

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

KARINA SCHEUERMANN

**EFEITOS DA AMITRIPTILINA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E
PROLIFERATIVA INDUZIDA POR IMPLANTE DE ESPONJA EM
CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte/MG

Junho de 2021

KARINA SCHEUERMANN

**EFEITOS DA AMITRIPTILINA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA
E PROLIFERATIVA INDUZIDA POR IMPLANTE DE ESPONJA
EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia.

Área de concentração: Patologia geral

Orientadora: Prof. Dra. Paula Peixoto Campos

Coorientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini

Belo Horizonte/MG

Junho de 2021

043

Scheuermann, Karina.

Efeitos da Amitriptilina na Resposta Inflamatória e Proliferativa Induzida por Implante de Esponja em Camundongos. [manuscrito] / Karina Scheuermann. - 2021.

104f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Paula Peixoto Campos Lopes. Coorientador: Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Amitriptilina. 3. Implantes de Medicamento. 4. Anti-Inflamatórios. 5. Indutores da Angiogênese. I. Lopes, Paula Peixoto Campos. II. Capettini, Luciano dos Santos Aggum. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

“EFEITOS DA AMITRIPTILINA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E PROLIFERATIVA INDUZIDA POR IMPLANTE DE ESPONJA EM CAMUNDONGOS”

KARINA SCHEUERMANN

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de **Pós-Graduação em Patologia**, como requisito para obtenção do grau de **Doutor em PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

Aprovada em 02 de junho de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Profª. Dra. Milene Alvarenga Rachid - **Departamento de Patologia Geral – ICB/UFMG**

Prof. Dr. Alfonso Gala García - **Universidade Federal da Bahia/Canela/Salvador**

Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva - **CEFET/MG**

Prof. Dr. Marcos Augusto de Sá - **Departamento de Morfologia – ICB/UFMG**

Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini - **Departamento de Farmacologia – ICB/UFMG - COORIENTADOR**

Profa. Dra. Paula Peixoto Campos Lopes - **Departamento de Patologia Geral – ICB/UFMG - ORIENTADORA**

Belo Horizonte, 02 de junho de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Paula Peixoto Campos Lopes, Professora do Magistério Superior**, em 09/06/2022, às 11:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alfonso Gala García, Usuário Externo**, em 13/06/2022, às 15:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Milene Alvarenga Rachid, Servidor(a)**, em 13/06/2022, às 22:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano dos Santos Aggum Capettini, Professor do Magistério Superior**, em 14/06/2022, às 07:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Augusto de Sa, Professor do Magistério Superior**, em 21/06/2022, às 13:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Sidney Nicodemos da Silva, Usuário Externo**, em 08/07/2022, às 12:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1515805** e o código CRC **D5DF23FC**.

Referência: Processo nº 23072.233566/2022-91

SEI nº 1515805

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Norma (*in memoriam*) e Ademir, e ao meu irmão Klaus por todo o apoio e incentivo. Não foi fácil recomeçar e seguir em frente sem a presença da minha melhor amiga e incentivadora, mas tenho certeza que minha mãe continua zelando por mim como sempre fez.

Aos meus melhores amigos e anjos da guarda, que me acompanharam e apoiaram nessa caminhada tão longa e difícil: Ana Maria, Rose (“pastora”) e Batata (*in memoriam*), muito obrigada por tudo. Agradeço também ao prof. André Klein, por todo o apoio para me ajudar a ingressar no doutorado.

Aos alunos do laboratório de Apoptose & Angiogênese (Departamento de Patologia): Celso, Alejandra, Marcela e Clara. Agradeço pela amizade, apoio e auxílio nos experimentos.

Ao laboratório de Angiogênese e Células-tronco (Lancet - Departamento de Fisiologia e Biofísica), em especial pelo uso do microscópio para captura de imagens, e aos alunos que nos ajudaram nos experimentos: Mariane, Hedden, Elder e Polly.

A prof. Giselle Foureaux Heida (Departamento de Morfologia), pelos experimentos de Pletismografia de cauda.

Ao laboratório de Neurodesenvolvimento (Neurodev - Departamento de Fisiologia e Biofísica), em especial a aluna Ana Luíza pelos experimentos de comportamento animal, e ao professor Bruno Rezende Souza pela orientação.

Ao Diego Carlos dos Reis (Departamento de Fisiologia e Biofísica), pelo auxílio na quantificação de colágeno.

Ao laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental (Departamento de Patologia), pelo uso do microscópio para captura de imagens e utilização de equipamentos, e a Mayra e Samantha pela disposição em ajudar.

Ao laboratório de Patologia das Leishmanioses (Departamento de Patologia), pela utilização de equipamentos, em especial centrífuga e microscópio. Agradeço aos meninos por sempre terem nos recebido com carinho e atenção.

Ao laboratório de Patologia Comparada (Departamento de Patologia), pela utilização do microscópio para captura de imagens, leitor de placas e pela utilização do espaço nos experimentos de imuno-histoquímica.

Ao laboratório de Protozooses (Departamento de Patologia), pela utilização do microscópio para captura de imagens e pela constante disposição em nos ajudar.

Ao laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (Labin-Departamento de Bioquímica e Imunologia), pelos camundongos TLRKO, além do apoio nos experimentos de função vascular. Agradeço a bioterista Maria Helena e aos alunos Wesley, Edenil e Paola.

Ao técnico Jamil (Departamento de Bioquímica e Imunologia), por sempre ter oferecido auxílio a mim e a todos os alunos que o procuram.

Ao técnico Chico (“abacate”) (Departamento de Morfologia), pela amizade e por todas as vezes que me ajudou. Obrigada pelos ensinamentos e pelos momentos divertidos.

Aos técnicos da sala de histologia (Departamento de Patologia), em especial a Luciana, Vânia e Tarcísio. Obrigada por toda a atenção e disposição em ajudar.

Aos bioteristas do ICB e CEBIO: Gilmar, Rinaldo, Bill, Zé Carlos, Carlinhos e Hércules. Agradeço por sempre terem me tratado com carinho e atenção, e por toda ajuda oferecida sempre que possível.

As alunas Camila e Monique (Departamento de Patologia) pelo auxílio nos experimentos de imuno-histoquímica. Obrigada pelos ensinamentos e disponibilidade em ajudar.

A Juliana (Departamento de Farmacologia) pelo auxílio nos experimentos de biologia molecular, citometria de fluxo e imunofluorescência.

Aos orientadores prof. Paula Peixoto Campos (Departamento de Patologia) e prof. Luciano Capettini (Departamento de Farmacologia), e a colaboradora prof. Silvia Passos (Departamento de Fisiologia e Biofísica), pela oportunidade de trabalho, ensinamentos, incentivo e orientação.

Ao Departamento de Patologia e a todos que me ajudaram, em especial a secretária Cintya Menezes pelo apoio, amizade e constante disposição em ajudar.

Ao CNPq pelos 11 meses de bolsa.

Se existe um obstáculo,
Na sua frente, presente,
Dê a volta, não pare nem pense,
Não fique esperando
Que ele saia da sua frente...

Se você tropeçou e caiu,
Não fique chorando as mágoas...
Aprume-se, levante-se, arrume-se,
E continue no seu caminho...
Siga para o seu destino...

E depois, se algum dia precisar,
Olhe para trás, E
sinta saudades,
Veja como tudo mudou...

As coisas passaram,
Os valores mudaram,
Situações se inverteram...
Mas tudo melhora,
Basta saber a hora, E
esperar...
E seguir seu caminho,
Até chegar no seu destino!

Dedico esta tese a minha **mãe** Norma,
de quem recebi o amor mais bonito
que já conheci. Um dia espero poder te
reencontrar fora dos meus sonhos e
lembranças.

Prof. Anilton Cesar Vasconcelos

26/11/77 - Avante

Tom anil...



RESUMO

A amitriptilina (AM) é um fármaco utilizado para tratar várias condições que afetam o sistema nervoso central (SNC), e que se mostra eficaz na prevenção e controle da dor, incluindo as de origem inflamatória. Na literatura estudos mostram que a AM também é capaz de modular processos inflamatórios e proliferativos (angiogênese e fibrogênese) em diversas condições patológicas. No entanto, ainda não foram reportados seus efeitos nesses processos em resposta a implantes de biomateriais. Neste trabalho, utilizamos uma matriz de poliéter-poliuretano (implante subcutâneo) para avaliar os efeitos do tratamento com AM no perfil inflamatório e proliferativo no tecido fibrovascular induzido pelo implante em camundongos C57BL/6. Os animais receberam durante 7 dias, uma vez/dia, 5mg/kg de AM (grupo tratado) ou água filtrada (grupo controle), por gavagem, em dois protocolos de tratamento. No primeiro, o tratamento começou no dia da cirurgia e os implantes foram removidos 7 dias após a implantação. No segundo, o tratamento começou 7 dias após a implantação da esponja e esta foi removida no 14º dia pós implantação. Os marcadores inflamatórios avaliados, mieloperoxidase (MPO), conteúdo de nitrito (NO), níveis de citocinas (IL-6, IFN γ e TNF- α) e quimiocinas (CXCL1 e CCL2), ativação do fator de transcrição NF- κ B (CT $1,22 \pm 0,04$; AM $0,72 \pm 0,08$), número de mastócitos e de células gigantes tipo corpo estranho foram reduzidos de maneira significativa nos implantes quando o tratamento começou 7 dias após a implantação (inflamação crônica). Essa redução também foi observada nos parâmetros vasculares VEGF e IL-1 β , e no número de vasos sanguíneos; assim como nos parâmetros fibrogênicos TGF- β (local e sistêmico), na deposição de colágeno tipos I, III e total (CT 478315 ± 29013 ; AM 170143 ± 30072), e na espessura da cápsula fibrosa formada ao redor do implante. Em contraste, apenas a atividade de MPO, o número de mastócitos e ativação da via do NF- κ B diminuíram quando o tratamento começou no dia da colocação do implante (inflamação subaguda).

Considerando que o implante de biomateriais é um procedimento terapêutico amplamente utilizado, e que respostas adversas à sua implantação podem comprometer a funcionalidade dos dispositivos, nossos resultados

sugerem que a amitriptilina apresenta potencial valor terapêutico como agente anti-inflamatório e antifibrogênico em processos patológicos inflamatórios de longa duração.

Palavras-chave: Amitriptilina, esponja, inflamação, angiogênese, fibrogênese e poliéter-poliuretano.

ABSTRACT

Amitriptyline (AM) is a drug used to treat several conditions that affect the central nervous system (CNS), and it has been shown to be effective in preventing and controlling pain, including those of inflammatory origin. In the literature, studies show that AM is also able to modulate inflammatory and proliferative processes (angiogenesis and fibrogenesis) in various pathological conditions. However, its effects on these processes in response to biomaterial implants have not yet been reported. In this work, we used a polyetherpolyurethane matrix (subcutaneous implant) to evaluate the effects of AM treatment on the inflammatory and proliferative profile in fibrovascular tissue induced by the implant in C57BL/6 mice. The animals received for 7 days, once/day, 5mg/kg of AM (treated group) or filtered water (control group), by gavage, in two treatment protocols. In the first, treatment started on the day of surgery and the implants were removed 7 days after implantation. In the second, treatment started 7 days after implantation of the sponge and it was removed on the 14th day after implantation. The inflammatory markers evaluated, myeloperoxidase (MPO), nitrite (NO) content, levels of cytokines (IL-6, IFN- γ and TNF- α) and chemokines (CXCL1 and CCL2), activation of the transcription factor NF- κ B (CT 1.22 ± 0.04 ; AM 0.72 ± 0.08), numbers of mast cells and foreign body giant cells were significantly reduced in the implants when treatment started 7 days after implantation (chronic inflammation). This reduction was also observed in vascular parameters VEGF and IL-1 β , and in the number of blood vessels; as well as in the TGF- β fibrogenic parameters (local and systemic), in the deposition of collagen types I, III and total (CT 478315 ± 29013 ; AM 170143 ± 30072), and in the thickness of the fibrous capsule formed around the implant. In contrast, only MPO activity, mast cell number and NF- κ B pathway activation decreased when treatment started on the day of implant placement (subacute inflammation).

Considering that the implantation of biomaterials is a widely used therapeutic procedure, and that adverse responses to its implantation can compromise the functionality of the devices, our results suggest that amitriptyline

has potential therapeutic value as an anti-inflammatory and antifibrogenic agent in long-term inflammatory pathological processes.

Keywords: Amitriptyline, sponge, inflammation, angiogenesis, fibrogenesis and polyether-polyurethane.

ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema representando o delineamento experimental utilizado nos testes de comportamento.....	47
Figura 2 - Esquema representando o delineamento experimental utilizado na avaliação da pressão arterial média por pletismografia de cauda	49
Figura 3 - Delineamento experimental para avaliar os efeitos anti-inflamatórios e antiproliferativos do tratamento com amitriptilina em camundongos com implante de esponja.....	51
Figura 4 - Testes de comportamento.....	57
Figura 5 - Avaliação da pressão arterial média.....	58
Figura 6 - Evidência histológica de que o tratamento com amitriptilina diminui a inflamação crônica, mas não a aguda, induzida pela matriz de esponja.....	60
Figura 7 - Efeito do tratamento com amitriptilina no recrutamento de mastócitos	61
Figura 8 - Características histológicas das células gigantes multinucleadas em implantes de 7 e 14 dias.....	63
Figura 9 - Efeitos do tratamento com amitriptilina no recrutamento/ativação de neutrófilos e macrófagos, e na produção de óxido nítrico.....	66
Figura 10 - Efeitos do tratamento com amitriptilina nos níveis de citocinas no tecido conjuntivo proliferativo fibrovascular.....	68
Figura 11 - Efeitos do tratamento com amitriptilina nos níveis de quimiocinas no tecido conjuntivo proliferativo fibrovascular.....	70
Figura 12 - Efeito do tratamento com amitriptilina na translocação de p65.....	71
Figura 13 - Efeitos sistêmicos do tratamento com amitriptilina.....	72
Figura 14 - Efeitos do tratamento com amitriptilina nos fatores angiogênicos no tecido fibrovascular induzido pelo implante de esponja.....	73

Figura 15 - Efeito do tratamento com amitriptilina na formação de vasos no tecido fibrovascular.....	75
Figura 16 - Efeitos do tratamento com amitriptilina nos níveis local e sérico de TGF- β 1.....	77
Figura 17 - Efeitos do tratamento com amitriptilina na deposição de colágeno no tecido fibrovascular.....	78
Figura 18 - Características histológicas da cápsula fibrosa dos implantes.....	80

ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AM	Amitriptilina (grupo tratado)
ASM	Esfingomielinase ácida
ATP	Adenosina 5'-Trifosfato
BAMBI	Inibidor de proteína morfogenética de osso e ativina ligado a membrana
BSA	Albumina de soro bovino
CD14	Diferenciação de Cluster de membrana 14
CEBIO	Centro de Bioterismo
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CCL2/MCP-1	Proteína-1 quimioatraente de monócitos
CCL3/MIP-1α	Proteína inflamatória macrofágica 1 α
CCL4/MIP-1β	Proteína inflamatória macrofágica 1 β
CCL5/RANTES	Ligante 5 de quimiocina C-C/ Células T normais expressas e secretadas
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CXCL8/IL-8	Ligante 8 de quimiocina C-X-C/Interleucina 8
DA	Dopamina
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DCs	Células dendríticas
DMD	Distrofia muscular tipo Duchenne
DO	Densidade Óptica
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
eNOS	Endotelial óxido nítrico sintase
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FGF2//bFGF	Fator de crescimento de fibroblasto básico

FDA	Administração de medicamentos e alimentos
HMGB1	Caixa de grupo de alta mobilidade 1
HSC	Células estreladas hepáticas
HSPs	Proteínas de choque térmico
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
H1, H2 e H4	Receptores histamínicos
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN-γ	Interferon γ
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Interleucina β 1
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
IMAO	Inibidor da enzima monoaminoxidase
iNOS	Sintase de óxido nítrico induzível
ISRS/SSRI	Inibidor seletivo da receptação de serotonina
ISRD	Inibidor seletivo da receptação de dopamina
ISRN	Inibidor seletivo da receptação de noradrenalina/norepinefrina
ISRSN	Inibidor seletivo da receptação de serotonina e da noradrenalina/norepinefrina
KC/CXCL1	Quimiocina da subfamília CXC
LABIN	Laboratório de Lipídeos, Aterosclerose e Bioquímica Nutricional
L-NAME	Éster metílico de N-nitroarginina
LPS	Lipopolissacarídeo
mRNA	RNA mensageiro
MAO	Enzima monoaminoxidase

MCP-1	Proteína-1 quimioatraente de monócitos
MD2	Diferenciação mielóide 2
MPO	Mieloperoxidase
NAG	N-Acetilglucosaminidase
NED	N-(1-Naftill) Etilenodiamina
NE	Norepinefrina
NET	Transportador de norepinefrina
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF-κB	Fator de transcrição NF-κB
NK	Célula assassina natural
NKT	Célula T assassina natural
NO	Óxido nítrico
Nrf2	Fator nuclear 2 relacionado ao eritroide 2
OPD	Dicloridrato de O-fenilenodiamina
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Salina tamponada com fosfato
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGF-BB	Fator-BB de crescimento derivado de plaquetas
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
p53	Proteína citoplasmática
SDS	Dodecil (lauril) sulfato de sódio
Smpd1	Esfingomielina fosfodiesterase 1
SNC	Sistema nervoso central
TAK-242	Inibidor específico de TLR4
TCA(s)	Antidepressivo(s) tricíclico(s)
TGF-β	Fator de crescimento transformador β
TGF-β1	Fator de crescimento transformador β1
TIMP-1	Inibidor tecidual de metaloproteinase-1
TLR(s)	Receptor semelhante a Toll(s)
TLR4	Receptor semelhante a Toll 4
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral α

Treg(s)	Célula T reguladora(s)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF(s)	Fator de crescimento endotelial vascular(s)
VEGFA	Fator A de crescimento endotelial vascular
WT	Tipo selvagem (grupo controle)
5-HT	Receptores de serotonina 5-HT (5-hidroxitriptamina)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO – Revisão da literatura.....	21
1.1 Amitriptilina.....	21
1.1.1 Efeitos anti-inflamatórios.....	22
1.1.2 Efeitos antiproliferativos.....	23
1.1.2.1 Angiogênese.....	23
1.1.2.2 Fibrogênese.....	25
1.2 Reparo tecidual.....	27
1.2.1 Fase inflamatória.....	27
1.2.2 Fase de proliferação ou de granulação.....	29
1.2.2.1 Angiogênese e resposta imune.....	30
1.2.3 Fase de remodelamento ou de maturação.....	32
1.2.4 Interação entre biomateriais e sistema imune.....	33
1.3 Biomateriais.....	40
1.3.1 Modelo de implante de esponja.....	42
1.4 Reposicionamento de medicamentos.....	44
2. JUSTIFICATIVA.....	45
3. OBJETIVOS.....	45
3.1 Objetivo geral.....	45
3.2 Objetivos específicos.....	45
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1 Animais.....	46
4.2 Testes de comportamento.....	46
4.3 Pletismografia de cauda.....	48
4.4 Modelo experimental.....	49
4.5 Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO).....	52
4.6 Determinação da atividade de N-acetilglucosaminidase (NAG).....	52
4.7 Dosagem de nitrito.....	53
4.8 Dosagem de citocinas e quimiocinas.....	53
4.9 <i>Western blot</i>	54
4.10 Avaliação histológica.....	55
4.11 Análise estatística.....	55
5. RESULTADOS.....	56
5.1 Testes de comportamento.....	56
5.2 Pletismografia de cauda.....	58
5.3 Efeitos anti-inflamatórios da amitriptilina.....	59
5.3.1 Avaliação histológica dos componentes celulares.....	59
5.3.2 Avaliação histológica do recrutamento de mastócitos.....	61
5.3.3 Avaliação histológica das células gigantes de corpo estranho.....	62
5.3.4 Avaliação do recrutamento de neutrófilos e macrófagos, e da produção de óxido nítrico	65
5.3.5 Avaliação dos níveis de citocinas no tecido conjuntivo proliferativo fibrovascular.....	67
5.3.6 Avaliação dos níveis de quimiocinas no tecido conjuntivo proliferativo fibrovascular.....	69
5.3.7 Avaliação da translocação de p65.....	70

5.3.8 Avaliação dos níveis séricos de TNF- α	72
5.4 Efeitos antiproliferativos da amitriptilina.....	72
5.4.1 Avaliação dos fatores angiogênicos no tecido fibrovascular induzido pelo implante de esponja.....	72
5.4.2 Avaliação da formação de vasos no tecido fibrovascular induzido pelo implante de esponja.....	74
5.4.3 Níveis de TGF- β 1 no soro e no implante de esponja.....	76
5.4.4 Deposição de colágeno no tecido fibrovascular induzido pela matriz de esponja.....	77
5.4.5 Avaliação histológica da cápsula fibrosa do implante.....	79
6. DISCUSSÃO.....	81
7. CONCLUSÃO.....	86
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
9. ANEXOS.....	108

1. INTRODUÇÃO – Revisão de literatura

1.1 Amitriptilina

Dentre as classificações dos antidepressivos atualmente usada, uma leva em consideração os principais mecanismos de ação (MORENO *et al.*, 1999; MONCRIEFF *et al.*, 2004; TURNER *et al.*, 2008), que são: Inibidores da enzima monoaminoxidase (IMAO), Inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS ou SSRI), Inibidor seletivo da recaptção de noradrenalina/norepinefrina (ISRN), Inibidor seletivo da recaptção de dopamina (ISRD), Inibidor seletivo da recaptção da serotonina e da noradrenalina/norepinefrina (ISRSN), Antidepressivos tetracíclicos e Antidepressivos tricíclicos (TCAs).

