). This count was performed from the analysis between the minimum and maximum distances obtained between the mast cell and the vessel (minimum = 0 μm ; maximum = 750 μm). The intervals determined for density of mast cells per mm^2 were: 0 – 150 μm , 151 – 300 μm , 301 – 750 μm . The quantification of mast cells was done by only one observer.

2.6 | Statistical analysis

Graphpad prism software version 8.0.3 was used for statistical analysis. The distribution of quantitative variables was analyzed by applying the Kolmogorov-Smirnov normality test. Data with normal and non-normal distribution were evaluated, respectively, by parametric tests (paired t-test, unpaired t-test and One Way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test) and non-parametric tests (Kruskal Wallis test with Dunn's multiple comparisons test). Differences were considered significant for $p < 0.05$ and the confidence interval (CI) shown was 95%.

3 | RESULTS

Mast cells were easily identified in the dural samples by toluidine blue staining, showing blue or magenta coloration (Figures 2 and 3), and the tryptase marker, showing brown coloration (Figure 4). Found around blood vessels (arterial and venous) (Figs. 2, 3 and 4), these cells had a compact and intensely stained cellular profile, with visible intracellular granules ($25,1\% \pm 0,06$) as shown in table 2. However, most mast cells presented pale spots and extrusive granules around the cell body, characterizing the degranulation process, which was $74.9\% \pm 0.06$ (Figs. 2, 3 and 6; Table 2). The degranulation profile was almost the same for both sexes, with about $75.6 \pm 0.05\%$ degranulated cells in the female samples and $74.3 \pm 0.03\%$ in the male (Table 2).

Among the distances established to verify mast cell density, it was observed that the greatest amount of mast cells was found very close (0 - 150 μm) to both vessels (arterial and venous) in all analyzed areas of the convexity of the human intracranial dura mater (Tables 3 and 4; Fig. 2 and 3).

As most mast cells were between 0 - 150 μm distant from both arterial and venous vessels, comparisons were made between the different areas of the convexity to find out where there was the highest density of mast cells in relation to the periosteal and meningeal layers, and the position in relation to the superior sagittal sinus (SSS) (proximal or distal). A greater amount of mast cells was observed near the venous vessels in the periosteal layer (17.0 ± 10.1 cells/ mm^2) when compared to the meningeal layer (14.1 ± 7.0 cells/ mm^2) ($p < 0.05$) (Table 5). Furthermore, in the periosteal layer, the density of mast cells was higher near the venous vessels (17.0 ± 10.1 cells/ mm^2) than in the arterial vessels (12.05 ± 7.6 cells/ mm^2) ($p < 0.05$) as described in Table 5. As for the location in relation to the SSS (proximal versus distal), we observed a higher density of mast cells near the venous vessels (16.7 ± 10.1 cells/ mm^2) than the arterial vessels (11.2 ± 7.5 cells/ mm^2) in the proximal region of the SSS ($p < 0.05$) (Table 6). Regarding gender, there were no differences in mast cell density in the different areas analyzed (Table 7).

4 | DISCUSSION

Mast cells, initially thought to be essential drivers of allergic reactions, are in reality a special cell type that may have been functionally involved in many other pathophysiological processes. Their typical perivascular location is a hint in the control of vasoactive processes, and this, in the dura mater, may be put in conjunction with the pathogenesis of headache.

To date, the studies on this topic (Table 2) have not reported a differential count of mast cells according to blood vessel types, and in this study, we demonstrated that mast cells were found in greater numbers at a distance between 0-150 μm from both blood vessel types (arterial and venous) of the convexity of the human intracranial dura mater. Otosson & Edvinsson (1997) demonstrated in their study of cranial dura mater from eight human cadavers that mast cells were found in the vicinity of blood vessels with an average of 7.4 mast cells per visual field. However, they performed the counting at a distance with a greater range (up to 500 μm on either side of the MMA). The proximity between mast cells and blood vessels allows the released mediators to act directly on endothelial cells to possibly enter the vessels and be carried to more distant sites, promoting both local and systemic effects (Kunder et al. 2011).

In contrast, rat dural mast cells have been found in abundance near or far from blood vessels (Otosson & Edvinsson, 1997), as well as near afferent fibers immunoreactive for substance P (SP) (Rozniecki et al. 1999). Dimlich et al. (1991) showed that these rat dural mast cells were aligned parallel to the middle meningeal artery in the periosteal layer and in the meningeal layer, they were also parallel to the trigeminal nerve branches, and some were not adjacent to either structure. This same study showed that mast cells were aligned at the interface between the two layers in cross-sections of the intracranial dura mater. With this, it is evident that in rats, mast cells may have functions related to connective tissue, such as in the normal developmental process, and in the inflammatory response to injury and wound repair (Dimlich et al. 1991).

In another study with rat dural mast cells, a higher density was observed in the vicinity of catecholaminergic nerve fibers, showing a higher fluorescence of these cells in the basal zone in relation to the apical zone of the dura mater. Similarly, the fluorescence increases from the basal zone to the perivascular and intervascular zones, demonstrating an inverse relationship between the number of mast cells and

fluorescent catecholaminergic nerve fibers (Artico & Cavallotti, 2001). We want to delineate the implication of autonomic regulations over mast cell function and probably a distribution pattern closer to dural vessels, which received different neural fibers (Kleij & Bienenstock, 2005). Functional communication between dural nerves and mast cells is strongly suggested. Many substances may be released from autonomic or nonadrenergic non-cholinergic nerves, influencing the recruitment, proliferation, and activation of leukocytes (Kleij & Bienenstock, 2005). On the contrary, in its turn, inflammatory cells may as well modulate neuronal function (Kleij & Bienenstock, 2005).

Varathaj et al. (2012) investigated the density of mast cells in human intracranial dura mater and the changes associated with subdural hemorrhage (SDH). This study used cadaveric dura mater without dural bleeding and cases with fresh and old dural hemorrhage. The density analyzed in these three cases demonstrated that dural hemorrhage is associated with an increase in the number of dural mast cells and seems to increase with chronicity of bleeding. Varathaj et al. (2012) also considered that mast cells tended to be found around blood vessels, but the types of vessels were not identified, and more frequently located in the periosteal layer than in the meningeal layer (numeric data not reported). This same study showed that most of these cells were granulated, and few were degranulated or activated (percentages not reported). In the present study, the type of vessel was specified, arterial or venous, and it was observed that there was a higher density of mast cells near the venous vessel in the periosteal layer than in the meningeal layer. It is appropriate to know the type of vessel in which these mast cells are found in the dura mater because, in inflammatory processes, the histamine released by mast cells near venous vessels (post-capillary venules, for example) alter the vascular permeability and facilitate the passage of leukocytes to the site (Kunder et al. 2011; Junqueira & Carneiro, 2017). Furthermore, mast cell degranulation in post-capillary venules of dura mater can be triggered from electrical stimulation of the trigeminal ganglion, which leads to the release of neuropeptides and, consequently, plasma leakage, endothelial cell activation, platelet aggregation and adhesion (Buzzi & Moskowitz, 1991).

Mast cells are recognized as key cells of type I hypersensitivity reactions (Crivellato et al., 2004). However, several lines of evidence indicate that mast cells express critical effector functions in classic IgE-associated allergic disorders and play

essential roles in host defense against parasites, bacteria, and viruses. These cells can contribute to host defense in the context of acquired and innate immune responses by releasing a myriad of pro-inflammatory and immunoregulatory molecules and expressing a broad spectrum of surface receptors for cytokines and chemokines. Moreover, there is growing evidence that mast cells exert distinct nonimmunological functions, playing a relevant role in tissue homeostasis, remodeling, and fibrosis, as well as in the mechanisms of tissue angiogenesis (Crivellato et al., 2004; Crivellato & Ribatti, 2010; Ribatti & Crivellato, 2016; Ribatti et al. 2019). Mast cells are also implicated in the progression of neoplasms, interacting with tumor cells (Crivellato et al., 2004; Crivellato & Ribatti, 2010; Ribatti & Crivellato, 2016; Ribatti et al. 2019).

As an important structure of the dura mater, after electrical stimulation of the superior sagittal sinus causes pain in humans (Feindel et al. 1960), by increasing cerebral blood flow more than the stimulation performed in trigeminal ganglion (Goadsby et al. 1997). In addition, electrical stimulation of the SSS also produces the release of CGRP and vasoactive intestinal peptide (VIP) from trigeminal neurons and parasympathetic neurons, respectively (Zagami et al. 1990). Due to the importance of the SSS, our study, a pioneer in this theme so far, with the literature on the subject (Table 2), showed a larger mast cell population near the venous vessels in the region proximal to the SSS.

We want to discuss on potential functional implications of our results of the presence of mas cells in the dura mater of humans. A sterile inflammation in the pathogenesis of migraine has been postulated, and several studies have observed the dura mater as a possible site involved in the generation of migraine pain. The finding of mast cells in the dura mater is somewhat intriguing, strongly suggesting a role in this inflammation process with vasodilation or constriction that can occur during a migraine attack. A bidirectional communication must occur between dural blood vessels and mast cells; likewise, exchanges of substances between mast cells and neural terminals must innervate the dura mater, particularly the blood vessels.

Among the best-known primary headaches, migraine is the most common type of headache occurring in women (Stovner et al. 2007), and estrogen may play a key role in mediating this susceptibility (Macgregor, 2008). Studies have demonstrated estrogen receptors in human bladder mast cells (Pang et al. 1995) and in rat dura mater mast cells (Rozniecki et al. 1999). In addition, it has been found that

estradiol can increase mast cell degranulation by compound 48/80 and carbachol (Vliagoftis et al. 1992; Theoharides et al. 1993). In rats, the density of intracranial dural mast cells in relation to sex is higher in females (Boes & Levy 2012). In the present study, with postmortem samples of human intracranial dura mater, no differences were observed between the sexes regarding mast cell densities in the analyzed areas of the dura mater convexity, nor regarding the percentage of degranulated mast cells.

The current study found that the postmortem human dura samples had a percentage of degranulated mast cells of almost 75%. Similar results were found by Otosson and Edvisson (1997), who - studying postmortem intracranial dura samples from human, rat, and pig - observed degranulated mast cell percentages of 76.8%, 69.19%, and 100%, respectively. The degranulation of mast cells may also be due to the removal of the dura mater from the skull (Ottosson & Edvinsson, 1997), but we cannot prove this hypothesis.

An intriguing phenomenon is that we find mast cells in both forms - granulated and degranulated - which suggests the existence of a cycle between these two stages. We do not know how long a mast cell lives in the dura mater or how long this cycle between degranulation and the cell recovers to its granular state is; we do not know either. This could likely be linked to the duration of a migraine attack if this sterile inflammation remains for the entire duration of a migraine attack of 4 hours up to 3 days usually.