O mecanismo de ação comum aos antidepressivos tricíclicos em nível pré-sináptico é o bloqueio da recaptura de monoaminas, principalmente Norepinefrina (NE) e Serotonina (5-HT), em menor proporção dopamina (DA). Atualmente se considera não haver diferenças significativas quanto à seletividade do bloqueio de recaptura pré-sináptica. Já a atividade pós-sináptica varia de acordo com o sistema neurotransmissor envolvido e geralmente é responsável pelos efeitos colaterais.

A amitriptilina, nomenclatura IUPAC 3-(10,11-diidro-5H-dibenzo"a","d" ciclohepteno-5-ilideno)-N, N-dimetil-1-propanamina, é muito utilizada no tratamento da síndrome depressiva e de estados de ansiedade associados com depressão, e em transtornos gastrointestinais como a doença inflamatória intestinal (QUARTERO *et al.*, 2005; AVILA & BOTTINO, 2006). É um medicamento lipofílico (LÓPEZ-MUÑOZ & ALAMO, 2009; KORNHUBER *et al.*, 2010) e sua biotransformação ocorre por catálise, principalmente pelas enzimas do citocromo P450 (PANKAJ *et al.*, 2012). Ao ser administrada por via oral é rapidamente absorvida no intestino delgado, e ao entrar na circulação portal sofre metabolismo de primeira passagem no fígado. O metabolismo ocorre por duas vias, a N-desmetilação e a hidroxilação de anel, sendo que o metabólito desmetilado da amitriptilina é a nortriptilina, que também possui ação terapêutica. A eliminação da amitriptilina ocorre 35% pela via renal (urina), principalmente na

forma de metabólitos ativos livres ou na forma conjugada; e 8% pelas fezes. Possui meia-vida de 9 a 50 horas (LÓPEZMUÑOZ & ALAMO, 2009), média de 24 horas, e seu pico plasmático é atingido mais rapidamente pelas aminas terciárias metabolizados em grande parte (55-80%) pelo efeito de primeira passagem (DANIELSON, 2004). Por ter meia-vida longa permite que seja administrada como dose única diária.

Atua primariamente como um inibidor da recaptção da serotoninanorepinefrina, com ações fortes sobre o transportador de serotonina e efeitos moderados no transportador de norepinefrina. Tem influência fraca sobre o transportador de dopamina e, portanto, não afeta a recaptção de dopamina. É metabolizada em nortriptilina, potente e seletivo inibidor da recaptção de norepinefrina, o que pode complementar os seus efeitos sobre a recaptção da norepinefrina. Adicionalmente, funciona como um bloqueador dos receptores 5HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₆ e 5-HT₇ (receptores de serotonina), receptores alfa-1-adrenérgicos, receptores histamínicos H₁, H₂ e H₄ e também, como um agonista do receptor sigma (σ) opióide. (DANILOV, 2019; SCHNEIDER *et al.*, 2019).

Além de atuar como antidepressivo tricíclico (TCA), existem relatos de que a Amitriptilina também possui efeitos analgésicos (CASTELLS *et al.*, 2008; MOORE *et al.*, 2015; VAN DEN DRIEST *et al.*, 2017), anti-inflamatórios (VISMARI *et al.*, 2010; LAWSON, 2017; XIA *et al.*, 2019; MEINERS *et al.*, 2019) e antiproliferativos (QUILLIN *et al.*, 2015; ZAAFAN *et al.*, 2019; GUAN *et al.*, 2019), tanto em humanos como em modelos experimentais.

1.1.1 Efeitos anti-inflamatórios

No modelo de edema de pata induzido por carregenina em ratos (modelo de inflamação aguda), tanto a administração intraperitoneal quanto a intracerebroventricular de amitriptilina foram capazes de reduzir a infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMN), a produção das citocinas próinflamatórias TNF- α e IL-1 β , além de reduzir o inchaço na pata inflamada (HAJHASHEMI *et*

al., 2010; VISMARI *et al.*, 2010; SADEGHI *et al.*, 2011; VISMARI *et al.*, 2012). Vale ressaltar que existe uma forte ligação entre o desenvolvimento inflamatório e a geração de dor, pois estudos experimentais estabeleceram que a inibição da migração de células PMN e citocinas próinflamatórias diminui a hiperalgesia evocada por diferentes estímulos inflamatórios (MARCHAND *et al.*, 2005; ABBADIE, 2005; REN & DUBNER, 2010). Portanto, parece possível que o efeito inibitório da amitriptilina na migração de leucócitos e nas concentrações de TNF- α e IL-1 β , pelo menos parcialmente, participe de sua atividade analgésica.

No modelo de colite ulcerativa induzida por ácido acético em ratos (FATTAHIAN *et al.*, 2016), a amitriptilina promoveu a inibição da atividade da mieloperoxidase (marcador da infiltração de neutrófilos) e da infiltração de leucócitos, com conseqüente redução das lesões ulcerativas no cólon.

Além disso, o efeito anti-inflamatório da amitriptilina também foi observado no modelo de distrofia muscular tipo Duchenne (DMD), utilizando camundongos mdx deficientes em distrofina. A DMD é uma doença genética recessiva ligada ao cromossomo X, causada por mutações no gene DMD responsável por codificar uma proteína chamada distrofina que, em conjunto com outras proteínas, forma um complexo importante para a manutenção da integridade da membrana da célula muscular (YIU & KORNBERG, 2008). As fibras musculares danificadas induzem inflamação muscular e são posteriormente removidas por meio de miofagocitose (ANDERSON *et al.*, 1987). O tratamento com amitriptilina reduziu os níveis de inflamação no músculo esquelético dos camundongos mdx, com redução da área total de inflamação, dos níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6, além de redução da infiltração de células inflamatórias no músculo (MANNING *et al.*, 2014).

1.1.2 Efeitos antiproliferativos

1.1.2.1 Angiogênese

GUAN *et al.*, (2019) utilizaram o modelo de angiogênese do anel aórtico *ex vivo* (ensaio de germinação) e o ensaio de formação de tubo com células endoteliais *in vitro* para avaliar os efeitos da amitriptilina na capacidade

angiogênica endotelial. Nesse estudo, a AM prejudicou a angiogênese dos anéis aórticos, semelhante ao observado em anéis aórticos com haploinsuficiência do gene *ASM* (*lysosomal acid sphingomyelinase*). No cultivo de células endoteliais microvasculares de camundongos a AM prejudicou a proliferação e a formação de tubo em condições basais, que foram acompanhadas por vias de sinalização angiogênicas atenuadas, como as vias eNOS, Akt e Erk1/2. O silenciamento do gene *ASM* ou a inibição da autofagia é semelhante aos efeitos inibitórios da AM na proliferação de células endoteliais e na formação de tubos. Em conjunto, esses dados sugerem que a AM inibe a proliferação de células endoteliais e a angiogênese por meio do bloqueio do eixo de fluxo autofágico *ASM*. Está implícito que os efeitos colaterais cardiovasculares da AM podem estar associados à sua ação inibitória na angiogênese fisiológica.

ASM reside no lisossomo e geralmente se liga ao folheto da membrana interna por forças eletrostáticas (BECKMANN *et al.*, 2014). Uma vez que a amitriptilina se acumula nos lisossomos, ela interfere na ligação de *ASM* à membrana interna do lisossomo, resultando na sua dissociação e exposição à degradação por proteases lisossomais (BECKMANN *et al.*, 2014). No estudo de GUAN *et al.*, (2019), este efeito inibitório sobre a atividade *ASM* foi mimetizado pela haploinsuficiência do gene *Smpd1* ou silenciamento do gene, e essas manipulações genéticas atenuaram a capacidade angiogênica das células endoteliais de uma maneira semelhante à amitriptilina.

A angiogênese fisiológica tem um papel fundamental na saúde e no crescimento, e em certas configurações patológicas, o aumento da liberação de fatores angiogênicos, como VEGF, causa aumento da angiogênese, que pode desempenhar um papel benéfico ou prejudicial dependendo do tipo da doença (KOFLER & SIMONS, 2015). Por exemplo, o aumento da angiogênese é benéfico para a cicatrização eficiente de feridas e o resgate do miocárdio isquêmico após o infarto do miocárdio (ROBICH *et al.*, 2011; DIPIETRO, 2013). Pelo contrário, o aumento da angiogênese parece ser prejudicial nos processos patológicos de crescimento tumoral, degeneração macular e formação de placa aterosclerótica (FOLKMAN, 2002; MULLIGAN-KEHOE & SIMONS, 2014; IKUNO, 2017). O estudo de GUAN *et al.*, (2019) mostrou que a amitriptilina prejudica a formação do tubo endotelial tanto na condição basal quanto com a

estimulação do VEGF, sugerindo que a AM pode afetar a angiogênese em configurações fisiológicas e patológicas.

MA *et al.*, (2017) mostraram que a ativação de TLR4 de células endoteliais por LPS de *Escherichia coli* aumentou significativamente a formação de microvasos em um sistema de co-cultivo de células endoteliais e osteoblastos humanos, influenciando tanto na angiogênese quanto na osteogênese. Além disso, também ocorreu aumento significativo nos níveis das moléculas de adesão ICAM-1 e E-selectina, das citocinas IL-6 e IL-8 e dos fatores de crescimento VEGF e PDGF-BB, que estão relacionados com a angiogênese. O conhecimento do papel de TLR4 na angiogênese pode ser importante para compreender os mecanismos envolvidos no reparo tecidual, além de permitir a busca por inibidores, como a amitriptilina, que é capaz de bloqueá-lo de forma eficiente (HUTCHINSON *et al.*, 2010), podendo então ser utilizada na modulação das respostas que envolvem esse receptor.

1.1.2.2 Fibrogênese

No modelo de fibrose pulmonar em ratos usado por ZAAFAN *et al.*, (2019), o tratamento com amitriptilina produziu com sucesso um potente efeito antifibrótico ao suprimir a deposição de colágeno e a proliferação de células fibroblásticas no tecido peribronquiolar, e supressão significativa da elevação pulmonar de teor de hidroxiprolina e TGF- β 1. Além disso, o TNF- α pulmonar diminuiu significativamente em ratos tratados com AM, além da evidência de que a AM interfere na sinalização de NF- κ B. Esses resultados sugerem que o efeito anti-inflamatório da AM pode ajudar a aliviar a fibrose e contribuir para seu efeito protetor contra a fibrose pulmonar. Adicionalmente, os ratos tratados com AM também apresentaram uma diminuição acentuada na expressão de p53, mostrando que o potencial antifibrótico da AM também pode ser atribuído à sua capacidade de suprimir a expressão de p53, que é conhecido por contribuir para a fibrose pulmonar. Em conjunto, os resultados deste trabalho mostram que a AM pode suprimir a fibrose pulmonar por meio de mecanismos variáveis

principalmente por inibir a via de NF- κ B/TNF- α , além de inibir a expressão de iNOS e Nrf2.

As células estreladas hepáticas (HSC) são conhecidas por contribuírem para a fibrose hepática, e a ativação da enzima lisossomal esfingomielinase ácida (ASM) está envolvida na ativação dessas células. Levando em consideração que a amitriptilina é um inibidor de ASM, QUILLIN *et al.*, (2015), utilizando um modelo de fibrose hepática, mostrou que os camundongos que receberam tratamento com AM ao mesmo tempo em que a fibrose hepática foi induzida apresentaram diminuição da deposição de colágeno hepático e diminuição da expressão de mRNA dos mediadores fibrogênicos hepáticos TGF- β 1, TIMP-1 (inibidor tecidual de metaloproteinase), colágeno e TNF- α . No mesmo estudo, um grupo de camundongos só começou a receber tratamento com AM 5 semanas após a indução da fibrose, para ver se ela é capaz de atuar na fibrose estabelecida. O tratamento com AM reduziu significativamente a deposição de colágeno, ativação de HSC e preveniu a hipertensão portal, além de melhorar a arquitetura do fígado. Em testes *in vitro* com HSC, AM inibiu completamente a expressão de colágeno induzida por TGF- β 1 e proliferação induzida por fator de crescimento derivado de plaquetas- β - β (PDGF). Juntos, esses resultados mostram que o uso da AM como inibidor de ASM seria uma alternativa interessante no controle da fibrose hepática.

Com base nesta mesma capacidade inibitória de ASM, MORRISSEY, (2009) utilizou um modelo de fibrose renal (obstrução ureteral unilateral) e mostrou que o tratamento com AM promoveu uma redução significativa nas taxas de fibrose renal quando foi fornecida no momento da obstrução estabelecida (3 a 5 dias após a indução da obstrução).

Os estímulos fibrogênicos que atuam nas HSC (células estreladas hepáticas) incluem TGF- β , fator de crescimento derivado de plaquetas, citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células Kupffer e outros (FRIEDMAN, 2008). As HSC humanas expressam TLR4 e seus co-receptores MD2 e CD14 (PAIK *et al.*, 2003), sendo que TLR4 regula positivamente várias quimiocinas, tais como MCP, RANTES, IP10 e inibe o receptor de TGF- β tipo I de BAMBI. A inibição de Bambi por TLR4 aumenta a sinalização de TGF- β nas HSC e assim, tem efeito

promotor sobre o aumento da fibrose hepática (GUO & FRIEDMAN, 2010). Então, a utilização de um inibidor de TLR4, a exemplo da amitriptilina, poderia ser uma alternativa para controlar a fibrose hepática e renal.

Medicamentos que têm como alvo receptores da imunidade inata possuem potencial para serem utilizados tanto no controle da fibrose quanto de cicatrizes, considerando seu mecanismo de ação anti-inflamatória, a exemplo dos inibidores de TLR4. Foi sugerido que TLR4 desempenha um papel importante no desenvolvimento de cicatrizes hipertróficas, pois o tratamento com o seu inibidor TAK-242 reduziu a formação de cicatrizes na pele e em outros órgãos de camundongos e humanos (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014; BHATTACHARYYA *et al.*, 2018b; BHATTACHARYYA *et al.*, 2018a; LI *et al.*, 2019).

1.2 Reparo tecidual

O reparo tecidual é um processo biológico complexo, compreendido por uma série de eventos que ocorrem de maneira sobreposta, porém distintos, que resultam no restabelecimento da integridade e função do tecido. Esses eventos envolvem uma complexa interação entre muitos agentes celulares da pele, principalmente queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais de vasos, células imunes e sua matriz extracelular. O papel do sistema imune neste processo é reconhecer e combater antígenos no local da lesão, participar do debridamento da área lesada e contribuir para a restauração do tecido. Atualmente considera-se que o reparo tecidual é composto por três fases: inflamatória, de proliferação ou de granulação e fase de remodelamento ou de maturação (TSIROGIANNI *et al.*, 2006; GURTNER *et al.*, 2008; EMING *et al.*, 2014).

1.2.1 Fase inflamatória

Ocorre imediatamente após o dano ao tecido, e os componentes da cascata de coagulação, vias inflamatórias e sistema imunológico são

necessários para evitar perdas contínuas de sangue e fluidos, para remover tecidos mortos e desvitalizados e para prevenir infecções. Substâncias vasoconstritoras, principalmente tromboxano A₂ e prostaglandinas, são liberadas pelas membranas celulares. O endotélio lesado e as plaquetas estimulam a cascata da coagulação, sendo que as plaquetas têm papel fundamental na cicatrização. A hemostasia é alcançada inicialmente pela formação de um tampão plaquetário, seguido por uma matriz de fibrina, que se torna o arcabouço para a infiltração das células. Grânulos são liberados pelas plaquetas, as quais contêm TGF- β e também PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas), FGF (fator de crescimento derivado dos fibroblastos), EGF (fator de crescimento epidérmico), prostaglandinas e tromboxanos, que atraem neutrófilos à ferida (BROUGHTON *et al.*, 2006). O coágulo é formado por colágeno, plaquetas e trombina, que servem de reservatório proteico para síntese de citocinas e fatores de crescimento, aumentando seus efeitos. Desta forma, a resposta inflamatória se inicia com vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia (migração de neutrófilos para a ferida).

Os neutrófilos são os primeiros tipos celulares a entrarem na área lesada, predominando até o terceiro dia, e atingindo o pico 48 horas pós-lesão. Essas células limpam a área lesada (fagocitose), impedindo a invasão e a proliferação de micro-organismos (DIEGELMANN & EVANS, 2004; NUNES *et al.*, 2011). Eles são atraídos por substâncias quimiotáticas (citocinas) liberadas por plaquetas e células endoteliais, em resposta à ativação do complemento e aos produtos da degradação de agentes patogênicos (GROSE & WERNER, 2004). Os neutrófilos se aderem à parede do endotélio mediante ligação com as selectinas (receptores de membrana), produzem radicais livres que auxiliam na destruição bacteriana e são gradativamente substituídos por macrófagos (BROUGHTON *et al.*, 2006). As citocinas liberadas por essas células durante o processo de apoptose são importantes no recrutamento de monócitos, que aparecem 48-72 horas pós-lesão e se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos têm papel fundamental no término do debridamento iniciado pelos neutrófilos, além da secreção de citocinas e fatores de crescimento que contribuem na angiogênese, fibroplasia, deposição de colágeno e síntese de matriz extracelular, que são fundamentais

para a transição para a fase proliferativa (MARTIN & LEIBOVICH, 2005; COOPER *et al.*, 2005; BROUGHTON *et al.*, 2006; THURAISINGAM *et al.*, 2010; WRIGHT *et al.*, 2010; MURPHY *et al.*, 2011). Entre os fatores secretados podemos destacar o óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 (RODERO & KHOSROTEHRANI, 2010; KIM & NAIR, 2019).