Finally, another potential aspect of being commented is regarding an ultrastructural characterization of the perivascular mast cells. This would enable recognition of different types of granula and tell more about potential functional implications and modalities of degranulation and could considerably increase the value of the present study. Future studies are planned to evaluate further such questions.

5 | CONCLUSION

The mast cells observed in the convexity of human intracranial dura are located near arterial and venous vessels, with a higher density of these cells occurring in the vicinity of venous vessels in the periosteal layers and proximal to the superior sagittal sinus. Thus, human dural mast cells are versatile cells, suggesting their participation in neuroinflammatory processes, such as migraine, modulating vascular permeability, and recruiting defense cells in the human dura mater.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the *Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) for the financial assistance through the scholarship granted to carry out this work.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest for the publication of this article.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

E.P.R., S.T.P. and M.M.V. designed the study. E.P.R., S.T.P., R.F.C., A.A.S., R.L.S. and A.P.F.S. performed the collection, preparation and histomorphometric analysis of the samples. E.P.R. and M.M.V. performed statistical analysis. E.P.R., S.T.P., A.P.F.S., S.R.S.S., P.L.M., M.F.L.F. and M.M.V. drafted and critically revised the manuscript. All authors have approved the final version of the manuscript.

References

- Andres, K.H., Von Düring, M., Muszynski, K. & et al. (1987) Nerve fibres and their terminals of the dura mater encephali of the rat. *Anatomy and Embryology*, 175, 289–301.
- Artico, M. & Cavallotti, C. (2001) Catecholaminergic and acetylcholine esterase containing nerves of cranial and spinal dura mater in humans and rodents. *Microscopy Research and Technique*, 53(3), 212-20.
- Boes, T. & Levy, D. (2012) Influence of sex, estrous cycle, and estrogen on intracranial dural mast cells. *Cephalalgia*, 32(12), 924-931.
- Buzzi, M.G. & Moskowitz, M.A. (1991) Evidence for 5-HT_{1B/1D} receptors mediating the antimigraine effect of sumatriptan and dihydroergotamine. *Cephalalgia*, 11(4), 165-168.
- Crivellato, E., Beltrami, C. A., Mallardi, F., & Ribatti, D. (2004). The mast cell: an active participant or an innocent bystander? *Histol Histopathol*, 19(1), 259-270.
- Crivellato, E., & Ribatti, D. (2010). The mast cell: an evolutionary perspective. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 85(2), 347-360.
- Dimitriadou, V., Rouleau, A., Trung Tuong, M.D. & et al. (1997) Functional relationships between sensory nerve fibers and mast cells of dura mater in normal and inflammatory conditions. *Neuroscience*, 77(3), 829–839.
- Dimlich, R.V.W., Keller, J.T., Strauss, T.A. & et al. (1991) Linear arrays of homogenous mast cells in the dura mater of the rat. *Journal of Neurocytology*, 20(6), 485-503.
- Edvinsson, L. & Uddman, R. (1981) Adrenergic, cholinergic and peptidergic nerve fibres in dura mater – involvement in headache? *Cephalalgia*, 1(4), 175-179.
- Edvinsson, L. & Uddman, R. (1982) Immunohistochemical localization and dilatory effect of substance P on human cerebral vessels. *Brain Research*, 232, 466-471.
- Edvinsson, L., Rosendal-Helgesen, S. & Uddman, R. (1983) Substance P: Localization, concentration and release in cerebral arteries, choroid plexus and dura mater. *Cell and Tissue Research*, 234(1), 1-7.
- Eftekhari, S., Warfvinge, K., Blixt, F.W. & et al. (2013) Differentiation of Nerve Fibers Storing CGRP and CGRP Receptors in the Peripheral Trigemino-vascular System. *The Journal of Pain*, 14(11), 1289-1303.
- Feindel, W., Penfield, W. & McNaughton, F. (1960) The tentorial nerves and localization of intracranial pain in man. *Neurology*, 10, 555-563.

- Fricke, B., Andres, K.H. & Von Düring, M. (2001) Nerve fibers innervating the cranial and spinal meninges: morphology of nerve fiber terminals and their structural integration. *Microscopy Research and Technique*, 53(2), 96-105.
- Galli, S.J. (1993) New concepts about the mast cell. *New England Journal of Medicine*, 328(4), 257-265.
- Goadsby, P.J., Knight, Y.E., Hoskin, K.L. & et al. (1997) Stimulation of an intracranial trigeminally-innervated structure selectively increases cerebral blood flow. *Brain Research Reviews*, 751(2), 247-252.
- Graziottin, A., Skaper, S.D. & Fusco, M. (2014) Mast cells in chronic inflammation, pelvic, pain and depression in women. *Gynecological Endocrinology*, 30(7), 472-477.
- Haines, D.E. (1991) On the question of a subdural space. *The Anatomical Record*, 230, 3–21.
- Johanson, C.E., Duncan, J.A., Klinge, P.M. & et al. (2008) Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: new challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Research*, 14, 5-10.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2017) Histologia básica: texto e atlas. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Karagkouni, A., Alevizos, M. & Theoharides, T.C. (2013) Effect of stress on brain inflammation and multiple sclerosis. *Autoimmunity Reviews*, 12(10), 947-953.
- Kempuraj, D., Thangavel, R., Fattal, R. & et al. (2016a) Mast cells release chemokine CCL2 in response to Parkinsonian Toxin 1-Methyl-4-Phenyl-Pyridinium (MPP (+)). *Neurochemical Research*, 41(5): 1042-1049.
- Kempuraj, D., Thangavel, R., Natteru, P.A. & et al. (2016b) Neuroinflammation induces neurodegeneration. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Spine*, 1(1), 1003.
- Kleij, H. P., & Bienenstock, J. (2005). Significance of Conversation between Mast Cells and Nerves. *Allergy, asthma, and clinical immunology: official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 1(2), 65–80.
- Kunder, C.A., John, A.L.S. & Abraham, S.N. (2011) Mast cell modulation of the vascular and lymphatic endothelium. *Blood*, 118(20), 5383-5393.
- Lee, S.H., Shin, K.J., Koh, K.S. & et al. (2017) Visualization of the tentorial innervation of human dura mater. *Journal of Anatomy*, 231(5), 683-689.
- Levy, D.R., Burstein, V., Kainz, M. & et al. (2007) Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache. *Pain*, 130(1-2), 166-176.

- Levy, D., Labastida-Ramirez, A. & Maassen, Van Den Brink, A. (2019) Current understanding of meningeal and cerebral vascular function underlying migraine headache. *Cephalalgia*, 39(13), 1606-1622.
- Macgregor, E.A. (2008) Menstrual Migraine. *Current Opinion in Neurology*, 21(3), 309-315.
- Markowitz, S., Saito, K. & Moskowitz, M.A. (1987) Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain. *Journal of Neuroscience*, 7(12), 4129–4136.
- Mayberg, M.R., Zervas, N.T. & Moskowitz, M.A. (1984) Trigeminal projections to supratentorial pial and dural blood vessels in cats demonstrated by horseradish peroxidase histochemistry. *Journal of Comparative Neurology*, 223(1), 46–56.
- McMenamin, P.G. (1999) Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in whole mount preparations. *Journal of Comparative Neurology*, 405(4), 553-562.
- Messlinger, K., Hanesch, U., Baumgartel, M. & et al. (1993) Innervation of the dura mater encephali of cat and rat: Ultrastructure and calcitonin gene-related peptide-like and substance P-like immunoreactivity. *Anatomy and Embryology*, 188, 219–237.
- Moretti, R., Chhor, V, Bettati, D. & et al. (2016) Contribution of mast cells to injury mechanisms in a mouse model of pediatric traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience Research*, 94(12), 1546-1560.
- Moskowitz, M.A., Reinhard, J.F.Jr., Romero, J. & et al. (1979) Neurotransmitters and the fifth cranial nerve: Is there a relation to the headache phase of migraine? *The Lancet*, 2(8148), 883-885.
- O'Connor, T.P. & Van Der Kooy, D. (1986) Pattern of intracranial and extracranial projections of trigeminal ganglion cells. *Journal of Neuroscience*, 6(8), 2200-2207.
- Ottosson, A. & Edvinsson, L. (1997) Release of histamine from dural mast cells by substance P and calcitonin gene-related peptide. *Cephalalgia*, 17(3), 166-174.
- Pang, X., Cotreau-Bibbo, M.M., Sant, G.R. & et al. (1995) Bladder mast cell expression of high affinity estrogen receptors in patients with interstitial cystitis. *International Brazilian Journal of Urology*, 75(2), 154-161.

- Rozniecki, J.J., Dimitriadou, V., Lambracht-Hall, M. & et al. (1999) Morphological and functional demonstration of rat dura mater mast cell-neuron interactions in vitro and in vivo. *Brain Research Reviews*, 849(1-2), 1-15.
- Ribatti, D., & Crivellato, E. (2016). The role of mast cell in tissue morphogenesis. Thymus, duodenum, and mammary gland as examples. *Exp Cell Res*, 341(1), 105-109.
- Ribatti, D., Tamma, R., & Vacca, A. (2019). Mast Cells and Angiogenesis in Human Plasma Cell Malignancies. *Int J Mol Sci*, 20(3).
- Sampaolo, S., Liguori, G., Vittoria, A. & et al. (2017) First study on the peptidergic innervation of the brain superior sagittal sinus in humans. *Neuropeptides*, 65, 45-55.
- Sayed, B.A., Walker, M.E. & Brown, M.A. (2011) Cutting edge: mast cells regulate disease severity in a relapsing-remitting model of multiple sclerosis. *The Journal of Immunology*, 186(6), 3294-3298.
- Stovner, L., Hagen, K., Jensen, R. & et al. (2007) The global burden of headache: a documentation of headache prevalence and disability worldwide. *Cephalalgia* 27(3), 193-210.
- Strassman, A.M., Weissner, W., Williams M. & et al. (2004) Axon diameters and intradural trajectories of the dural innervation in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 473(3), 364-376.
- Strassman, A.M. & Levy, D. (2006) Response properties of dural nociceptors in relation to headache. *Journal of Neurophysiology*, 95, 1298–1306.
- Theoharides, T.C., Dimitriadou, V., Letourneau, R.J. & et al. (1993) Synergistic action of estradiol and myelin basic protein on mast cell secretion and brain demyelination: changes resembling early stages of demyelination. *Neuroscience*, 57(3), 861-871.
- Theoharides, T.C., Spanos, C., Pang, X. & et al. (1995) Stress-induced intracranial mast cell degranulation: a corticotropin-releasing hormone-mediated effect. *Endocrinology*, 136(12), 5745-5750.
- Theoharides, T.C., Donelan, J., Kandere-Grzybowska, K. & et al. (2005) The role of mast cells in migraine pathophysiology. *Brain Research Reviews*, 49(1), 65-76.
- Theoharides, T.C., Stewart, J.M., Panagiotidou, S. & et al. (2016) Mast cells, brain inflammation and autism. *European Journal of Pharmacology*, 778, 96–102.
- Varathaj, A., Mack, J., Davidson, J.R. & et al. (2012) Mast cells in the human dura: effects of age and dural bleeding. *Child's Nervous System*, 28(4), 541-545.