1.2.2 Fase de proliferação ou de granulação

Essa fase ocorre entre 2–10 dias após a lesão e é caracterizada pela proliferação celular e migração de diferentes tipos de células. Os queratinócitos migram sobre a derme lesada, novos vasos sanguíneos são formados (angiogênese), e os brotos capilares associados a fibroblastos e macrófagos substituem a matriz de fibrina por tecido de granulação, formando um novo substrato para a migração de queratinócitos em estágios posteriores do processo de reparo. Os queratinócitos que estão na linha de frente proliferam e amadurecem e, por fim, restauram a função de barreira epitelial (NAYAK *et al.*, 2009; MURPHY *et al.*, 2011).

Os reguladores positivos mais importantes da angiogênese são o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) e o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2; também conhecido como bFGF) (WERNER & GROSE, 2003). Além disso, a angiogênese também pode resultar do recrutamento de células progenitoras endoteliais derivadas da medula óssea, embora a magnitude dessa contribuição seja pequena, pelo menos em feridas não isquêmicas (onde a concentração de oxigênio é normal) (BLUFF *et al.*, 2007). Posteriormente, os fibroblastos dérmicos que estão nas margens da ferida são ativados por fatores de crescimento liberados no local, e quando estimulados por tensão mecânica e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) se transformam em protomiofibroblastos que expressam fibras de estresse. Os protomiofibroblastos são encontrados no tecido de granulação inicial e no tecido conjuntivo normal com alta carga de tensão mecânica.

Aproximadamente 4 dias pós-ferimento os miofibroblastos aparecem na ferida (TOMASEK *et al.*, 2002), sendo que a tensão mecânica, o TGF- β ativado (MIRASTSCHIJSKI *et al.*, 2010) e a fibronectina isoforma EDA desencadeiam a diferenciação dos protofibroblastos em miofibroblastos que expressam α -actina de músculo liso (HINZ *et al.*, 2001). Os miofibroblastos exercem suas forças contráteis por contatos de adesão focal que ligam o citoesqueleto intracelular a matriz extracelular, aproximando as bordas da ferida. Fibroblastos e miofibroblastos interagem e produzem matriz extracelular, principalmente na forma de colágeno, que acaba formando a maior parte da cicatriz madura (WERNER *et al.*, 2007; RODERO & KHOSROTEHRANI, 2010; MURPHY *et al.*, 2011).

1.2.2.1 Angiogênese e resposta imune

O processo de angiogênese é outro elo das células endoteliais com a imunidade, um componente vital da inflamação aguda e crônica e parte integrante da maioria das condições imunomediadas (CARMELIET, 2005). A angiogênese é o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos pré-existentes, enquanto a remodelação vascular envolve modificações estruturais sem a formação de novos vasos. À medida que a inflamação evolui, os vasos se expandem para fornecer nutrientes que sustentam o acúmulo de células imunes ativadas nos tecidos afetados e, na fase crônica, as células imunes locais superproduzem fatores de crescimento de células endoteliais (CARMELIET, 2003). A contribuição das células endoteliais para a inflamação é bifásica: primeiro, prevalecem as alterações funcionais que incluem dilatação, aumento da permeabilidade, ativação e diapedese; então, ocorrem mudanças estruturais com remodelação capilar e venular (CARMELIET, 2000). Em distúrbios inflamatórios crônicos, ocorre infiltração por macrófagos e linfócitos, dano tecidual e reparo ocorrem simultaneamente, e os vasos recém-formados tornam-se permanentes (MAJNO, 1998; FRANTZ *et al.*, 2005). A expansão anatômica e o aumento da ativação do leito microvascular remodelado

promovem um influxo adicional de células imunológicas, e a angiogênese e a inflamação tornam-se processos co-dependentes (JACKSON *et al.*, 1997).

As células endoteliais em locais de reatividade imunológica apresentam múltiplas anormalidades, variando desde a expressão alterada de moléculas de superfície até a função de barreira. A marca registrada de um vaso em proliferação é a expressão de integrinas, particularmente $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$ (ELICEIRI & CHERESH, 2000), que são essenciais para a angiogênese patológica (MAHABELESWAR *et al.*, 2006). Os vasos angiogênicos regulam positivamente os receptores para fatores angiogênicos produzidos por células imunes e não imunes locais, como fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF ou FGF2), TGF- β e TNF- α , mas fatores de crescimento, citocinas, moléculas de adesão, metaloproteinases de matriz e componentes de matriz extracelular também contribuem para ativação e crescimento de células endoteliais (CARMELIET, 2005).

As respostas imunes inatas e adaptativas promovem a angiogênese, e os macrófagos teciduais promovem o crescimento, remodelação ou regressão dos vasos (MAJNO, 1998; FRANTZ *et al.*, 2005). Sua atividade próangiogênica é mediada por vários TLRs que atuam em sinergia com os receptores de adenosina A2A que regulam positivamente a produção de VEGF (PINHAL-ENFIELD *et al.*, 2003), mas alguns ligantes de TLR, como LPS, estimulam diretamente as células endoteliais que brotam *in vitro* (POLLET *et al.*, 2003). Os peptídeos microbicidas envolvidos na imunidade inata também exibem atividade pró-angiogênica, como a angiogenina 4 e a catelicidina LL37/hCAP-18 (HOOPER *et al.*, 2003; KOCZULLA *et al.*, 2003). Em relação à imunidade adaptativa, as células T ativadas secretam e respondem ao VEGF (MOR *et al.*, 2004), e as células B contribuem para a angiogênese pulmonar em camundongos com infecção crônica por *Mycoplasma* (AURORA *et al.*, 2005). IL-17 é um mediador da migração das células endoteliais e indutor de fatores pró-angiogênicos (NUMASAKI *et al.*, 2003), indicando que a via de IL23/IL-17 pode estar envolvida na angiogênese imune (MCKENZIE *et al.*, 2006).

1.2.3 Fase de remodelamento ou de maturação

A terceira fase começa 2–3 semanas pós-lesão, dura um ano ou mais, e consiste na involução gradual do tecido de granulação e regeneração. Durante esse estágio, todos os processos ativados após a lesão diminuem e cessam, e a maioria das células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos sofre apoptose ou sai da ferida, deixando uma massa que contém poucas células e que consiste principalmente de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular (RODERO & KHOSROTEHRANI, 2010; WRIGHT *et al.*, 2010). As interações epitelial-mesenquimal provavelmente regulam continuamente a integridade da pele e a homeostase (SZABOWSKI *et al.*, 2000), e deve haver ciclos de feedback adicionais para manter os outros tipos de células da pele. Além disso, ao longo de 6-12 meses, a matriz acelular é ativamente remodelada de uma estrutura principal de colágeno tipo III para uma predominantemente composta de colágeno tipo I (LOVVORN *et al.*, 1999). Esse processo é realizado por metaloproteinases da matriz secretadas por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, e fortalece o tecido reparado. No entanto, apesar do tecido nunca recuperar as propriedades da pele não lesada (LEVENSON *et al.*, 1965), a reparação final da matriz extracelular melhora a resistência mecânica do tecido (GERIS *et al.*, 2010).

Os fibroblastos presentes na ferida continuam remodelando colágeno e os vasos sanguíneos regridem deixando uma cicatriz avascular. O tecido resultante é caracterizado pelo aumento da densidade do colágeno, maiores níveis de alinhamento das fibras e proporções diferentes de colágeno I e III dos observados em tecidos normais (CUMMING *et al.*, 2009). As feridas normais têm sinais de “parada” que interrompem o processo de reparo quando o defeito dérmico é fechado e a epitelização se completa. Quando esses sinais estão ausentes ou ineficazes, o processo de reparo pode continuar inabalável e causar cicatrização excessiva e proliferação fibrótica, além de comprometimento funcional e falência de tecidos ou órgãos. A fibrose é caracterizada pelo acúmulo irreversível e remodelamento excessivo da matriz extracelular, e é causada pela ativação e secreção descontrolada de TGF β pelos miofibroblastos. Os fibroblastos normais sequestram o TGF- β 1 latente na matriz extracelular num

complexo com a proteína-1 de ligação a TGF- β (LTBP1), que também interage com a fibronectina. Dentre as variantes de fibronectina, é sua isoforma EDA que demonstrou ser necessária para a ativação de miofibroblastos durante a fibrose (VEISEH *et al.*, 2015; HE & DAI, 2015; WYNN & VANNELLA, 2016; KLINGBERG *et al.*, 2018).

Os implantes de biomateriais estão emergindo como orquestradores chave da resposta imune que podem influenciar na regeneração e no reparo tecidual (SUSSMAN *et al.*, 2014). Portanto, uma melhor compreensão das respostas imunes inatas e adaptativas aos biomateriais é necessária antes que possamos alavancar totalmente seu impacto clínico no reparo tecidual.

1.2.4 Interação entre biomateriais e sistema imune

A engenharia de tecidos é um campo relativamente novo que usa células vivas, materiais biocompatíveis e fatores bioquímicos e físicos, bem como suas combinações, para criar estruturas semelhantes a tecido. Frequentemente, o objetivo final é a implantação dessas estruturas no corpo para reparar uma lesão ou substituir a função de um órgão deficiente. As funções críticas podem ser estruturais (por exemplo, osso, cartilagem), de barreira e relacionados ao transporte (por exemplo, pele, vasos sanguíneos), ou bioquímicos e secretores (por exemplo, fígado e pâncreas). Além de aplicações clínicas, outros usos incluem testes de drogas para avaliação de eficácia e toxicologia, bem como estudos básicos sobre o desenvolvimento de tecidos e morfogênese. O termo medicina regenerativa é frequentemente usada como sinônimo de engenharia de tecidos, mas embora regenerativa frequentemente implica o uso de células-tronco como fonte de células (BERTHIAUME *et al.*, 2011).

As estratégias da engenharia de tecidos podem ser baseadas ou não em scaffolds, e os produtos de degradação liberados pelos dispositivos, assim como as mudanças resultantes dos biomateriais em degradação ativam o sistema imunológico (ANDERSON *et al.*, 2008). A interação entre o sistema imunológico do hospedeiro e o biomaterial depende do tecido ao redor do implante, que irá

conduzir as defesas inatas específicas do tecido e a indução de respostas imunológicas adaptativas. Ou seja, a implantação do mesmo material em locais diferentes provoca respostas distintas (REID *et al.*, 2015). O benefício e a funcionalidade do biomaterial implantado podem ser enfraquecidos pelo desenvolvimento de uma reação inflamatória aguda estéril (reação de corpo estranho) sobrepondo a vascularização e remodelamento do tecido, e terminando com um encapsulamento fibrótico que impede a interação adicional entre o biomaterial e o tecido hospedeiro (ANDERSON, 1988; FRANZ *et al.*, 2011; BROWN & BADYLAK, 2013; BOCCAFOSCH *et al.*, 2014; CHRISTO *et al.*, 2015; REID *et al.*, 2015; VISHWAKARMA *et al.*, 2016; CHUNG *et al.*, 2017). No entanto, a reação de corpo estranho é apenas um resultado possível da implantação de um biomaterial, e a possibilidade de modular essa resposta é a chave para o sucesso na colocação de um implante.

Poucos segundos após a colocação do implante, o sangue dos vasos danificados envolve o biomaterial, iniciando assim a interação com o implante. Em minutos, os componentes do plasma do hospedeiro, incluindo proteínas (albumina, fibrinogênio, fibronectina, vitronectina e gamaglobulinas), lipídios, açúcares e íons, são rápida e espontaneamente adsorvidos na superfície do implante (TANG & EATON, 1993; WILSON *et al.*, 2005). Várias características da superfície do biomaterial (como química, topografia e rugosidade) influenciam o tipo, a quantidade, a composição e as mudanças na conformação das moléculas adsorvidas e posterior recrutamento e adesão de derivados do tecido, inflamatórios, vasculares e células do estroma, nas horas/dias seguintes (VITTE *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013; MILLERET *et al.*, 2015). Essas características são determinantes cruciais da reação do tecido a tais implantes (WILSON *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2014).

O exsudado sanguíneo também contém plaquetas e outros componentes da cascata de coagulação, e a formação de coágulo define a matriz provisória em torno do biomaterial (GORBET & SEFTON, 2004; EKDAHL *et al.*, 2011), levando a mais ativação e agregação plaquetária (WU *et al.*, 2005; CHIUMIENTO *et al.*, 2007) e à clivagem do fibrinogênio em fibrina por meio de trombina (ENGELMANN & MASSBERG, 2013). Além disso, as proteínas do complemento, ativadas em contato com o biomaterial, apoiam sinergicamente a adesão e

ativação plaquetária (HED *et al.*, 1984; ANDERSSON *et al.*, 2005; NILSSON *et al.*, 2007) e o recrutamento e adesão de células imunes adicionais (SZABA & SMILEY, 2002; FLICK *et al.*, 2004), atraídas pelo volume local de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento (ANDERSON *et al.*, 2008; ESCHE *et al.*, 2005). Após a formação da matriz provisória, as respostas inflamatórias agudas e crônicas se sucedem e a intensidade dessas respostas é influenciada pela extensão do dano decorrente da colocação do implante (ANDERSON *et al.*, 2008) e também pelo tipo de biomaterial implantado.

As proteínas de adesão da matriz extracelular, incluindo fibronectina e vitronectina, também se aderem às superfícies de biomateriais (MCFARLAND *et al.*, 2000), e são cruciais na modulação da reação inflamatória, enquanto o fibrinogênio e o complemento estão envolvidos principalmente na ativação do componente celular da inflamação. A fibronectina e a vitronectina aumentam respectivamente a adesão celular (GROTH *et al.*, 1995; JENNEY & ANDERSON, 2000; MCNALLY *et al.*, 2008), promovem a fusão de macrófagos e participam da fase crônica da reação de corpo estranho (SHEN *et al.*, 2004; KESELOWSKY *et al.*, 2007; SHEIKH *et al.*, 2015). Além disso, os leucócitos sofrem ativação por meio dos mesmos sistemas de receptores de superfície que detectam microrganismos estranhos.

Alguns receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), que geralmente interagem com padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) encontrados em microrganismos e expressos principalmente em macrófagos e células dendríticas (AKIRA *et al.*, 2006; (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011), também são capazes de detectar sinais de perigo. Eles induzem respostas imunes dirigidas por moléculas dentro da família de padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Outros sinais de perigo que participam da ativação de leucócitos são alarminas (que incluem HSPs, HMGB1, ATP e ácido úrico). Eles são equivalentes endógenos de PAMPs, e são igualmente reconhecidos por macrófagos e células dendríticas, por meio de PRRs (que aqui atuam como *scavenger*), tais como receptores Toll-like (TLR) e de lectina do tipo C (GRANDJEAN-LAQUERRIERE *et al.*, 2007; BIANCHI, 2007; BABENSEE, 2008). Neutrófilos ativados, recrutados do sangue periférico por fatores quimioatraentes (liberados das plaquetas ativadas do hospedeiro, células endoteliais e células do

tecido lesado), se aderem ao implante (por meio de integrina $\beta 2$) e tentam destruir/degradar o biomaterial por meio de fagocitose, enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio (ROS) liberadas por grânulos citoplasmáticos (WETTERÖ *et al.*, 2000; LABOW *et al.*, 2001; NIMERI *et al.*, 2002; (NIMERI *et al.*, 2003). Além disso, os neutrófilos liberam armadilhas extracelulares (NETs) (BRINKMANN *et al.*, 2004), uma "rede pegajosa" de proteínas granulares, elastase de neutrófilos, DNA de cromatina e histonas (KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013), geralmente envolvidos na captura de patógenos e na prevenção da disseminação da infecção (BRINKMANN *et al.*, 2004). A liberação alterada dos NETs de neutrófilos está envolvida na sustentação da resposta do tecido fibrótico, levando à produção excessiva de uma matriz fibrótica densa (HAHN *et al.*, 2019). A produção indevida de NETs impede a integração entre o tecido e o biomaterial e degrada as citocinas e quimiocinas produzidas por neutrófilos que regulam o processo de cicatrização (SCHAUER *et al.*, 2014; HAHN *et al.*, 2019), prejudicando a resposta de cicatrização e o potencial de regeneração do tecido, e promovendo o encapsulamento fibrótico (SELDERS *et al.*, 2017). Além disso, a liberação de NETs de neutrófilos, incapazes de fagocitar um estímulo prejudicial (BRANZK *et al.*, 2014), pode ser considerada semelhante à formação de células gigantes de corpo estranho pela fusão de macrófagos frustrados (MCNALLY & ANDERSON, 2011).

Após ativação, os neutrófilos sintetizam uma quantidade significativa de sinais imunorreguladores (SCAPINI *et al.*, 2000): CXCL8 (ligante de quimiocina CX), que é a quimiocina mais proeminente, cujos alvos primários são os próprios neutrófilos, CCL2 (ligante de quimiocina C) e CCL4, ambos potentes quimioatraentes e fatores de ativação para monócitos, macrófagos, células dendríticas imaturas e linfócitos (YAMASHIRO *et al.*, 2001). O aumento progressivo dessas quimiocinas promove a infiltração de monócitos e suprime a de neutrófilos, que, sem outros sinais de ativação, sofrem apoptose e desaparecem progressivamente do local onde está o implante (ANDERSON *et al.*, 2008). Ao mesmo tempo, os monócitos circulantes respondem ao quimioatraente (como CCL2, CCL3 e CCL4) e se ligam ao fibrinogênio na matriz provisória do biomaterial, sofrendo assim ativação (ALTIERI *et al.*, 1986; TREZZINI *et al.*, 1988; SHEN *et al.*, 2004) e diferenciação nos macrófagos

classicamente ativados ou "M1" (BADYLAK & GILBERT, 2008; MESURE *et al.*, 2010; SRIDHARAN *et al.*, 2015; SHEIKH *et al.*, 2015). Essas células foram classificadas de acordo com sua capacidade de secretar citocinas próinflamatórias (tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α), quimiocinas (JONES *et al.*, 2007; MESURE *et al.*, 2010) e enzimas.

Macrófagos aderentes promovem a invasão de células inflamatórias adicionais pela secreção de quimiocinas (CCL2, CCL4, CXCL8) (JONES *et al.*, 2007) e também tentam degradar o biomaterial pela liberação de ROS e enzimas degradantes (ZHAO *et al.*, 1991; LYNN *et al.*, 2010), antes de sofrer fagocitose "frustrada" (uma vez que biomaterial é muito grande para ser internalizado), resultando em um aumento da liberação de citocinas (LABROUSSE, 2011; UNDERHILL & GOODRIDGE, 2012). Semelhante ao processo de cicatrização de feridas (MOSSER & EDWARDS, 2008), macrófagos aderentes eventualmente mudam para o fenótipo "M2" (GARG *et al.*, 2013), que secretam citocinas anti-inflamatórias (como IL-10), apresentam uma capacidade degradativa reduzida e promovem atividade de remodelação tecidual, além de induzirem a migração e proliferação de fibroblastos para uma regeneração tecidual eficaz (BROUGHTON *et al.*, 2006). Os eventos de sobreposição da mudança fenotípica M1 para M2 (MOSSER & EDWARDS, 2008), bem como os mecanismos de fagocitose frustrada, resultam na fusão da membrana do macrófago para formar uma célula gigante de corpo estranho (uma marca registrada da inflamação crônica) na superfície do biomaterial. Isso reflete uma tentativa de aumentar sua funcionalidade fagocítica, para se aderir e degradar grandes implantes (ZHAO *et al.*, 1991; KYRIAKIDES *et al.*, 2004). A célula gigante de corpo estranho pode se aderir à superfície do biomaterial por um longo tempo, formando assim uma barreira entre o tecido e o dispositivo e, eventualmente, terminando com a deterioração do implante e/ou perda. Portanto, a plasticidade dos macrófagos permite a sua adaptação aos papéis imunorreguladores, de defesa do hospedeiro e de reparo de tecidos em resposta às propriedades do implante. A formação de célula gigante de corpo estranho é frequentemente um componente de assinatura da reação de corpo estranho induzido por biomaterial e é promovida através da ativação de mastócitos, basófilos e células T auxiliares que secretam IL-4 e IL-13 que mostrou aumentar

a fusão de macrófagos nos biomateriais (BURD *et al.*, 1995; VENKAYYA *et al.*, 2002; BRODBECK *et al.*, 2005).

Os mastócitos também estão presentes no local do implante (CHRISTENSON *et al.*, 1991; TANG *et al.*, 1998; REZZANI *et al.*, 2004), onde degranulam após ativação, liberando histamina (que desempenha um papel no direcionamento de neutrófilos e monócitos para biomateriais implantados) (TANG *et al.*, 1998; ZDOLSEK *et al.*, 2007) e na secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias, angiogênicas e fatores pró-fibróticos (como VEGF e TGF- β) (KANBE *et al.*, 1999; RIBATTI & CRIVELLATO, 2012). Durante a fase inflamatória crônica, as citocinas são produzidas principalmente por linfócitos T ativadas direta ou indiretamente, principalmente células T auxiliares CD4 e seus subconjuntos Th1 e Th2, e sua produção de citocinas modula amplamente as respostas pró- e anti-inflamatórias (BRODBECK *et al.*, 2005). A correlação entre o fenótipo de macrófago M1/M2 e a mudança no perfil de expressão de citocinas de linfócitos Th1 para Th2 sugere que os linfócitos T são fundamentais na promoção da resolução da inflamação e regeneração. Com relação a este aspecto, algumas evidências destacam a importância das primeiras respostas imunes de neutrófilos para a modulação posterior de macrófagos M2 e linfócitos Th2 para a cura funcional (TACCHINI-COTTIER *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2016). O envolvimento de células T na reação de corpo estranho para implantes não fagocitáveis não foi totalmente elucidado; no entanto, foi demonstrado que as células T se ligam ao biomaterial (YOKOYAMA *et al.*, 1986) e se tornam ativadas por meio de vias não canônicas (CURTSINGER *et al.*, 1999; CURTSINGER & MESCHER, 2010; RODRIGUEZ *et al.*, 2008). Eles também aumentam a adesão e fusão de macrófagos em célula gigante de corpo estranho por meio de ações parácrinas de citocinas secretadas (ZIATS *et al.*, 1988; BRODBECK *et al.*, 2005; CHANG *et al.*, 2009). A ação combinada das células imunes resulta na liberação de fatores pró-fibrogênicos, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (SHEN *et al.*, 2006), VEGF (BAO *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2014) e TGF- β (MUSTAFA *et al.*, 2003; GARG *et al.*, 2009), que recrutam fibroblastos.

Na tentativa de reparar o tecido lesado, os fibroblastos ativados depositam colágeno tipos I e III; no entanto, a secreção excessiva resulta num resultado final indesejável de deposição fibrótica de matriz extracelular (a maior proporção de colágeno I/III está associada a uma maior formação de tecido fibrótico) (DIEGELMANN & EVANS, 2004), encapsulando o biomaterial (CASTRO *et al.*, 2012; OVIEDO-SOCARRÁS *et al.*, 2014) e comprometendo a função do implante (RATNER, 2002; RATNER & BRYANT, 2004). A deposição de uma nova matriz é realizada principalmente por fibroblastos e miofibroblastos, os componentes celulares proeminentes na reação fibrótica. Os miofibroblastos compartilham proteínas das células do músculo liso, cuja contração pode contribuir para a formação de cicatriz fibrótica (ROCKEY *et al.*, 2015).

No que diz respeito aos mecanismos pró-regenerativos, macrófagos M2 exibindo um fenótipo anti-inflamatório/antifibrótico contribuem para a regeneração por meio de *crosstalk* com uma subpopulação de células T definidas como regulatórias (Tregs), que desempenham um papel importante na homeostase da imunidade tecidual. Essas células podem mudar a resposta imune local da inflamação para uma cascata de reparo tecidual próregenerativo, sustentando o fenótipo anti-inflamatório/antifibrótico pela secreção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10. Além disso, as Tregs são capazes de melhorar a qualidade da cicatrização induzindo uma resposta do tipo 2, incluindo macrófagos anti-inflamatórios. Após uma diminuição das células T, os níveis de Treg residentes permanecem elevados, provavelmente porque exibem um receptor de fator de crescimento epitelial (EGF-R) (ZAISS *et al.*, 2013; ARPAIA *et al.*, 2015), cuja expressão permite que o fator de crescimento anfirregulina secretado pelos mastócitos mantenha Tregs no local danificado (ZAISS *et al.*, 2013). Uma vez presentes, as Tregs proliferam e regulam positivamente a secreção de anfirregulina, que pode induzir proliferação celular (ZAISS *et al.*, 2015) ou diferenciação e é necessária para a regeneração (BURZYN *et al.*, 2013; WEIRATHER *et al.*, 2014; NOSBAUM *et al.*, 2016). Tregs também podem aumentar a capacidade regenerativa de células-tronco/progenitoras endógenas por meio da secreção de fatores de crescimento.

Além das células e mecanismos relatados acima, cujo envolvimento na resposta aos biomateriais é bem descrito, sugeriu-se que outras células

desempenham papéis na resolução oportuna da inflamação e no processo de regeneração bem-sucedido. Por exemplo, as células dendríticas, semelhantes aos macrófagos, fagocitam partículas e processam sinais de perigo no local da lesão. Embora seu papel exato durante o reparo e regeneração do tecido ainda não seja completamente conhecido (VINISH *et al.*, 2016), estudos mostram que eles desempenham um papel importante no processo de cicatrização do tecido (ANZAI *et al.*, 2012; VINISH *et al.*, 2016). Células dendríticas interagem com células T e células B para iniciar e moldar a resposta imune adaptativa, elas têm atividades imunorreguladoras e influenciam o desenvolvimento de células T tolerogênicas ou anérgicas, dependendo de seu estágio de maturação, localização e ambiente de citocinas (RUTELLA *et al.*, 2006). Além disso, eles induzem a ativação e o crescimento de células T reguladoras (Treg) (RUTELLA *et al.*, 2006; LUTZ & SCHULER, 2002). É sugerido que as células dendríticas primárias reconheçam os biomateriais através das vias de sinalização de receptores de reconhecimento de padrões (BABENSEE, 2008), e dependendo de qual receptor é acionado, a maturação ou inibição das células dendríticas pode ser induzida, contribuindo respectivamente para o alongamento da resposta imune a biomateriais e retardo da cicatrização de feridas, ou para a regulação negativa da resposta inflamatória (KESELOWSKY & LEWIS, 2017).

1.3 Biomateriais

Biomateriais podem ser definidos como dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos (incluindo fluidos biológicos), com aplicações diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas, podendo ser constituídos de compostos de origem sintética ou natural, assim como de materiais naturais quimicamente modificados, tanto na forma de sólidos quanto de géis, pastas ou mesmo líquidos, não sendo necessariamente fabricados, como válvulas cardíacas de porcos e retalhos de pele humana tratados para uso como implantes (PIRES *et al.*, 2015). Os biomateriais desempenham um papel importante na saúde e têm promovido grandes melhorias em diferentes campos biomédicos, como engenharia de tecidos, implantes médicos, administração de

medicamentos e imunoterapia (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011; ROSSI *et al.*, 2015; VISHWAKARMA *et al.*, 2016; WILES *et al.*, 2016; ROSETI *et al.*, 2017). Esse amplo potencial de aplicação depende da capacidade desses materiais de fornecer suportes biocompatíveis, de encapsular e proteger produtos biológicos ativos (células, produtos químicos e proteínas) e permitir a fácil modificação das propriedades químicas e físicoquímicas das substâncias (MATLAGA *et al.*, 1976; KESELOWSKY *et al.*, 2004; WILSON *et al.*, 2005; THEVENOT *et al.*, 2008; GASPERINI *et al.*, 2014; ROSSI *et al.*, 2015).

Dentre os inúmeros tipos de biomateriais, estão incluídos uma ampla gama de compostos que diferem amplamente em função e características estruturais, variando de macromoléculas biológicas de ocorrência natural a revestimentos totalmente sintéticos, tais como cerâmicas, polímeros, metais e compósitos (junção de mais de um tipo de material), assim como de materiais encontrados na natureza. Essa pluralidade de constituição do produto permite uma escolha específica e adequada para cada situação em que o biomaterial será utilizado. Dentre eles, os poliméricos são os mais utilizados na área médica, pelo baixo custo de produção e por permitirem a produção em diferentes arranjos estruturais (WONG & BRONZINO, 2007; HEATH *et al.*, 2013).

Os polímeros podem ser obtidos a partir de reações de polimerização ou por meio de organismos vivos, classificando-se, assim, respectivamente, como sintéticos e naturais, os quais podem ser também quimicamente modificados. Porém, os mais utilizados são os sintéticos devido a sua maior estabilidade durante o uso, por possuírem propriedades bem definidas e reprodutíveis e baixo custo. Além disso, vários dos polímeros sintéticos utilizados na produção de biomateriais apresentam cinética de degradação conhecida e podem ser sintetizados de forma controlada e reprodutível. São facilmente adaptáveis para exercer uma grande variedade de propriedades funcionais, sendo possível manipular, por exemplo, a forma e o tamanho dos dispositivos, assim como suas propriedades mecânicas (como a viscoelasticidade). Nesta categoria, os principais tipos de polímeros são: poliamidas, polietileno, polipropileno, poliacrilatos, fluorocarbonos, poliésteres, poliéters, poliuretanos, entre outros (TIAN *et al.*, 2012; HEATH *et al.*, 2013).

Uma propriedade comum dos biomateriais é a indução de reações imunológicas adversas resultando em inflamação excessiva, comprometimento da cicatrização, encapsulação fibrótica, destruição de tecido ou mesmo isolamento e rejeição de dispositivos médicos. Uma compreensão mais aprofundada da interação material/ambiente biológico é muito necessária, a fim de desenvolver estratégias e soluções para superar os efeitos colaterais do uso desses dispositivos, que ainda representam um importante desafio no campo biomédico.

1.3.1 Modelo de implante de esponja

Os ensaios angiogênicos são preditores confiáveis de certas patologias em particular de crescimento tumoral, metástase, inflamação, cicatrização de feridas, regeneração de tecido, isquemia, doenças cardiovasculares e oculares. Os estudos de indutores e inibidores angiogênicos contam com métodos de angiogênese *in vivo* e *in vitro*, e vários modelos animais também são padronizados para avaliar a angiogênese qualitativa e quantitativa. Os estudos angiogênicos *in vivo* são mais informativos do que *in vitro* devido às complexas atividades celulares e moleculares das reações angiogênicas (HASAN *et al.*, 2004).

Apesar do grande progresso no campo da pesquisa da angiogênese, não há um único modelo angiogênico disponível que possa elucidar completamente todos os mecanismos moleculares envolvidos no processo angiogênico e de neovascularização. Isso, porque alguns fatores exógenos e endógenos dificultam os esforços para desenvolver um sistema ideal. Devido à diversidade celular entre os diferentes tecidos onde a angiogênese ocorre e à interação intrincada entre as diferentes vias de sinalização celular das reações angiogênicas, é uma tarefa árdua desenvolver e validar um ensaio único que seja ideal para todas as situações. Além disso, AUERBACH *et al.*, (1991) afirmam que talvez a limitação mais consistente em todos os estudos seja a disponibilidade de ensaios quantitativos simples, confiáveis e reproduzíveis da

resposta angiogênica, que permitam a quantificação do número de vasos recém-formados e das dimensões dos mesmos.

Dentre os modelos de angiogênese *in vivo* podemos citar: **(1) Ensaio de microbolsa corneal** (*The corneal micropocket assay*) (AUERBACH *et al.*, 1974; GIMBRONE *et al.*, 1974); **(2) Ensaio com membrana corioalantóica embrionária em ovos de galinha** (*Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay*) (AUSPRUNK *et al.*, 1974; FOLKMAN, 1974; AUERBACH *et al.*, 1974; AUSPRUNK *et al.*, 1975); **(3) Ensaio de angiogênese em mesentério de ratos** (*Rodent mesentery assay*) (NORRBY *et al.*, 1986; NORRBY *et al.*, 1990); **(4) Ensaio de angiogênese em matrigel** (*The Matrigel plug assay*) (PASSANITI *et al.*, 1992; ANGHELINA *et al.*, 2006); **(5) Ensaio de angiogênese em disco** (*Disc angiogenesis system (DAS)*) (FAJARDO *et al.*, 1988; HASAN *et al.*, 2004); **(6) Ensaio com implante de esponja** (*The sponge implant assays*) (ANDRADE *et al.*, 1987; HASAN *et al.*, 2004).

No modelo de implante de esponja de poliéter-poliuretano, a resposta do hospedeiro à matriz sintética é análoga à cicatrização. As matrizes esponjosas, inicialmente acelulares e não vascularizadas, são implantadas no tecido subcutâneo do animal, dando início a um processo primariamente gerido por células inflamatórias que se acumulam dentro da esponja e posteriormente, por angiogênese e deposição de matriz extracelular no local da injúria. Com isso, este modelo proporciona um ambiente inflamado, em fase aguda ou crônica, dependendo do tempo em que o implante permanece no espaço subcutâneo. Cada um dos vários componentes do tecido fibrovascular proliferativo (angiogênese, recrutamento e ativação de células inflamatórias e deposição de matriz extracelular) pode ser determinado após retirada e processamento do implante. O modelo de inflamação aguda permite a análise das fases fluidas e celulares do exsudato formado dentro da esponja; enquanto que a inflamação crônica permite a avaliação do tecido de granulação. É possível acompanhar a sequência de alterações histológicas na formação do tecido de granulação e monitorar a cinética de proliferação celular (ANDRADE *et al.*, 1997; BELO *et al.*, 2004; CAMPOS *et al.*, 2006).

Utilizando este modelo é possível identificar efeitos moduladores nos componentes inflamatórios e angiogênicos do tecido recém-formado induzido pela matriz sintética por uma variedade de compostos utilizados para fins farmacológicos diversos, o que nos permite propor estudos sobre novas indicações terapêuticas para medicamentos já conhecidos (ANDRADE *et al.*, 1997; DA ROCHA E SILVA *et al.*, 1998; DE MOURA *et al.*, 2011; CASTRO *et al.*, 2012; ORELLANO *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2015).

1.4 Reposicionamento de medicamentos

A descoberta de novos medicamentos é um processo demorado, trabalhoso, caro e de alto risco, e normalmente leva de 10 a 15 anos para que um novo medicamento seja desenvolvido. Além disso, a cada ano, mais de 90% dos medicamentos falham durante as avaliações do *Food and Drug Administration* (FDA), impedindo seu uso na terapia (WENG *et al.*, 2013; YEU *et al.*, 2015). O custo crescente e o tempo necessário para o desenvolvimento de novos medicamentos significam que para cada dólar gasto em pesquisa e desenvolvimento, estima-se que menos de um dólar do valor investido retorna (HEALTH *et al.*, 2014), o que poderia tornar a indústria farmacêutica menos atraente para os investidores.

O reposicionamento de medicamentos, que é uma estratégia eficaz para encontrar novas indicações para medicamentos já existentes e aprovados, é altamente eficiente, de baixo custo e com riscos reduzidos (ASHBURN & THOR, 2004). As estratégias tradicionais de desenvolvimento de medicamentos geralmente incluem cinco estágios: descoberta e pré-clínica, revisão de segurança, pesquisa clínica, revisão da FDA e monitoramento de segurança da FDA pós-comercialização. No entanto, existem apenas quatro etapas no reposicionamento de um medicamento: identificação do composto, aquisição do composto, desenvolvimento e monitoramento de segurança do FDA pós-comercialização (SJ *et al.*, 2010; DUDLEY *et al.*, 2011).

Além disso, o investimento em pesquisa e desenvolvimento necessário para o reposicionamento de medicamentos é inferior ao das estratégias tradicionais. Custa em média US\$ 300 milhões para desenvolver um novo medicamento usando uma estratégia de reposicionamento, enquanto o custo da estratégia tradicional é de aproximadamente US\$ 2-3 bilhões (DEOTARSE *et al.*, 2015; NOSENGO, 2016). Assim, o reposicionamento oferece a oportunidade de desenvolver medicamentos de forma mais rápida e com menor investimento, além de ser uma estratégia de baixo risco (BRECKENRIDGE & JACOB, 2018; PUSHPAKOM *et al.*, 2018).

2 JUSTIFICATIVA

Considerando que a amitriptilina, além do seu efeito como antidepressivo, também se mostrou eficiente como modulador de respostas inflamatórias e proliferativas (angiogênicas e fibrogênicas), sua utilização pode ser uma estratégia promissora para minimizar a formação de cicatrizes e controlar a fibrose. Visto que o impacto do tratamento com amitriptilina no tratamento de lesões crônicas é relativamente inexplorado, nossa hipótese é de que esse composto também possa modular o processo de reparo no modelo de implante de esponja em camundongos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito subagudo e crônico da amitriptilina na resposta inflamatória e proliferativa (angiogênese e fibrogênese) em um modelo de implante de esponja de poliéter-poliuretano em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da amitriptilina:

- Nos comportamentos do tipo ansioso e depressivo dos camundongos;
- Na pressão arterial média dos camundongos;
- No perfil inflamatório nos implantes de esponja;
- Na produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias e proliferativas nos implantes de esponja e soro;
- Na produção de óxido nítrico (NO) nos implantes de esponja;
- Na ativação de NF- κ B nos implantes de esponja;
- Na contagem de vasos e de células gigantes, na mensuração da espessura da cápsula fibrosa, nos componentes celulares, na contagem de mastócitos e na quantificação da deposição de colágeno tipo I, III e total nos implantes de esponja.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 132 camundongos machos da linhagem C57BL/6, com idades entre 8 a 10 semanas e aproximadamente 25g de peso, provenientes do CEBIO (Centro de bioterismo – ICB/UFMG), distribuídos em 04 experimentos. Em todos os experimentos os animais tiveram livre acesso à água e ração, e foram mantidos em biotério com ciclos de luminosidade de 12h e com temperatura controlada. A utilização dos camundongos e os procedimentos deste projeto foram aprovados pelo CEUA-UFMG (Comissão de ética no uso de animais), através do protocolo 331/2018 (em anexo).

4.2 Testes de comportamento

Os camundongos foram aclimatados à sala de experimentação 30 minutos antes dos experimentos. Após esse período, foram submetidos à caixa de atividade locomotora e 24h depois ao teste de nado forçado. As duas avaliações foram feitas pela manhã.

Caixa de atividade locomotora - Utilizamos um sistema automatizado (Actitrack v2.7.13) para mensurar a atividade locomotora e exploratória dos camundongos. O sistema consiste em uma arena em acrílico que é acoplada a um sistema externo de infravermelho (25 x 25cm), que permite monitorar a distância total percorrida horizontalmente pelo animal. Cada camundongo permaneceu na arena durante 20 minutos em livre exploração, e a caixa foi higienizada com álcool 70% v/v antes que um novo teste fosse iniciado (BRANCHI *et al.*, 2002).

Nado forçado - O teste de nado forçado (NF) foi utilizado para avaliar o comportamento tipo-depressivo e foi conduzido como descrito por PORSOLT *et al.*, (1977). Os camundongos foram individualmente colocados em um cilindro de vidro vertical (17cm de diâmetro x 27cm de altura) contendo água com temperatura entre 26°C a 28°C, onde se movimentavam livremente na água. Nesse teste os seguintes parâmetros foram quantificados: tempo de escalada, frequência de escalada, tempo de imobilidade, frequência de imobilidade e latência para imobilidade durante 6 minutos.