Vliagoftis, H., Dimitriadou, V., Boucher, W. & et al. (1992) Estradiol augments while tamoxifen inhibits rat mast cell secretion. *International Archives of Allergy and Immunology*, 98(4), 398-409.

Zagami, A.S., Goadsby, P.J. & Edvinsson, L. (1990) Stimulation of the superior sagittal sinus in the cat causes release of vasoactive peptides. *Neuropeptides*, 16(2), 69-7.

TABLE 1. Information about the human intracranial dura samples that were collected postmortem from the Death Verification Service (DVS) of the Federal University of Pernambuco from June/2019 to December/2019.

Dura mater donor (#)	Sex	Age (years)	Cause of death	Postmortem time (hours)
1	Female	22	Cardiogenic shock	9
2	Female	48	Sudden cardiac death	10
3	Female	67	Cancer	8
4	Female	80	Pulmonary Edema	19
5	Male	59	Stroke	19
6	Male	64	Cancer	21
7	Male	81	Stroke	24
8	Male	84	Pulmonary Embolism	13

20 **TABLE 2.** Comparative analysis of different histomorphometric parameters of the mast cells in intracranial dura studies in different
 21 species.

Species	Density				Degranulation (%)	Granulation (%)	References (Author/ Year)
	Types of blood vessels	Layer types	SSS (Location)	Sex			
Human	Venous and arterial	Periosteal and Meningeal	Proximal and distal	Female and male	General – 74,9 ± 0,06 Female – 75,6%± 0,05 Male – 74,3%± 0,03	General – 25,1 ± 0,06 Female – 24,4%± 0,05 Male – 25,7%± 0,03	This study
Human	ND	Periosteal and Meningeal (Numeric data not reported)	NS	NS	NS	NS	Varathaj et al 2012
Rat	NS	NS	NS	Female and male	Numeric data not reported, only graphs		Boes & Levy, 2012
Rat	ND	NS	NS	NS	NS	NS	Artico & Cavallotti, 2001
Rat	NS	NS	NS	NS	Control – 36 ± 8 Stress – 68 ± 8 Stress anti-CRH - 35 ± 8 NRS + stress 54 ± 12 Antalarmin + stress 42 ± 8	NS	Rozniecki et al. 1999
Rat, Pig, Human	Arterial	NS	NS	NS	Rat – 69,19 Pig – 100 Human – 76,8	NS	Otosson & Edvinsson, 1997
Rat	Arterial	NS	NS	NS	Immunohistochemistry, perfusion fixation Left - 11.1 ± 3.9/ Right - 36.1 ± 6.4. Glyoxylic acid (GA) technique no perfusion fixation Left - 78.6 ± 2.4/ Right - 77.2 ± 2.3. Counterstained with berberine sulphate, no perfusion fixation. Left - 90.3 ± 1.2/ Right - 88.0 ± 1.6	NS	Dimlich et al. 1991

22 Note: SSS – Superior sagittal sinus; NS- Not shown; ND – Not distinguished; NRS – normal rabbit serum. Dimlich et al. (1991) chose to use the term
 23 "dispersion" in place of the term "degranulation", but in practice both have a similar meaning.

TABLE 3. Quantitative analysis of mast cell density (number of mast cells/mm²) at different distances (0 - 150; 151 - 300; 301 - 750 µm) in relation to the arterial vessel in the layers (periosteal and meningeal) and positions in relation to the superior sagittal sinus (proximal or distal) of the intracranial dura mater corresponding to the cerebral convexity of eight human cadavers.

Number of samples † (n)	Distance(µm) between arterial vessel and mast cells	Distal periosteal layer (1)	Distal meningeal layer (2)	Proximal periosteal layer (3)	Proximal meningeal layer (4)
8	0 – 150	12.4 ± 5.8	13.7 ± 11.6	11.7 ± 9.2	10.7 ± 5.6
8	151 – 300	5.6 ± 3.7***	5.3 ± 3.3**	4.9 ± 4.1*	5.8 ± 3.5**
8	301 – 750	3.5 ± 2.7***	2.7 ± 2.5***	4.7 ± 5.6**	4.2 ± 3.2***

Note: *p<0.05, 0 -150 µm vs 151 – 300 µm area (3); **p<0.01, 0 -150 µm vs 151 - 300 µm area (2) and (4); **p<0.01, 0 - 150 µm vs 301 - 750 µm area (3); ***p<0.001, 0 -150 µm vs 151 - 300 µm area (1); 0 -150 µm vs 301 - 750 µm area (1), (2) and (4). Area (1) and (4): One Way ANOVA with Dunnett's test for multiple comparisons. Area (2) and (3): Kruskal Wallis test with Dunn's multiple comparisons test. Areas were evaluated as arranged and data are shown as mean ± standard deviation. † Right and left sides of eight postmortem dura mater specimens

TABLE 4. Quantitative analysis of mast cell density (number of mast cells/mm²) at different distances (0 - 150 µm; 151 - 300 µm; 301 - 750 µm) in relation to the venous vessel in the layers (periosteal and meningeal) and positions in relation to the superior sagittal sinus (proximal or distal) of the intracranial dura mater corresponding to the convexity of eight human cadavers.