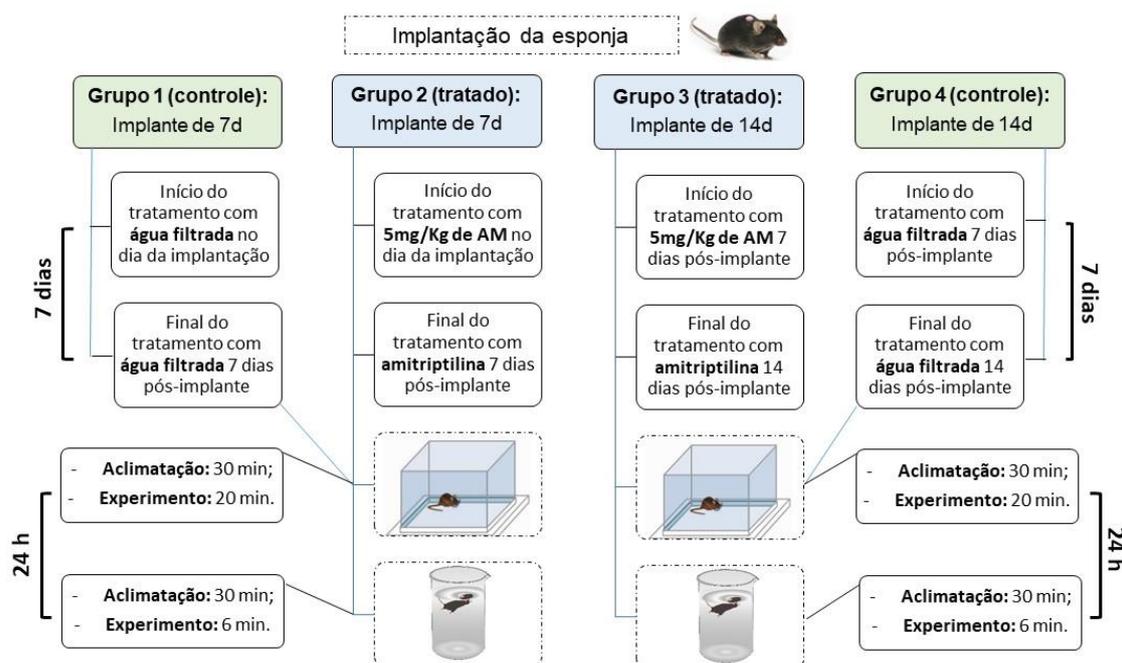


Figura 1 – Esquema representando o delineamento experimental utilizado nos testes de comportamento. Amitriptilina (AM).

4.3 Pletismografia de cauda

Para verificar se a dose de 5mg/Kg de amitriptilina (AM) é segura para utilização nos experimentos *in vivo* durante 7 dias, utilizamos o modelo de indução de hipertensão com L-NAME (FAZAN *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2019; YADAV *et al.*, 2019) para avaliarmos a forma como essa dose e tempo de tratamento interferem na pressão arterial. Para isso, utilizamos 4 grupos, com 7-8 camundongos cada, divididos da seguinte forma: Controle (água filtrada, gavagem), Tratado (5mg/Kg de amitriptilina, gavagem), Hipertenso (10mg/Kg de L-name, intraperitoneal) e Hipertenso tratado (10mg/Kg de L-name intraperitoneal, que 20-30 minutos depois foi tratado com 5mg/Kg de amitriptilina por gavagem).

Os tratamentos foram feitos uma vez/dia, diariamente, até o final do experimento. A pressão arterial média (PAM), pressão sistólica, pressão diastólica, frequência cardíaca (FC) e fluxo sanguíneo da cauda foram avaliados por um sensor de registro de pressão e volume sanguíneo, e por um manguito de oclusão que mede a pressão arterial de camundongos de forma não invasiva (Kent Scientific Corporation, Estados Unidos) (HARTMAN *et al.*, 2012).

Os camundongos foram aclimatados à sala, às gaiolas de contenção e à inflação do manguito de cauda um dia antes do início dos experimentos. A plataforma de avaliação foi mantida a 32-35°C. Em cada sessão os camundongos foram colocados em uma gaiola de contenção para que a cauda fosse inserida em um manguito de compressão que media a pressão sanguínea 8 vezes. Após cada ciclo de medição, a média desses valores foi considerada para cada camundongo, individualmente.

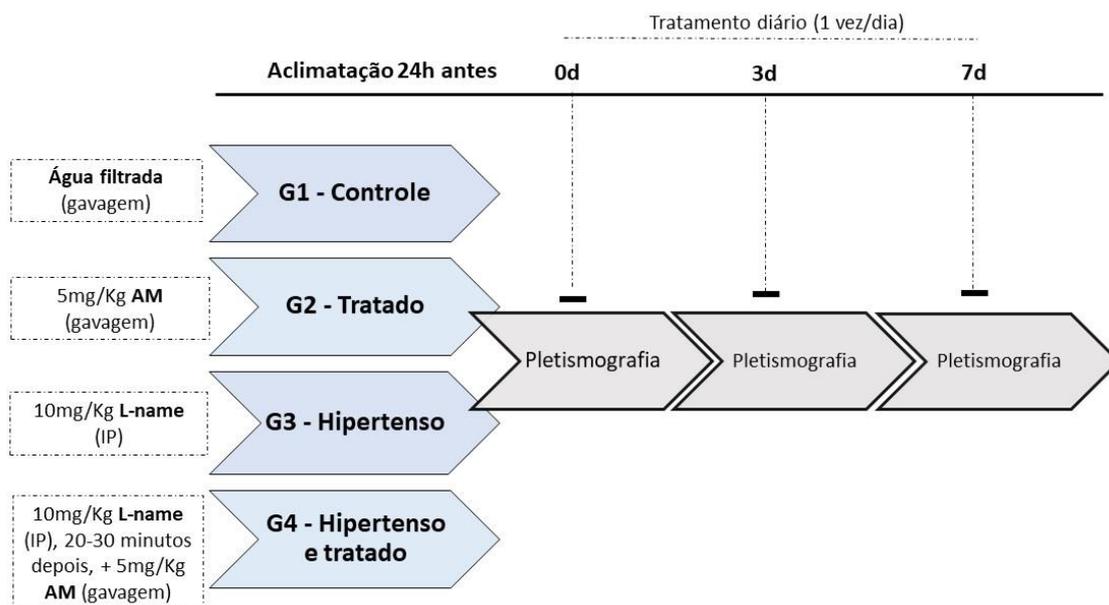


Figura 2 – Esquema representando o delineamento experimental utilizado na avaliação da pressão arterial média por pletismografia de cauda. Amitriptilina (AM), intraperitoneal (IP).

4.4 Modelo experimental

Discos de esponja de poliéter-poliuretano (Vitafoam Ltd., Reino Unido), com 8mm de diâmetro e 5mm de espessura, foram utilizados como matriz para a indução do processo inflamatório (ANDRADE *et al.*, 1987). Para isso, permaneceram imersos em etanol 70% v/v, *overnight*, com posterior desinfecção por fervura em água destilada durante 20 minutos. Antes da cirurgia de implantação das esponjas, os camundongos foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal da mistura de Cetamina (60mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg), tricotomizados, com posterior antissepsia da pele com etanol 70% v/v. O implante foi colocado subcutâneamente na região dorsal, a partir de uma incisão feita próximo a base da cauda (a cerca de 4cm do local do implante), e o fechamento da incisão foi feito com fio de sutura não absorvível.

Após a cirurgia, os camundongos foram mantidos em gaiolas individuais, com dieta normal e água à vontade. Além disso, esses camundongos foram divididos em grupos de 8-10 animais, sendo que o grupo controle recebeu água

filtrada por gavagem, e o grupo tratado recebeu 5mg/Kg de amitriptilina diluída em água filtrada por gavagem, uma vez/dia, diariamente. As eutanásias foram feitas no 7º e 14º dia pós-implante, ambos tendo recebido tratamento com amitriptilina durante 7 dias, porém o grupo 14º dia começou a receber o tratamento a partir do 7º dia pós-implante. Nos dois períodos, os implantes foram cuidadosamente removidos, separados e pesados, assim como o soro, para posterior análises histopatológicas e/ou de marcadores inflamatórios e proliferativos.

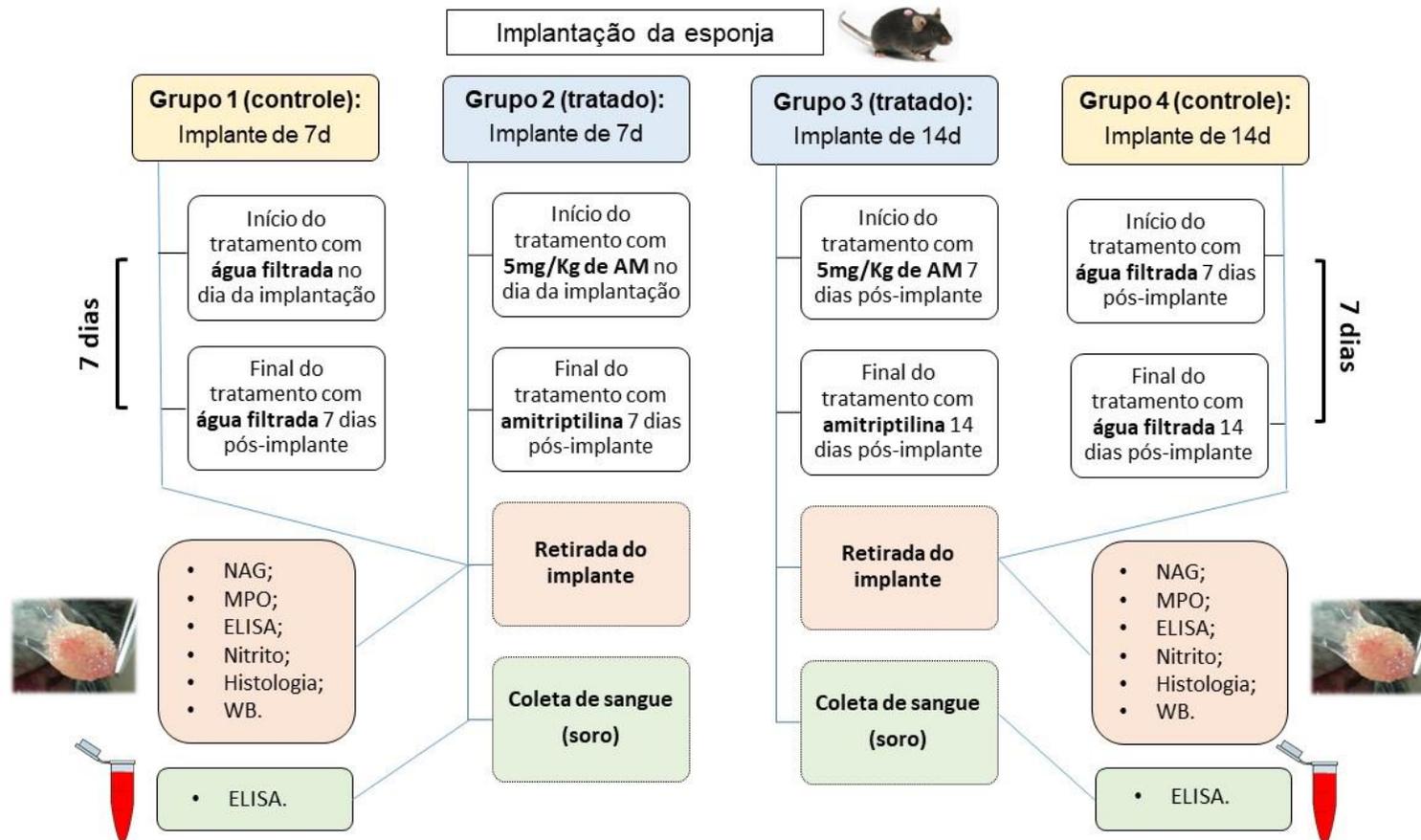


Figura 3 – Delineamento experimental para avaliar os efeitos anti-inflamatórios e antiproliferativos do tratamento com amitriptilina em camundongos com implante de esponja. Amitriptilina (AM)

4.5 Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

A infiltração de neutrófilos nos implantes foi determinada indiretamente pela análise da atividade da mieloperoxidase modificada (BAILEY, 1988; TEIXEIRA *et al.*, 2006). Os implantes foram pesados, homogeneizados em tampão pH 4,7 (NaCl 0,1M, Na₃PO₄ 0,02M e Na₂EDTA 0,015M) e centrifugados a 10.000 x g, a 4°C, durante 15 minutos. Os *pellets* foram então ressuspensos em tampão NaPO₄ 0,05M (pH 5,4) contendo 0,5% de HTAB, seguido por três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. A atividade de MPO no sobrenadante das amostras foi determinada medindo a alteração na absorbância (densidade óptica; DO) a 450nm utilizando TMB (1,6mM) e H₂O₂ (0,3mM) em placas de 96 poços, em duplicata. A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ (4M). Os resultados foram expressos como alteração na DO/mg de tecido úmido.

4.6 Determinação da atividade de N-acetilglucosaminidase (NAG)

A infiltração de macrófagos nos implantes foi quantificada medindo os níveis da enzima lisossômica N-acetilglucosaminidase presente em níveis elevados em macrófagos ativados (BAILEY, 1988; TEIXEIRA *et al.*, 2006). As amostras foram homogeneizadas em solução de NaCl (0,9% v/v) contendo 0,1% v/v de Triton X-100 (Promega, EUA) e centrifugadas a 3.000 x g, a 4°C, durante 10 minutos. Em placas de 96 poços, o sobrenadante das amostras, em duplicata, foi incubado por 30 minutos a 37°C com p-nitrofenil-N-acetil-β-Dglucosaminida (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão citrato-fosfato (C₆H₈O₇ 0,1M, Na₂HPO₄ 0,1M, pH 4,5), em uma concentração final de 2,24mM. A reação foi interrompida pela adição de tampão glicina a 0,2M (pH 10,6). A hidrólise do substrato foi determinada medindo a absorção a 400nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg de tecido úmido.

4.7 Dosagem de nitrito

A produção de óxido nítrico (NO) foi determinada pelos níveis de nitrito de acordo com o método descrito por (GRIESS, 1879), e modificado por (GREEN *et al.*, 1982; CASTRO *et al.*, 2014). As amostras foram homogeneizadas em solução de NaCl (0,9% v/v) contendo 0,1% v/v de Triton X-100 (Promega, EUA) e centrifugadas a 3.000 x g, a 4°C, durante 10 minutos. Em placas de 96 poços, o sobrenadante das amostras e a curva-padrão, em duplicata, foram incubados com a solução de sulfanilamida (sulfanilamida 1% + H₃PO₄ 5%) por 10 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente, o branco, a curva-padrão e as amostras foram incubadas com a solução de NED (NED diluído em água Milli-Q a 0,1%) por 10 minutos, a temperatura ambiente. A leitura foi feita em leitor de placas com filtro de 540nm, e a quantidade de nitrito foi calculada utilizando-se a curva de nitrito de sódio (NaNO₂) como padrão. Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol/mg}$ de tecido úmido.

4.8 Dosagem de citocinas e quimiocinas

As concentrações das citocinas IL-6, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ (próinflamatórias), IL-10 (anti-inflamatória), VEGF e TGF- β (proliferativas) e das quimiocinas CCL2/MCP-1 (controla a migração e infiltração de monócitos/macrófagos) e KC/CXCL-1 (media a ativação e o recrutamento de neutrófilos) foram estimadas no homogenato de esponja através da técnica de ELISA, utilizando-se os kits padronizados pela R&D systems e seguindo as recomendações do fabricante. Para obter o homogenato, os implantes foram homogeneizados com o reagente de Drabkin (Labtest) e centrifugados a 10.000 x g, a 4°C, por 40 minutos. Posteriormente, o sobrenadante das amostras foi filtrado utilizando-se um conjunto de filtro 0,22 μm (Millipore), e o material resultante foi utilizado tanto na dosagem de hemoglobina quanto de citocinas e quimiocinas.

Placas de 96 poços (Nunc, MaxiSorp™) foram incubadas com PBS 1X (pH 7,4) contendo anticorpo de captura, overnight, a 4°C. Após a incubação, as

placas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS 1X pH 7,4 + 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS 1X pH 7,4 + 1% BSA). Após incubação de 2h, as placas foram lavadas, receberam a curva padrão, branco e amostras, e foram novamente incubadas, *overnight*, a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas e incubadas por 2h, a temperatura ambiente, com anticorpo de detecção diluído em tampão de diluição (PBS 1X pH 7,4 + 0,1% BSA). As citocinas e quimiocinas presentes nas amostras foram reconhecidas pelo anticorpo de captura, reveladas pela adição do anticorpo de detecção conjugado à biotina, e pela adição de estreptoavidina conjugada à peroxidase. A revelação da cor ocorreu com a adição do substrato (H₂O₂ + OPD) e após aproximadamente 20-30 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 1M. A intensidade da cor foi determinada por um leitor de placas com um filtro de 492nm. Os resultados foram comparados a uma curva-padrão específica para cada citocina/quimiocina avaliada, e os resultados foram expressos como $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido úmido. Algumas análises também foram feitas no soro, seguindo a mesma metodologia. Porém, os resultados foram expressos como $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.9 Western blot

O *Western blot* foi realizado conforme descrito anteriormente por (CAPETTINI *et al.*, 2011), com modificações. Os implantes de esponja foram dissecados e imediatamente congelados a -80°C. Posteriormente, foram homogeneizadas em tampão de lise (Gyorke) (em $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$: 150 NaCl, 50 TrisHCl, 5 EDTA.2Na e 1 MgCl₂ contendo 1% de Triton X-100 e 0,5% de SDS) mais um coquetel de inibidores de protease (SigmaFAST®, Sigma, EUA) e de fosfatase ($20\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaF; $0,1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na₃VO₄). Para extração nuclear foi utilizado tampão de extração nuclear (solução 1X composta por Tris HCl 20mM, NaCl 420mM, MgCl₂ 1,5mM, EDTA 0,2mM, PMSF 1mM e glicerol a 25% (v/v), ajustado para pH 8,0). Foi feita a desnaturação de 50 μg de proteína, separação por eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% (SDS-PAGE) e transferência para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, EUA). O bloqueio de marcações

inespecíficas foi feito à temperatura ambiente, por 1h, com leite em pó desnatado diluído em PBS 1X a 2,4% e 0,1% Tween 20.

Posteriormente, foi feita a incubação com anticorpo policlonal de coelho antiNF- κ B p65 (1:1000) e anticorpo monoclonal de camundongo anti- β -tubulina (1:1000) a -4°C, overnight. As bandas imunorreativas foram detectadas utilizando anticorpos secundários fluorescentes (Santa Cruz, EUA).

4.10 Avaliação histológica

Os implantes foram fixados em formalina (10% v/v em PBS 1X) durante 24h, e posteriormente foram processados para inclusão em parafina. As seções foram feitas em micrótomo com uma espessura de 5 μ m, e coradas com hematoxilina/eosina (H&E) (contagem de vasos e de células gigantes de corpo estranho, avaliação dos componentes celulares e mensuração da cápsula fibrosa do implante), Dominici (para contagem de mastócitos) e Picrosirius Red (para quantificação de colágeno I, III e total).

Para contagem de vasos, um total de 30 campos/lâmina foram capturados com objetiva de 40X em microscopia óptica (ampliação final de 400X) (CAMPOS *et al.*, 2006). Para contagem de mastócitos, todos os campos foram capturados com objetiva de 40X e analisados. Na coloração com Picrosirius, todos os campos foram capturados com objetiva de 40X em microscópio de luz polarizada, analisados por meio do software ImageJ e os resultados expressos como área em pixels/ μ m² (BEDOYA *et al.*, 2016). Para contagem de células gigantes de corpo estranho e mensuração da cápsula fibrosa do implante, um total de 10 campos/lâmina foram capturados com objetiva de 40X em microscopia óptica (ampliação final de 400X). A mensuração da cápsula foi feita por meio do software ImageJ, e a média das imagens de cada animal foi expressa em μ m (OVIEDO SOCARRÁS *et al.*, 2014).

4.11 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm SEM. A normalidade e homocedasticidade foram determinadas para posterior análise estatística. A análise estatística foi realizada utilizando-se o software *GraphPad Prism 7.0*, e foi considerado estatisticamente significativo um valor de $p \leq 0,05$. As comparações entre os dois grupos (CT e AM) foram feitas através do teste t de *Student* para grupos não pareados.

5 RESULTADOS

5.1 Testes de comportamento

A caixa de atividade locomotora foi utilizada para avaliar a ansiedade dos camundongos após a implantação da esponja, e tratamento de 7 dias com amitriptilina. Durante os 20 minutos em que os camundongos foram avaliados, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na distância total percorrida horizontalmente quando comparamos os grupos controle e tratados, com implante de 7 e 14 dias. (**Fig. 4 A e B**).

O nado forçado foi utilizado para avaliar o comportamento tipo depressivo dos camundongos após a implantação da esponja, e tratamento de 7 dias com amitriptilina. Foi realizado 24h após o teste na caixa de atividade locomotora, e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos parâmetros analisados quando comparamos os grupos controle e tratados, com implante de 7 e 14 dias. (**Fig. 4 K e L**).

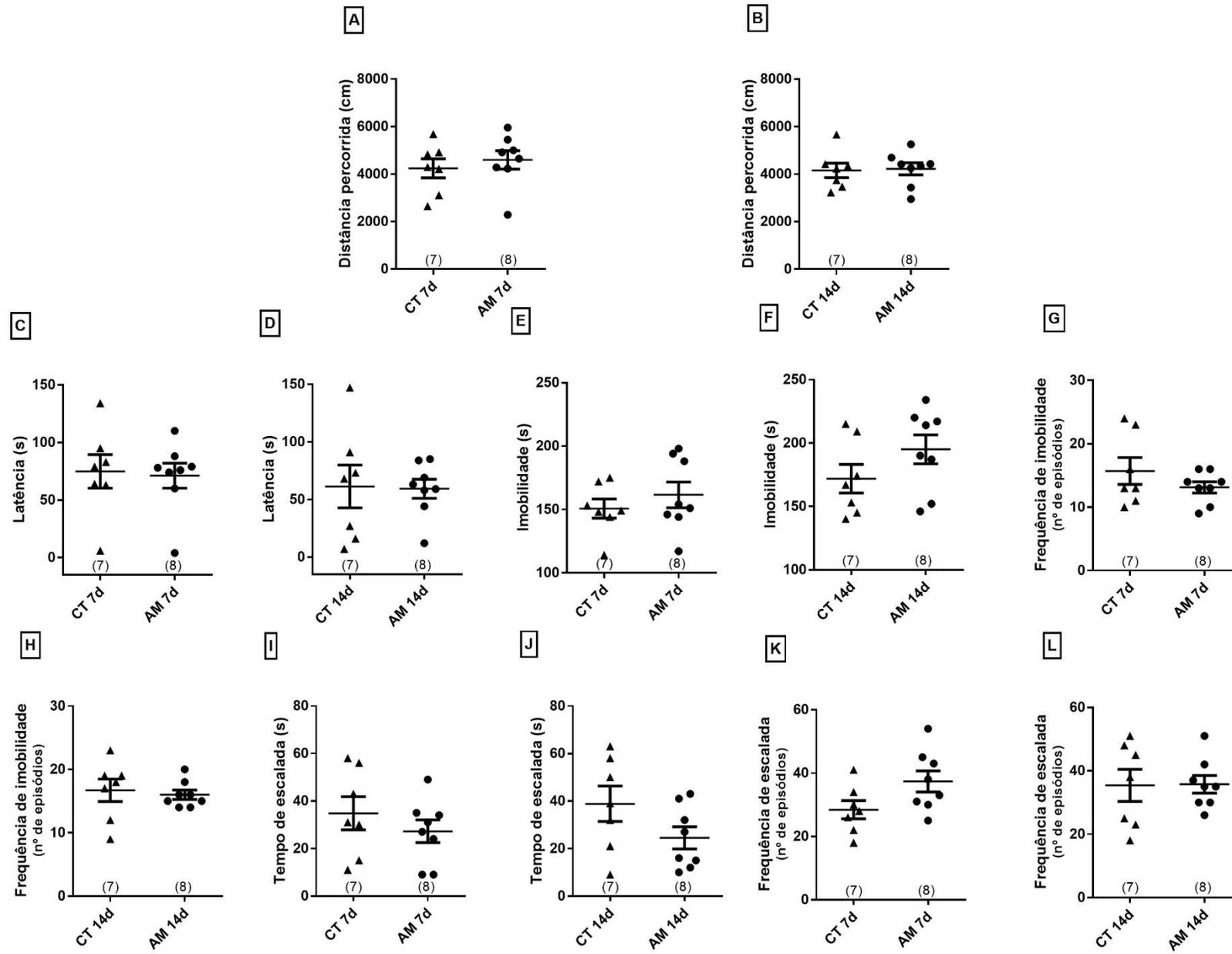


Figura 4 – Testes de comportamento. Caixa de atividade locomotora – Distância percorrida (A e B). Nado forçado – Latência (C e D), Imobilidade (E e F), Frequência de imobilidade (G e H), Tempo de escalada (I e J), Frequência de escalada (K e L). O grupo tratado com AM apresentou comportamento semelhante ao do grupo controle em todas as avaliações, tanto no grupo com implante de 7d quanto no grupo com implante de 14d. Os valores são a média \pm SEM de 7-8 animais em cada grupo.

5.2 Pletismografia de cauda

Para verificar se a dose de 5mg/Kg de amitriptilina (AM) é segura para utilização nos experimentos *in vivo* durante 7 dias, usamos o modelo de indução de hipertensão com L-NAME e pletismografia de cauda, para verificar como essa dose e tempo de tratamento interferem na pressão arterial média dos camundongos. Ao final de 7 dias não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na pressão arterial média dos camundongos tratados com amitriptilina, quando comparados aos controles. CT 3d ($114,1 \pm 2,99$) e AM 3d ($114,5 \pm 2,76$); CT 7d ($101,1 \pm 5,74$) e AM 7d ($108,5 \pm 2,65$) (Fig. 5).

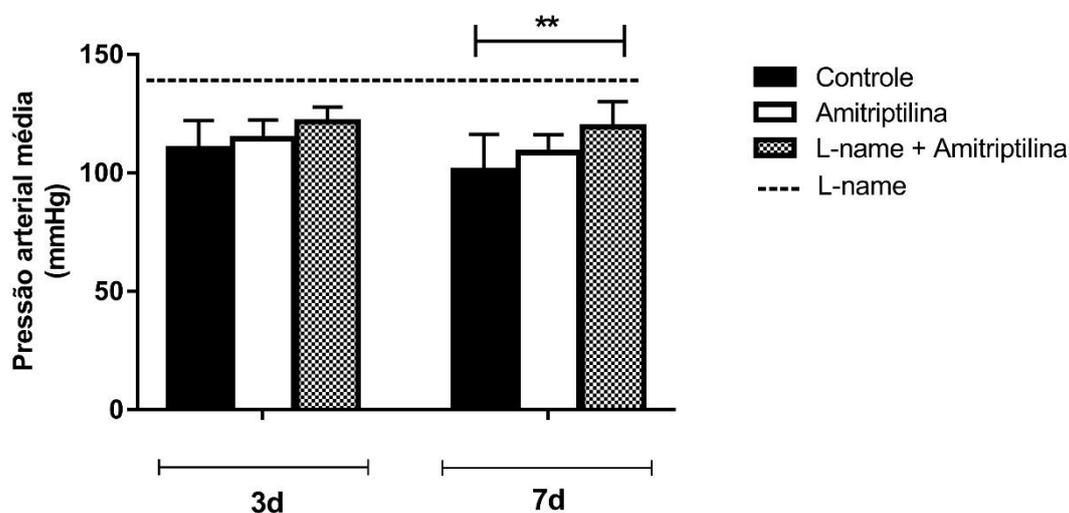


Figura 5 - Avaliação da pressão arterial média. Controle (água filtrada por gavagem), Amitriptilina (5mg/Kg de AM por gavagem), L-name + Amitriptilina (10mg/Kg de L-name IP + 5mg/Kg de AM por gavagem) e L-name (10mg/Kg de L-name IP). O grupo tratado com AM apresentou pressão arterial média semelhante ao do grupo controle. Os valores são a média \pm SEM de 7-8 animais em cada grupo. ** p <0,01 - teste t de Student.

5.3 Efeitos anti-inflamatórios da amitriptilina

5.3.1 Avaliação histológica dos componentes celulares

O tratamento com amitriptilina (AM) promoveu efeito inibidor sobre o componente inflamatório do tecido fibroproliferativo induzido pelo implante, quando o tratamento começou 7 dias após implantação, caracterizado pela redução na celularidade (**Fig. 6 C e D**). Porém, não foi possível observar esse mesmo efeito quando o tratamento com AM começou no dia do implante (**Fig. 6 A e B**).

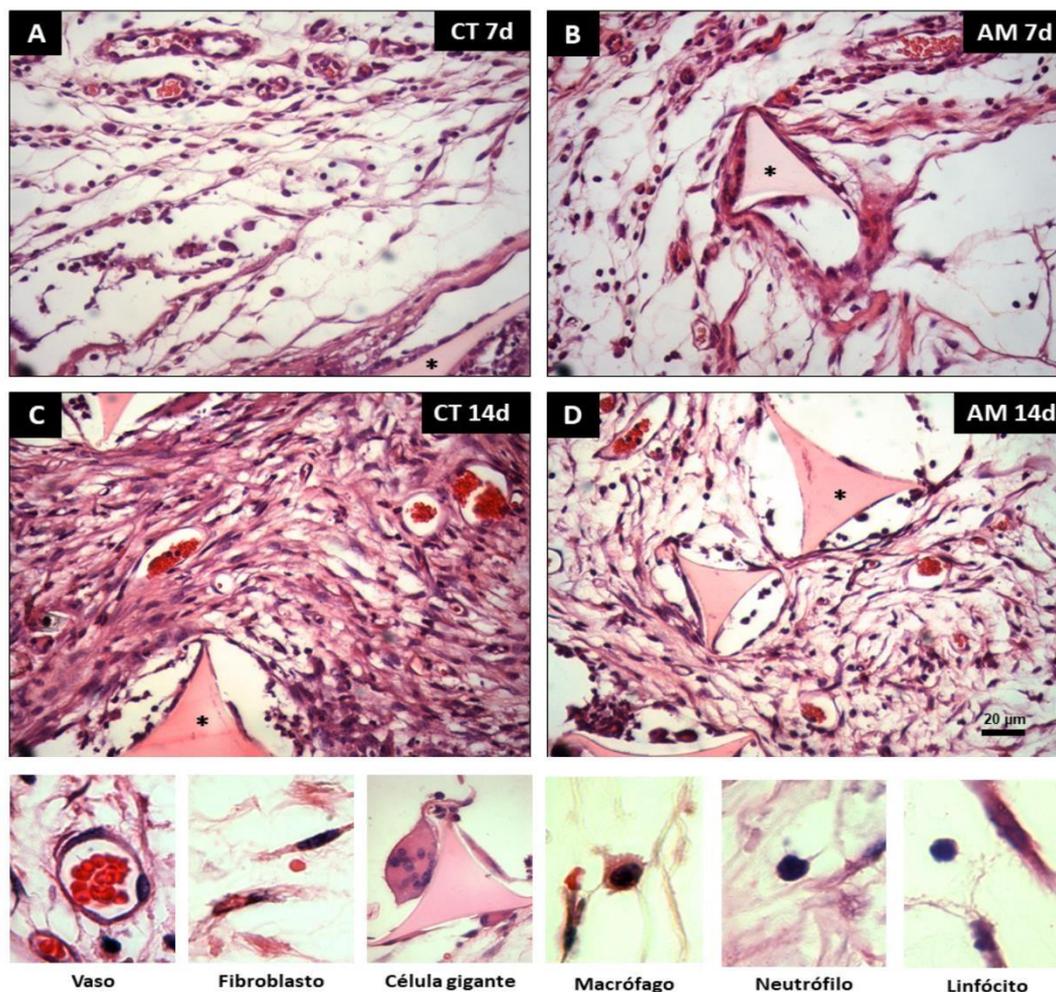
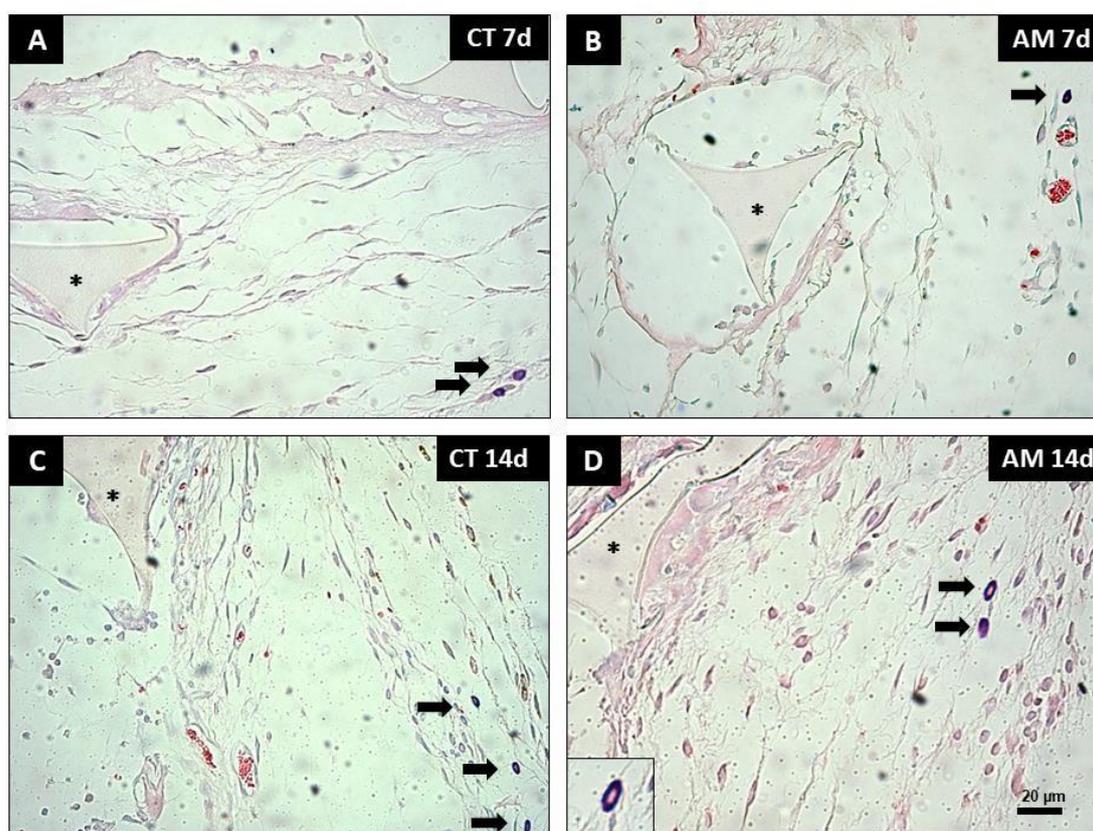


Figura 6 - Evidência histológica de que o tratamento com amitriptilina diminui a inflamação crônica, mas não a aguda, induzida pela matriz de esponja. Cortes histológicos representativos (5µm) de implantes de esponja corados com hematoxilina e eosina (H&E) mostrando o padrão de infiltração no tecido fibrovascular (A-D). Os poros da matriz sintética, vistos em formas triangulares (*), são ocupados por células inflamatórias, fibroblastos e vasos sanguíneos. O tratamento com amitriptilina reduziu a celularidade dos implantes com 14 dias (D), mas não foram observadas diferenças significativas na celularidade entre os implantes de 7 dias (A e B). Grupo controle (CT), grupo tratado com amitriptilina (AM).

5.3.2 Avaliação histológica do recrutamento de mastócitos

Através da coloração de secções de implante com Dominici, observouse que o tratamento com amitriptilina promoveu redução no número de mastócitos/campo quando o tratamento começou no dia da implantação. CT 7d ($2,19 \pm 0,14$) e AM 7d ($1,14 \pm 0,32$) (**Fig. 7 A-B e E**). A mesma significância estatística não foi observada quando o tratamento com AM começou 7 dias após implantação (**Fig. 7 C-D e F**).



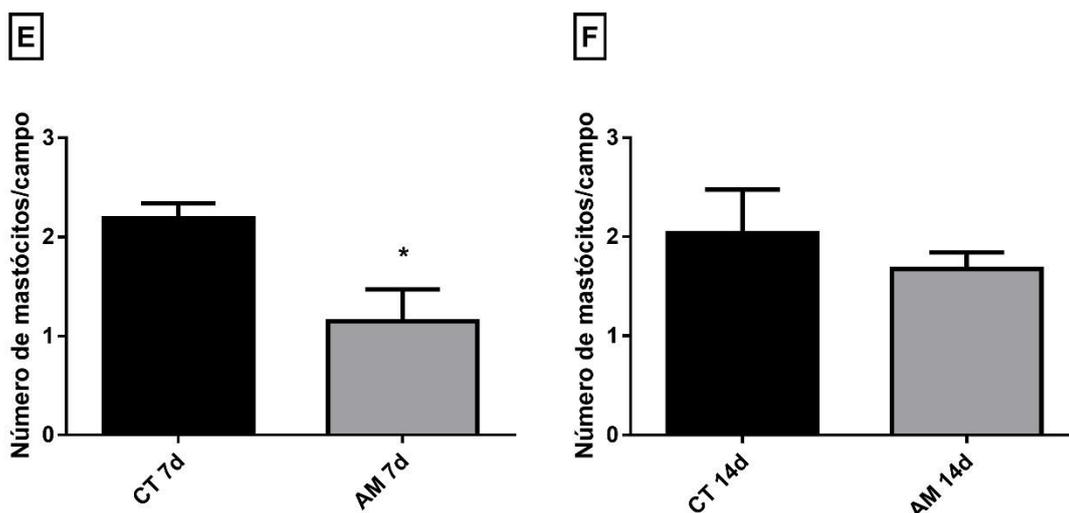
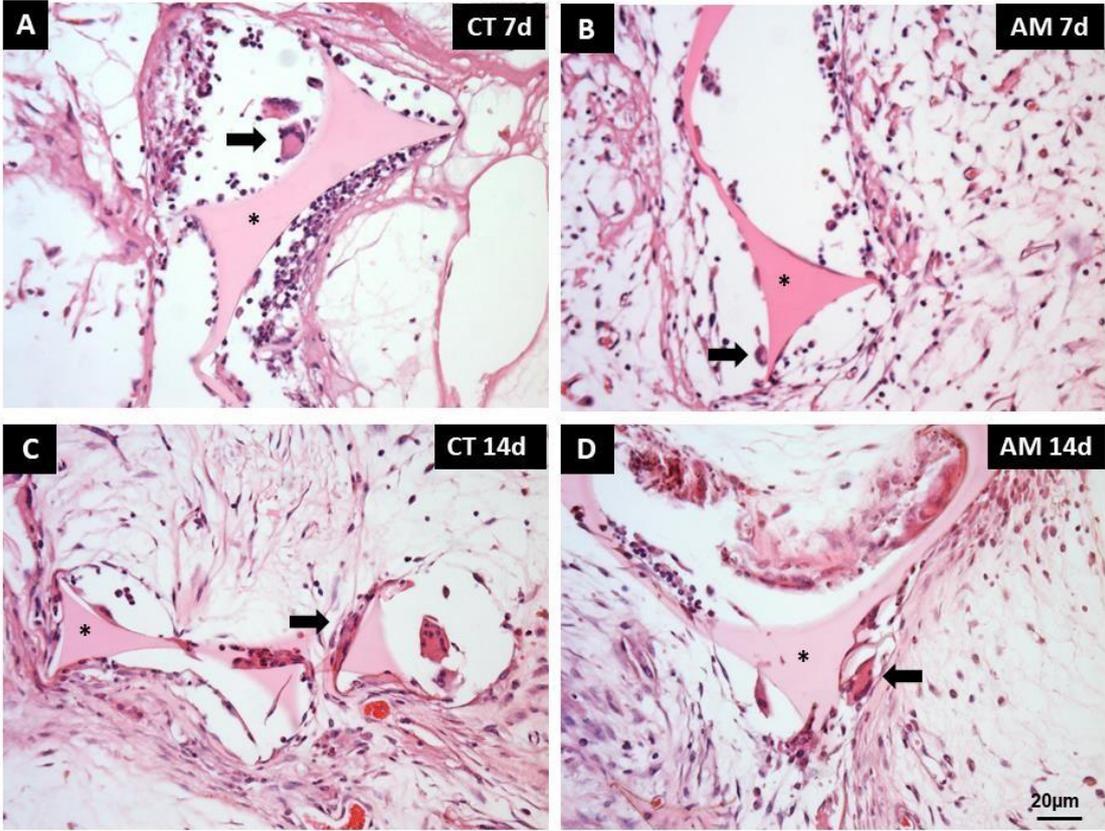


Figura 7 - Efeito do tratamento com amitriptilina no recrutamento de mastócitos. Seções histológicas representativas (5 μ m) de implantes de esponja corados com Dominici, mostrando o número de mastócitos (A-D). Os poros da matriz sintética são vistos como formas triangulares (*). O tratamento com amitriptilina reduziu significativamente o número de mastócitos quando o tratamento foi iniciado no mesmo dia da implantação (E). Setas: mastócitos. Os valores são a média \pm SEM de 5 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ - teste t de Student. Grupo controle (CT), grupo tratado com amitriptilina (AM).