Number of samples † (n)	Distance (µm) between arterial vessel and mast cells	Distal periosteal layer (1)	Distal meningeal layer (2)	Proximal periosteal layer (3)	Proximal meningeal layer (4)
8	0 – 150	16.4 ± 7.4	12.5 ± 6.6	17.7 ± 12.5	15.7 ± 7.1
8	151 – 300	3.6 ± 2.3***	3.5 ± 3.3***	2.9 ± 2.5***	3.7 ± 3.1***
8	301 – 750	1.8 ± 1.6***	4.0 ± 3.8***	1.4 ± 1.8***	2.0 ± 2.4***

Note: ***p<0.001, 0 – 150 µm vs 151 – 300 µm all areas; 0 - 150 µm vs 301 - 750 µm all areas. Area (1): One way ANOVA with Dunnett's test for multiple comparisons. Area (2), (3) and (4): Kruskal Wallis test with Dunn's multiple comparisons test. Areas were evaluated as arranged and data are shown as mean ± standard deviation. † Right and left sides of eight postmortem dura mater specimens.

TABLE 5. Quantitative analysis of mast cell density (number of mast cells/mm²) at a distance of 0 to 150 µm from the vessels (arterial and venous) in relation to the types of layers (periosteal and meningeal) of the intracranial dura mater corresponding to the convexity of eight human cadavers.

Number of samples † (n)	Blood vessel type	Periosteal layer	Meningeal layer
32	Arterial	12.1 ± 7.6*	12.2 ± 9.1
32	Venous	17.0 ± 10.1	14.1 ± 6.9#

Note: *p<0.05, 0 – 150 µm of the venous vessel periosteal layer vs 0 - 150 µm of the arterial vessel periosteal layer. Unpaired t-test. #p<0.05, 0 - 150 µm of the venous vessel periosteal layer vs 0 - 150 µm of the venous vessel meningeal layer. Paired t-test. Areas were evaluated as arranged and data are shown as mean ± standard deviation. †Right and left sides/proximal and distal position of the superior sagittal sinus of eight postmortem dura specimens.

TABLE 6. Quantitative analysis of the mast cell density (number of mast cells/mm²) at a distance of 0 to 150 µm from the vessels (arterial and venous) in relation to the positions with respect to the superior sagittal sinus (distal and proximal) of the intracranial dura mater corresponding to the convexity of eight human cadavers.

Number of samples † (n)	Blood vessel type	Distal	Proximal
32	Arterial	13,0 ± 9,0	11,2 ± 7,5**
32	Venous	14,4 ± 7,2	16,7 ± 10,0

Note: **p<0.01, 0-150 µm of the venous vessel proximal to the superior sagittal sinus vs 0-150µm of the arterial vessel proximal to the superior sagittal sinus. Kruskal Wallis test with Dunn's multiple comparisons test. †Right and left sides/periosteal and meningeal layers of eight postmortem dura specimens.

TABLE 7. Quantitative analysis of mast cell density (number of mast cells/mm²) at a distance of 0 to 150 µm from the vessels (arterial and venous) in relation to sex (female and male) of the intracranial dura mater corresponding to cerebral convexity of eight human cadavers.

Number of samples † (n)	Area	Female Arterial Vessel	Female Venous Vessel	Male Arterial Vessel	Male Venous Vessel
8	Distal/Distal Periosteal Layer (1)	10,8 ± 5,0	14,6 ± 8,6	13,9 ± 6,53	18,7 ± 7,2
8	Meningeal Layer/ Distal (2)	10,0 ± 5,1	12,5 ± 8,6	17,3 ± 15,2	12,6 ± 4,3
8	Periosteal Layer (3)	10,8 ± 6,2	13,8 ± 8,3	12,6 ± 11,92	19,5 ± 14,1
8	Proximal/ Meningeal Layer (4)	12,6 ± 6,4	16,3 ± 5,4	8,7 ± 4,32	15,3 ± 8,9

Note: Areas were evaluated as arranged and data are shown as mean ± standard deviation. †Right and left sides of eight (four male/four female) postmortem dura mater specimens.

APÊNDICE D – ARTIGO EM COLABORAÇÃO

VIEW AND REVIEW

Of the available triptans, which should be chosen and how should they be used?

Dos triptanos disponíveis, quais devem ser escolhidos e como devem ser usados?

Marcelo Moraes Valença¹
 Emanuel Paz Rosa²
 Raísa Ferreira Costa²
 Amanda Araújo da Silva²
 Maria Rosana de Souza Ferreira²
 Rita Santana dos Reis²
 Marcelo Andrade Valença²
 Luciana Patrícia Alves de Andrade-Valença²

¹Neurology and Neurosurgery Unit, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

ABSTRACT

There is a plethora of articles dealing with the use of triptans to treat migraine, but so far no unanimity exists regarding the optimal form of using this group of drugs in a patient with recurrent attacks of migraine. Although all of them may exert their pharmacological effects through a known specific mechanism of action, i.e. agonist effects on serotonin 5-HT (1B/1D) receptors, distinct differences exist. The author comment a few facts on the prescription of triptans and possible adverse effects, depending on the clinical scenario. Thus, even though an enormous amount of information has accumulated over the last few decades on triptans, several questions remain to be answered, and research priorities need to be addressed.

Keywords: Triptans, Adverse Effect, Migraine, Prescription.