5.3.3 Avaliação histológica das células gigantes de corpo estranho

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas na contagem de células gigantes de corpo estranho/campo quando o tratamento começou 7d após a implantação CT 14d ($5 \pm 0,32$) e AM 14d ($3 \pm 0,26$) (Fig. 8 C-D e F). Porém, não observamos alteração no número de núcleos/célula gigante nos dois esquemas de tratamento (Fig. 8 A-D e G-H).



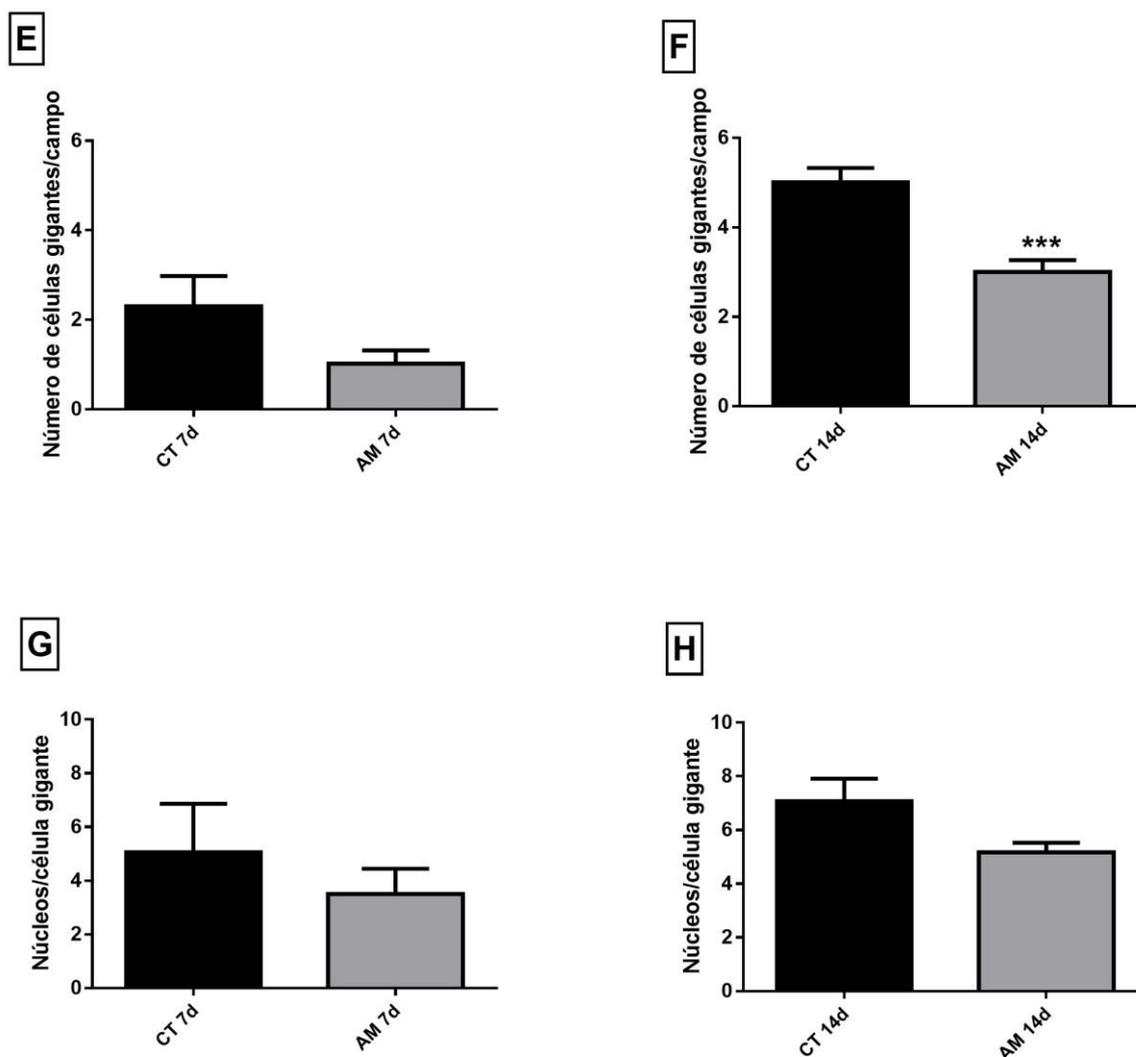


Figura 8 – Características histológicas das células gigantes multinucleadas em implantes de 7 e 14 dias. Cortes histológicos representativos (5µm) de implantes de esponja corados com hematoxilina e eosina (H&E), mostrando o padrão de distribuição das células gigantes de corpo estranho (A-D). O tratamento com amitriptilina promoveu redução estatisticamente significativa no número de células gigantes (E e F) quando o tratamento começou 7d após implantação. Os valores são a média \pm SEM de 5-8 animais em cada grupo. Grupo controle (CT), grupo tratado com amitriptilina (AM). Os poros da matriz sintética são vistos como formas triangulares (*), já as setas indicam a presença das células gigantes. *** $P < 0,001$ - teste t de Student. Grupo controle (CT), grupo tratado com amitriptilina (AM).

5.3.4 Avaliação do recrutamento/ativação de neutrófilos e macrófagos, e da produção de óxido nítrico

O tratamento com amitriptilina (AM) promoveu redução estatisticamente significativa do número de neutrófilos (atividade de MPO) nos dois esquemas de tratamento (no dia da implantação e 7 dias após). CT 7d ($15,84 \pm 4,57$) e AM 7d ($7,16 \pm 1,21$); CT 14d ($18,98 \pm 2,98$) e AM 14d ($8,84 \pm 1,58$) (**Fig. 9 A e B**). Porém, o tratamento com AM não foi capaz de alterar o número de macrófagos (atividade NAG) tanto no implante de 7d quanto no de 14d (**Fig. 9 C e D**). Já a liberação de óxido nítrico (conteúdo de nitrito) no tecido fibrovascular induzido pelo implante foi diminuída pelo tratamento com AM somente quando o tratamento foi iniciado 7 dias após implantação. CT 14d ($0,09 \pm 0,008$) e AM 14d ($0,05 \pm 0,010$) (**Fig. 9 E e F**).

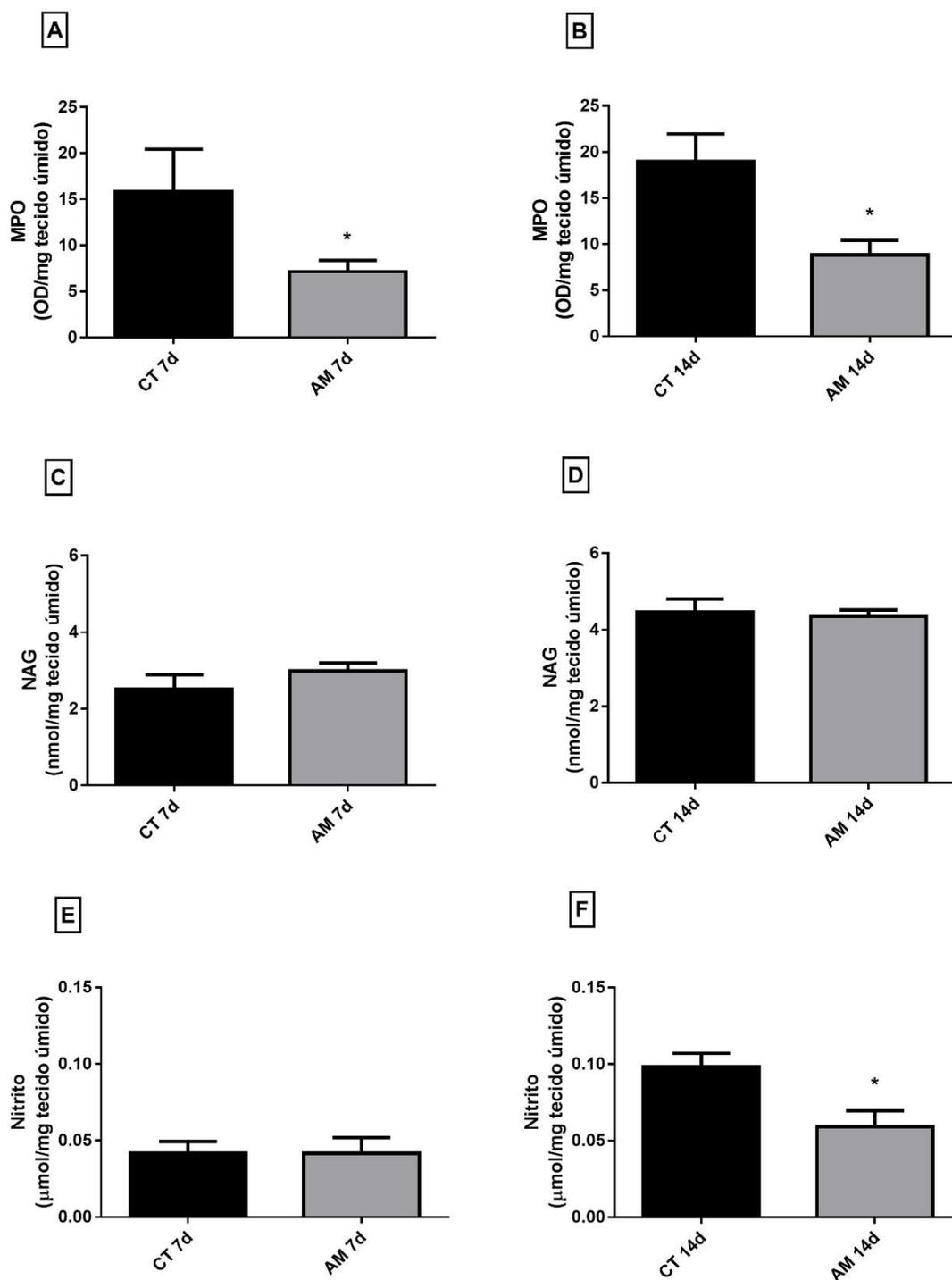


Figura 9 - Efeitos do tratamento com amitriptilina no recrutamento/ativação de neutrófilos e macrófagos, e na produção de óxido nítrico. (A e B) mieloperoxidase - MPO, (C e D) n-acetil-β-Dglucosaminidase - NAG, e (E e F) produção de nitrito - NO. Os marcadores inflamatórios MPO e Nitrito diminuíram significativamente quando o tratamento foi iniciado 7 dias após a implantação, mas não quando o tratamento começou no dia da implantação. Os valores são

a média \pm SEM de 5-8 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ - teste t de Student. Grupo controle (CT), grupo tratado com amitriptilina (AM).

5.3.5 Avaliação dos níveis de citocinas no tecido conjuntivo proliferativo fibrovascular

O tratamento com amitriptilina (AM) também reduziu significativamente os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IFN- γ e TNF- α quando o tratamento começou 7 dias após implantação. IL-6 (CT 14d $0,42 \pm 0,10$) e (AM 14d $0,21 \pm 0,03$) (**Fig. 10 B**); IFN- γ (CT 14d $0,10 \pm 0,01$) e (AM 14d $0,06 \pm 0,005$) (**Fig. 10 D**); TNF- α (CT 14d $1,11 \pm 0,22$) e (AM 14d $0,54 \pm 0,10$) (**Fig. 10 F**). Porém, não foi observada alteração significativa na produção da citocina anti-inflamatória IL-10 nos dois períodos analisados (**Fig. 10 G e H**).

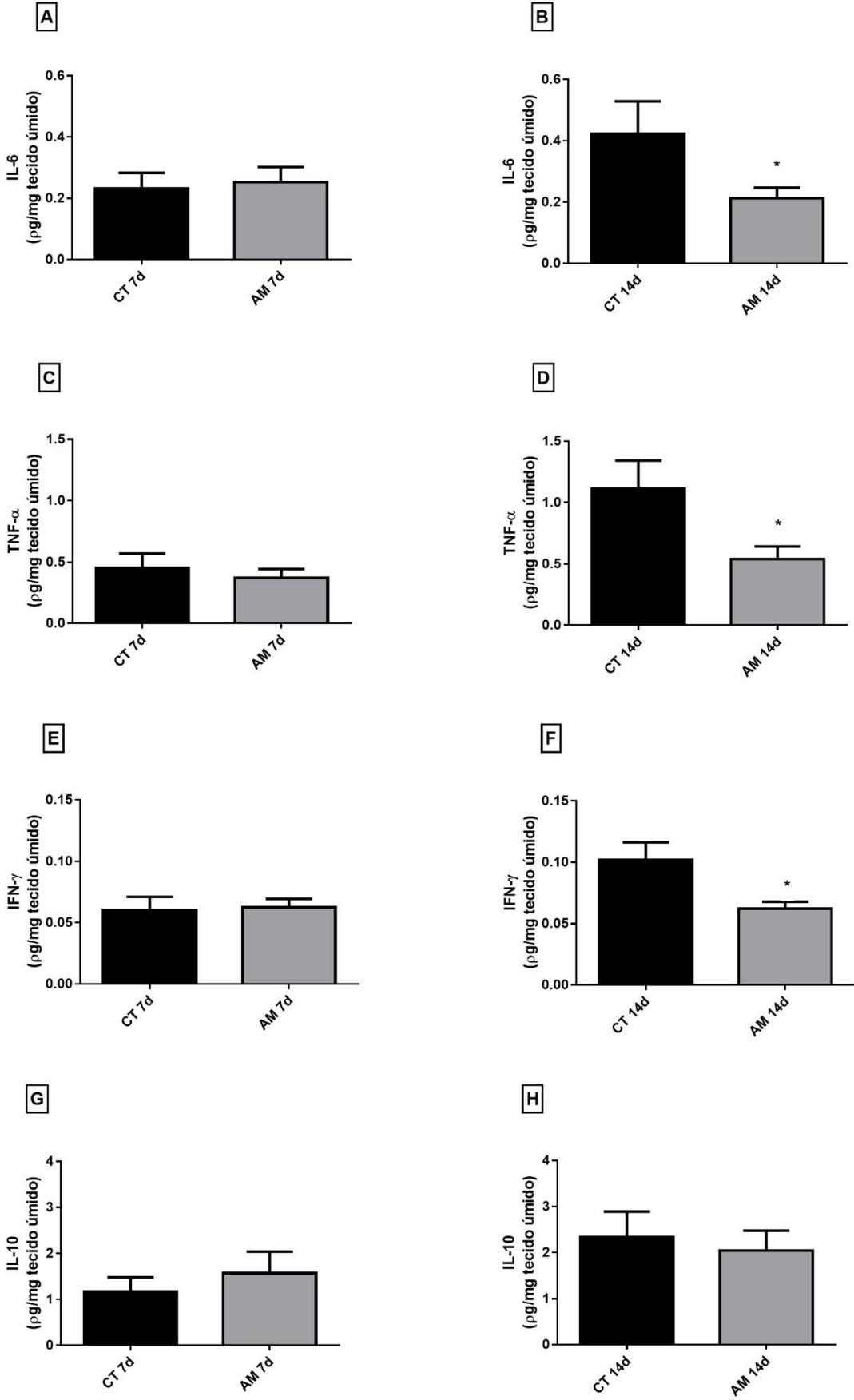


Figura 10 - Efeitos do tratamento com amitriptilina nos níveis de citocinas no tecido conjuntivo proliferativo fibrovascular. (A e B) IL-6, (C e D) TNF- α , (E e F) IFN- γ e (G e H) IL-10. A produção de citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e IFN- γ diminuíram quando o tratamento foi iniciado 7 dias após o implante. A produção de IL-10 não foi afetada pela AM nos dois períodos avaliados. Os valores são a média \pm SEM de 5-8 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ - teste t de Student. Grupo controle (CT), grupo tratado com amitriptilina (AM).

5.3.6 Avaliação dos níveis de quimiocinas no tecido conjuntivo proliferativo fibrovascular

A produção das quimiocinas CXCL1 e CCL2 nos implantes foi significativamente reduzida quando o tratamento com AM começou 7 dias após implantação. CXCL1 (CT14d $0,35 \pm 0,037$) e (AM 14d $0,25 \pm 0,027$) (**Fig. 11 B**); CCL2 (CT14d $1,90 \pm 0,162$) e (AM 14d $1,56 \pm 0,056$) (**Fig. 11 D**). Porém, esse efeito não foi observado quando o tratamento começou no dia da implantação (**Fig. 11 A e C**).