RESUMO

Há uma infinidade de artigos que tratam do uso de triptanos no tratamento da enxaqueca, mas até agora não existe unanimidade em relação à forma ideal de usar esse grupo de medicamentos em um paciente com ataques recorrentes de enxaqueca. Embora todos eles possam exercer seus efeitos farmacológicos através de um mecanismo de ação específico conhecido, isto é, efeitos agonistas nos receptores da serotonina 5-HT (1B/1D), existem diferenças distintas. Os autores comentam alguns fatos sobre a prescrição de triptanos e possíveis efeitos adversos, dependendo do cenário clínico. Assim, embora uma quantidade enorme de informações tenha se acumulado nas últimas décadas sobre triptanos, várias questões ainda precisam ser respondidas e as prioridades de pesquisa precisam ser abordadas.

Descritores: Triptanos, Efeito Adverso, Enxaqueca, Prescrição.

*Correspondence
 Marcelo M. Valença
 E-mail: mmmvalenca@yahoo.com.br

Received: October 2, 2018.
 Accepted: December 12, 2018

DOI: 10.5935/2178-7468.20190021

APÊNDICE E – ARTIGO EM COLABORAÇÃO



Jornal Memorial da Medicina

• 2021, 3(1):1-5 • e-8594, 3674-7109

• DOI: 10.37085/jmem.v3.n1.2021.pgs.1-5

Review

Use of capsaicin as a model in the study of migraine: a literature review

Raisa Ferreira Costa¹  Emanuela Paz Rosas²  Daniella Araújo de Oliveira³  Marcelo Moraes Valença⁴ ¹Postgraduate in Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil²Kelso Asami Immunopathology Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil³Department of Physiotherapy, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil⁴Department of Neuropsychiatry, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, BrazilRaisa Ferreira Costa
raisaferreira@ufpe.brEdited by
Juliana Ramos AndradeKeywords:
Migraine
Pathophysiology
Capsaicin

Abstract

Capsaicin is able to induce mast cell degranulation, an event probably related to the pathophysiology of a migraine attack. The present review study aimed to address the mechanisms of action of capsaicin and other chemical inducers in mast cell degranulation and an interaction of nerves and events that happen in the dura mater with the activation of mast cells. A survey was carried out in the literature, from 1980 to 2019, in different databases, using the following terms: capsaicin, mast cell and dura mater. 36 articles were selected for this review. Studies indicate that the main mechanisms of action of capsaicin are chemical induction through the activation of TRPV1 channels, allowing calcium influx into neurons in the trigeminal ganglion of the dura mater, activating mast cell degranulation, releasing proinflammatory (e.g., histamine, oxide nitric) and vasoactive (e.g., CGRP and substance P) substances. Therefore, the use of capsaicin may be a tool to be used in an animal model to better understand the pathophysiology of migraine.

Received: January 14, 2021
Accepted: January 22, 2021

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	--	---	--

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DE FÁRMACOS USADOS NA PREVENÇÃO DA ENXAQUECA SOBRE A LIBERAÇÃO DE CGRP E DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS DE DURA-MÁTER DE HUMANOS - ESTUDO IN VITRO

Pesquisador: EMANUELA PAZ ROSAS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57692216.5.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.735.594

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS	
Bairro: Cidade Universitária	CEP: 50.740-600
UF: PE	Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588	E-mail: cepocs@ufpe.br

Página 04 de 05

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	--	---	--

Continuação do Parecer: 1.735.594

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 20 de Setembro de 2016

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
 (Coordenador)

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Solicitamos a sua autorização para conduzir um estudo: INFLUÊNCIA DE FÁRMACOS USADOS NA PREVENÇÃO DA ENXAQUECA SOBRE A LIBERAÇÃO DE CGRP E DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS DE DURA-MÁTER DE HUMANOS – ESTUDO IN VITRO na pessoa falecida que está sob sua responsabilidade no Serviço de Verificação de Óbitos desta Universidade. Esta pesquisa é da responsabilidade da pesquisadora Emanuela Paz Rosas – Av. Prof. Moraes Rego, 780, apt 202, bloco A, Várzea, CEP 50670-423 – (81)8878-7615/ (81) 3039-3605, manu_pathy@hotmail.com

Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas; Msc Amanda; Camila Carolinne Silva de Almeida; Telefones para contato: (81) 99945-1030; (81) 98703-7865; (81) 99689-4051; e está sob a orientação de: Dr. Marcelo Moraes Valença; Telefone: (81) 99922-9394; e-mail: mmvalenca@yahoo.com.br

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável. Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

TÍTULO: INFLUÊNCIA DE FÁRMACOS USADOS NA PREVENÇÃO DA ENXAQUECA SOBRE A LIBERAÇÃO DE CGRP E DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS DE DURA-MÁTER DE HUMANOS – ESTUDO IN VITRO

LOCAL DE ESTUDO: Serviço de verificação de óbitos (SVO)

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS: Este termo vem para solicitar a autorização do Sr(a). para que possa ser coletado parte do tecido que está dentro do crânio (dura-máter), do corpo do Sr(a). _____ falecido na data _____, para que seja realizado pesquisa científica com o material coletado do mesmo.

DURAÇÃO DO ESTUDO: A coleta de dados terá a duração de aproximadamente 03 meses e a coleta será realizada apenas uma vez.

RISCOS E DESCONFORTOS: O presente estudo apresenta riscos mínimos, associados apenas à ansiedade dos parentes e ou responsáveis pela pessoa falecida. Há o risco de acidente com o bisel durante o experimento bem como acidente na hora de coletar o material.

BENEFÍCIOS: Proporcionar a fundamentação e desenvolvimento de estudos das possíveis causas da enxaqueca.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a participação do/a senhor(a) e do falecido. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas de arquivo de computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora Emanuela Paz Rosas, no endereço (acima informado), pelo período de no mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago nem o (a) senhor (a) pagará nada para a participação nesta pesquisa. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação do familiar falecido na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – Prédio do CCS - 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

Emanuela Paz Rosas

Assinatura do pesquisador (a)

CONSENTIMENTO DO RESPONSÁVEL PARA A PARTICIPAÇÃO DA PESSOA FALECIDA

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, responsável pelo/a falecido/a: _____, autorizo a sua participação no

estudo: **INFLUÊNCIA DE FÁRMACOS USADOS NA PREVENÇÃO DA ENXAQUECA SOBRE A LIBERAÇÃO DE CGRP E DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS DE DURA-MÁTER DE HUMANOS– ESTUDO IN VITRO.**

Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação dele (a). Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data _____

Assinatura do (da) responsável: _____



Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar. 02 testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO C – ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO

(2016 - 2021)

1. Rosas, E.P.; Ribeiro, F. P. B.; Oliveira, E. B.; Medeiros, P. L.; Leandro, C. V. G.; Paz, S. T.; Lima, A. A.; Senna, S. M.; Silva, W. T. F. E. Effect of advanced glycation end products on the production of nitric oxide and viability of j774 macrophage. SINATER, 2016.
2. Rosas, E.P.; Paz, S. T.; Medeiros, P. L.; Freitas, M. F. L.; Valença, M. M. Otimização do protocolo histológico para visualização de mastócitos em dura-máter humana. XIX Congresso Brasileiro de Histotecnologia., 2017.
3. Paz, S. T.; Rosas, E.P.; Medeiros, P. L. Coloração de Prata PAZ para identificação de fibras reticulares no baço de ratos Wistar sadios. XIX Congresso Brasileiro de Histotecnologia., 2017.
4. **Rosas, E. P.**, Costa, R. F., Paz, S. T., da Silva, A. P. F., de Freitas, M. F. L., & Valença, M. M. (2018). Mecanismos farmacológicos do topiramato na profilaxia e tratamento da enxaqueca: uma revisão. Headache, 9(4), 190-195.
5. Rosas, E. P.; Paz, S. T.; Da Silva, A. A.; de Freitas, M. F. L.; Valença, M. M. In vitro effect of 56 mM KCl on the degranulation of mast cells in human dura mater. In: IX International Symposium on Diagnostics and Therapeutics (SINATER), IV International Symposium on Rare Diseases (RDis) and XII LIKA Scientific Journey, 2018.
6. Rosas, E. P.; Paz, S. T.; Silveira Tavares, A. C.; Costa, R. F.; Silva, A. P. F.; Freitas, M. F. L.; Valença, M. M. Histomorphometric analysis of mast cells in different regions of human intracranial dura In: International Symposium on Diagnostics and Therapeutics (SINATER X), 2019, Recife. SINATER., 2019. v.X.
7. Rosas, E.P.; Paz, S.T.; Medeiros, P.L.2; Freitas, M. F. L.; Valença, M. Modificação da impregnação por prata para visualização de fibras nervosas e mastócitos em dura-máter humana. XXI Congresso Brasileiro de Histotecnologia, 2019, Fortaleza. XXI Congresso Brasileiro de Histotecnologia., 2019.
8. Paz, S. T.; Silveira Tavares, A. C.; Silva, A. P. F.; Paes, F. L. A.; Medeiros, P. L. Estabelecimento e Otimização do Protocolo para o Processamento Histológico Manual In: XXI Congresso Brasileiro de Histotecnologia, 2019, Fortaleza. XXI Congresso Brasileiro de Histotecnologia., 2019.
9. **Rosas, E. P.**, Paz, S. T., de Souza Neta, A. C., Costa, R. F., da Silva, A. P. F., de Freitas, M. F. L., Valença, M. M. (2019). Histomorphometric analysis of mast cells in different regions of human intracranial dura mater. Headache Medicine, 60-62.
10. Valença, M. M.; Rosas, E. P.; Costa, R. F.; et al. Of the available triptans, which should be chosen and how should they be used? Headache Medicine, v.10, n.1, p.29-31, 2019.
11. Costa, R. F., Rosas, E. P.; Valença, M. M. Ação do topiramato sobre a degranulação de mastócitos na dura-máter no rato. Semana do Cérebro, 2020.
12. Costa, R. F., Rosas, E. P., Oliveira, D. A. de, & Valença, M. M. Action of capsaicin in the degranulation of mast cells in dura mater of rats: literature review. XIII CONGRESSO PAULISTA DE NEUROLOGIA, 2021.
13. Costa, R. F., Rosas, E. P., Oliveira, D. A., Valença, M. M. Use of capsaicin as a model in the study of migraine: a literature review: Use of capsaicin as a model in the study of migraine: a literature review. Jornal Memorial da Medicina, 3(1), 1-5, 2021.

14. Estágio em docência:

ORIENTADOR: **Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença**

DISCIPLINA DO ESTÁGIO: **Histologia Geral (HE-245)**

Histologia e Embriologia dos Sistemas (HE-222)

RESPONSÁVEIS PELA DISCIPLINAS: **Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira**

Profa. Dra. Paloma Lys de Medeiros

PERÍODO DE ESTÁGIO: **Agosto – Novembro 2017/ Agosto – Dezembro 2018**