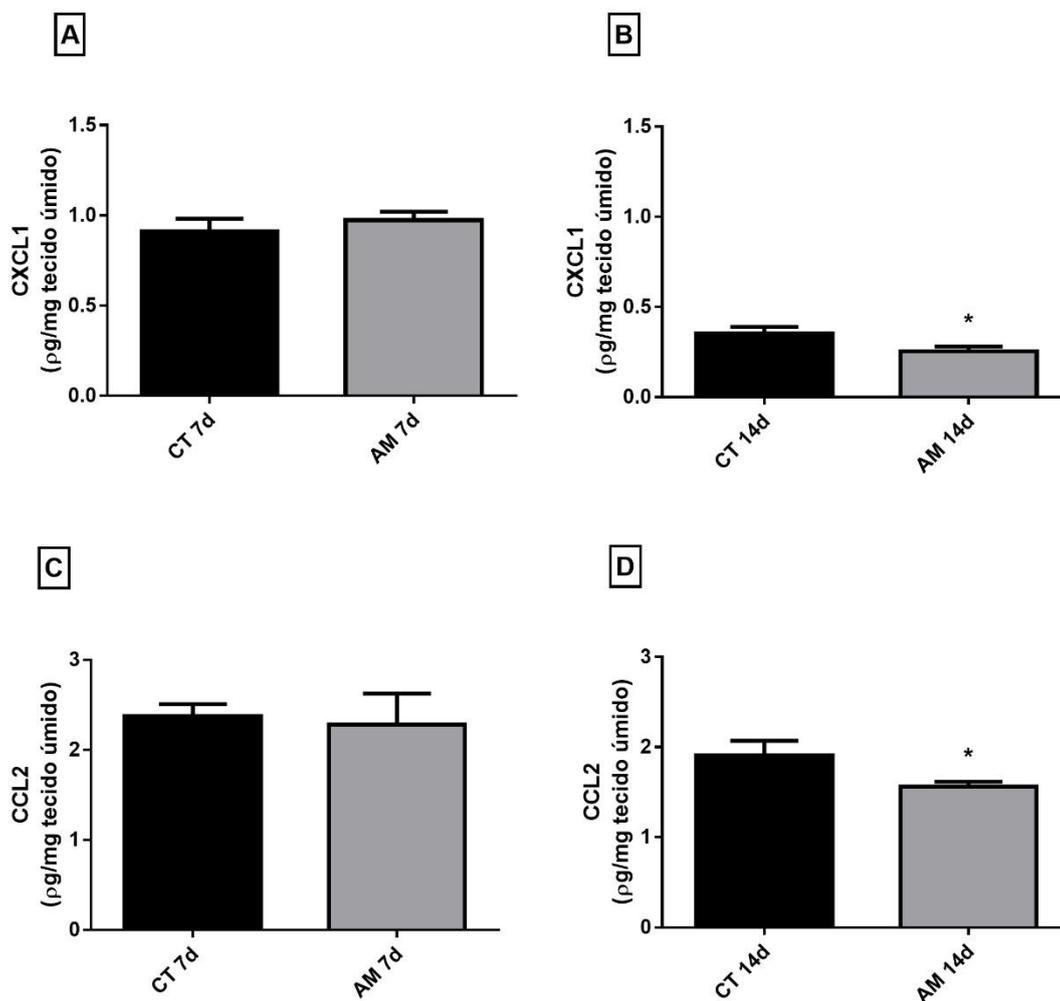


Figura 11 - Efeitos do tratamento com amitriptilina nos níveis de quimiocinas no tecido conjuntivo proliferativo fibrovascular. (A e B) CXCL1 e (C e D) CCL2. O tratamento com amitriptilina reduziu a inflamação aguda, mas não a crônica, induzida pela matriz da esponja. A produção de quimiocinas diminuiu significativamente quando o tratamento começou 7 dias após a implantação, mas não quando o tratamento começou no dia da implantação. Os valores são a média \pm SEM de 5-8 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ - teste t de Student. Grupo controle (CT), grupo tratado com amitriptilina (AM).

5.3.7 Avaliação da translocação de p65

A avaliação da expressão de p65 por *Western blotting* também confirmou os efeitos anti-inflamatórios da amitriptilina, pois o tratamento reduziu

significativamente a translocação de p65 para o núcleo e, conseqüentemente, reduziu a expressão de NF- κ B nos implantes tanto de 7 quanto de 14 dias. CT 7d ($1,22 \pm 0,047$) e AM 7d ($0,72 \pm 0,087$); CT 14d ($0,59 \pm 0,168$) e AM 14d ($0,19 \pm 0,035$) (Fig. 12 A e B).

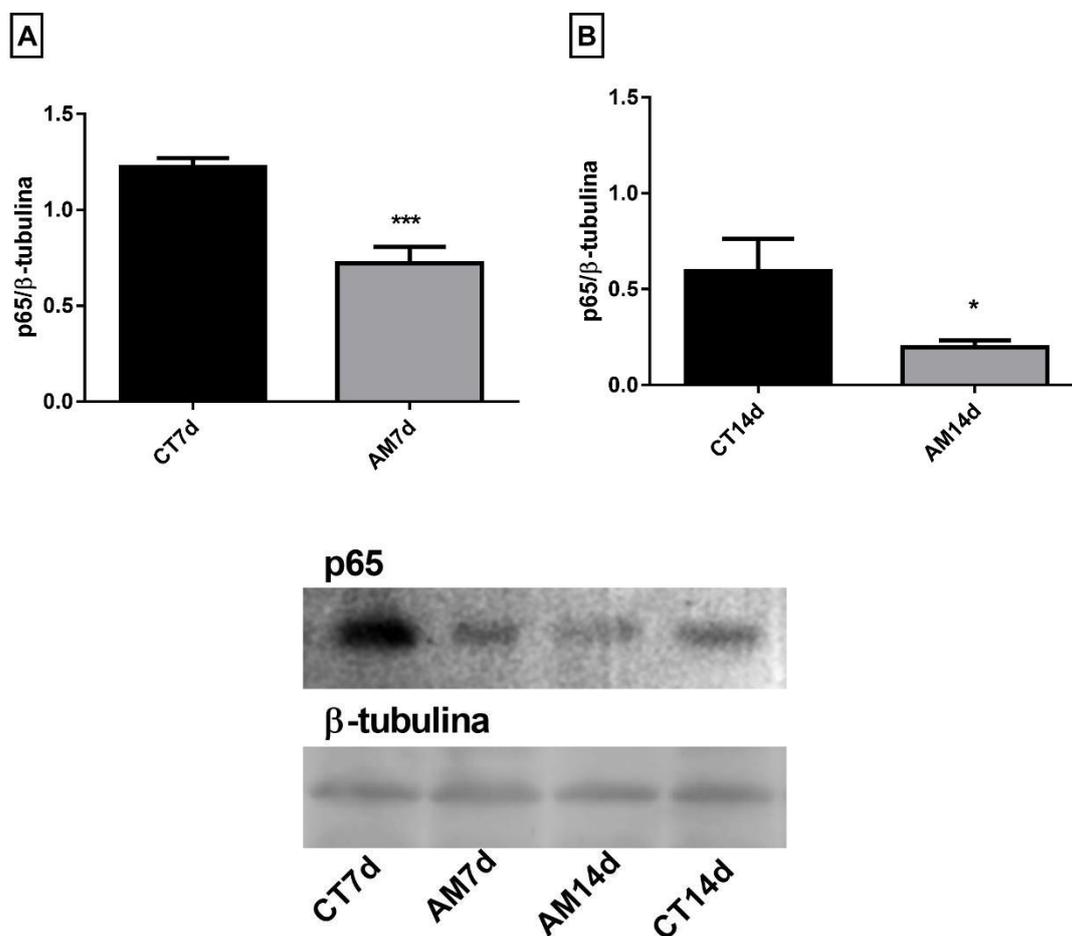


Figura 12 - Efeito do tratamento com amitriptilina na translocação de p65.

Implantes de 7 dias (A) e de 14 dias (B). O tratamento com amitriptilina regulou negativamente a translocação de p65 para o núcleo. As imagens são bandas representativas de quatro experimentos. Os resultados são expressos como média \pm SEM. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ - teste t de Student. Grupo controle (CT), grupo tratado com amitriptilina (AM).

5.3.8 Avaliação dos níveis séricos de TNF-alfa

O tratamento com amitriptilina (AM) reduziu significativamente os níveis séricos de TNF- α , quando o tratamento começou 7 dias após implantação. CT 14d ($0,04 \pm 0,007$) e AM 14d ($0,02 \pm 0,003$) (**Fig. 13 B**). Porém, essa resposta não foi observada quando o tratamento começou no dia da implantação (**Fig. 13 A**).

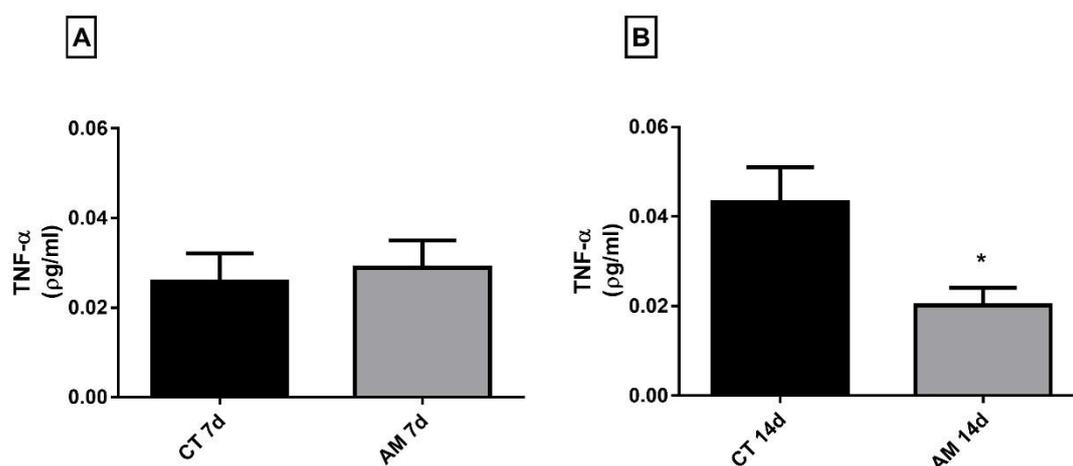


Figura 13 - Efeitos sistêmicos do tratamento com amitriptilina. Níveis séricos de TNF- α (A e B). Foi observada diminuição significativa nos níveis de TNF- α nos dois grupos tratados, quando comparados aos grupos controle. Os valores são a média \pm SEM de 5-8 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ - teste t de Student. Grupo controle (CT), grupo tratado com amitriptilina (AM).

5.4 Efeitos antiproliferativos da amitriptilina

5.4.1 Avaliação dos fatores angiogênicos no tecido fibrovascular induzido pelo implante de esponja

Observou-se uma redução significativa nos níveis dos fatores próangiogênicos VEGF e IL-1 beta, quando o tratamento com amitriptilina (AM) começou 7 dias após implantação. VEGF (CT 14d $0,80 \pm 0,099$) e (AM 14d $0,48 \pm 0,097$) (**Fig. 14 B**); IL-1 beta (CT 14d $1,01 \pm 0,155$) e (AM 14d $0,61 \pm 0,088$)

(Fig. 14 D). O mesmo não foi observado quando o tratamento começou no dia da implantação (Fig. 14 A e C).

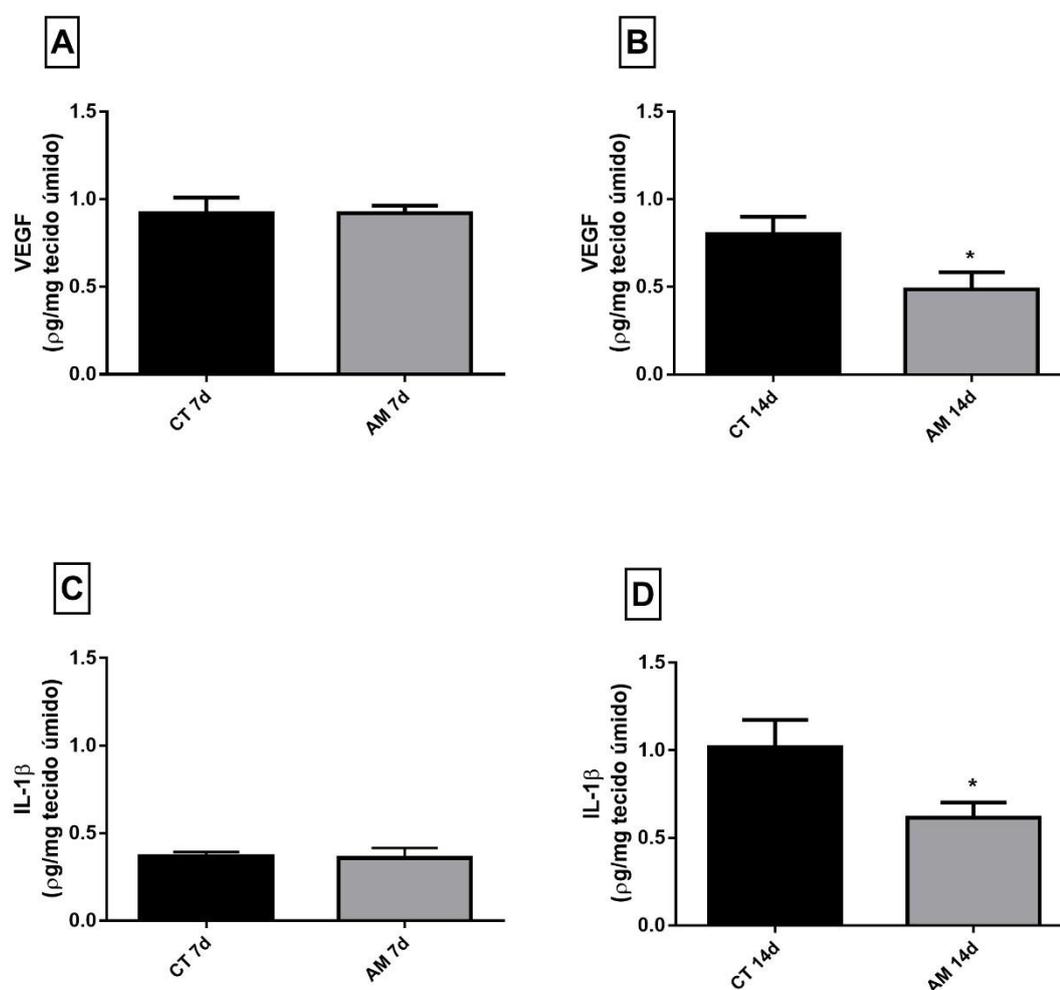


Figura 14 - Efeitos do tratamento com amitriptilina nos fatores angiogênicos no tecido fibrovascular induzido pelo implante de esponja. Níveis de VEGF (A e B) e níveis de IL-1 β (C e D). Os níveis de VEGF e IL-1 beta foram significativamente reduzidos quando o tratamento foi iniciado 7 dias após a implantação da esponja. Os valores são a média \pm SEM de 5-8 animais em cada grupo. * P < 0,05; Teste t de Student. Grupo controle (CT), grupo tratado com amitriptilina (AM).

5.4.2 Avaliação da formação de vasos no tecido fibrovascular induzido pelo implante de esponja

O efeito do tratamento com amitriptilina (AM) no tecido fibroproliferativo induzido pela implantação da esponja caracterizou-se pela redução significativa no número de vasos/campo, quando o tratamento com AM foi iniciado 7 dias após implantação. CT 14d ($16,41 \pm 1,285$) e AM 14d ($11,71 \pm 0,567$) (**Fig. 15 C-D e F**). O mesmo não foi observado quando o tratamento começou no dia da implantação. (**Fig. 15 A-B e E**).

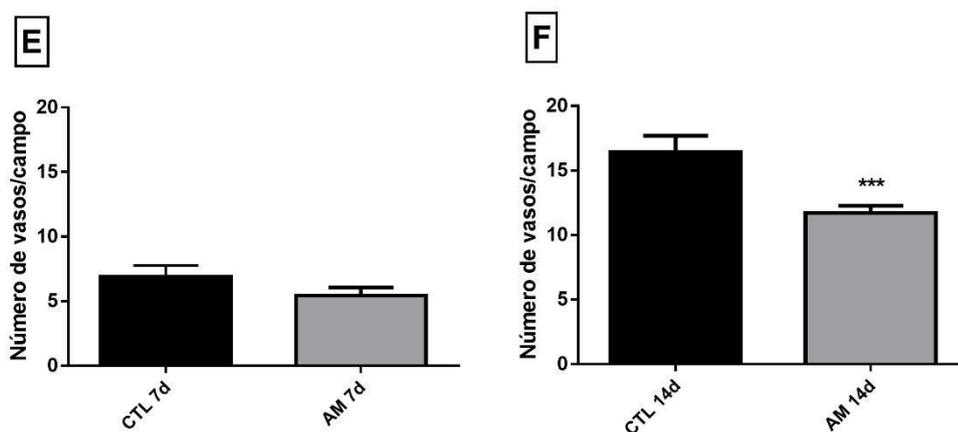
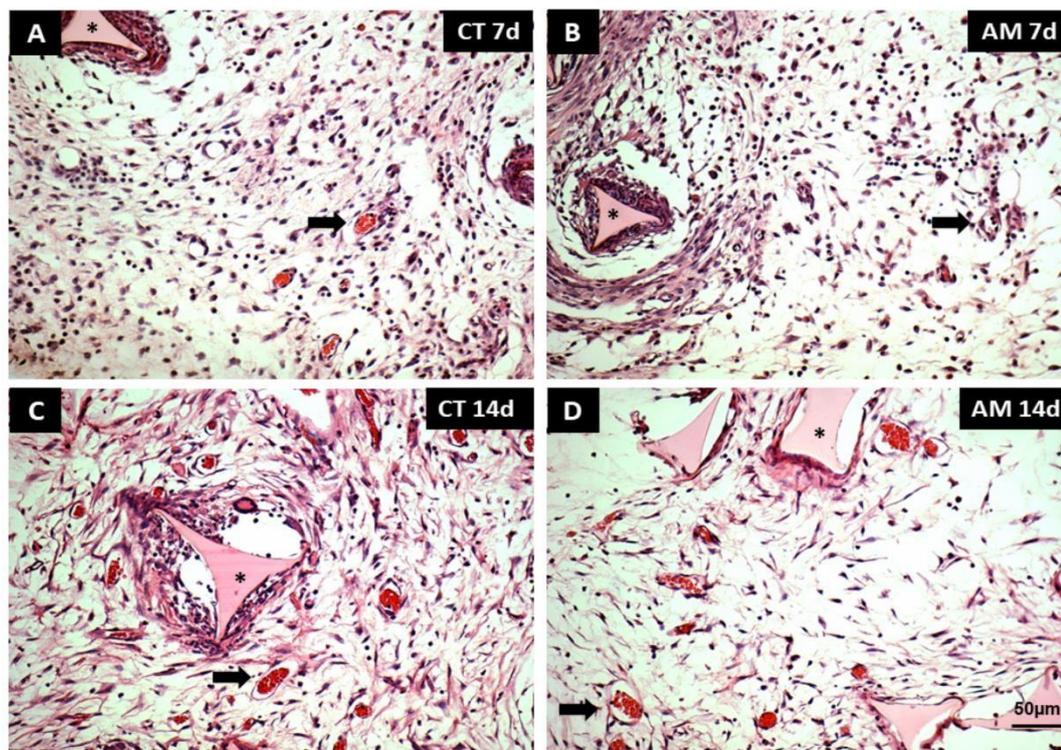


Figura 15 – Efeito do tratamento com amitriptilina na formação de vasos no tecido fibrovascular. Cortes histológicos representativos (5µm) de implantes de esponja corados com hematoxilina e eosina (H&E) mostrando o padrão de infiltração no tecido fibrovascular (A-D). Os poros da matriz sintética, vistos em formas triangulares (*), são ocupados por células inflamatórias, fibroblastos e vasos sanguíneos (seta). (E e F) Análise morfométrica do número de vasos/campo em implantes do grupo controle comparados aos animais tratados com amitriptilina (5mg/Kg). O tratamento com amitriptilina reduziu

significativamente a contagem de vasos/campo quando o tratamento foi iniciado 7 dias após a implantação da esponja. Os valores são a média \pm SEM de 5-8 animais em cada grupo. *** $P < 0,001$; Teste t de Student. Grupo controle (CT), grupo tratado com amitriptilina (AM).

5.4.3 Níveis de TGF- β 1 no soro e no implante de esponja.

A amitriptilina (AM) também significativamente reduziu os níveis da citocina pró-fibrogênica TGF-beta local e sistêmica, quando o tratamento começou 7 dias pós-implante. TGF-beta local (CT 14d $0,20 \pm 0,017$) e (AM $0,15 \pm 0,014$) (**Fig. 16 B**); TGF-beta sistêmica (CT 14d $0,24 \pm 0,027$) e (AM 14d $0,19 \pm 0,012$) (**Fig. 16 D**). A mesma situação não foi observada quando o tratamento começou no dia da implantação (**Fig. 16 A e C**).

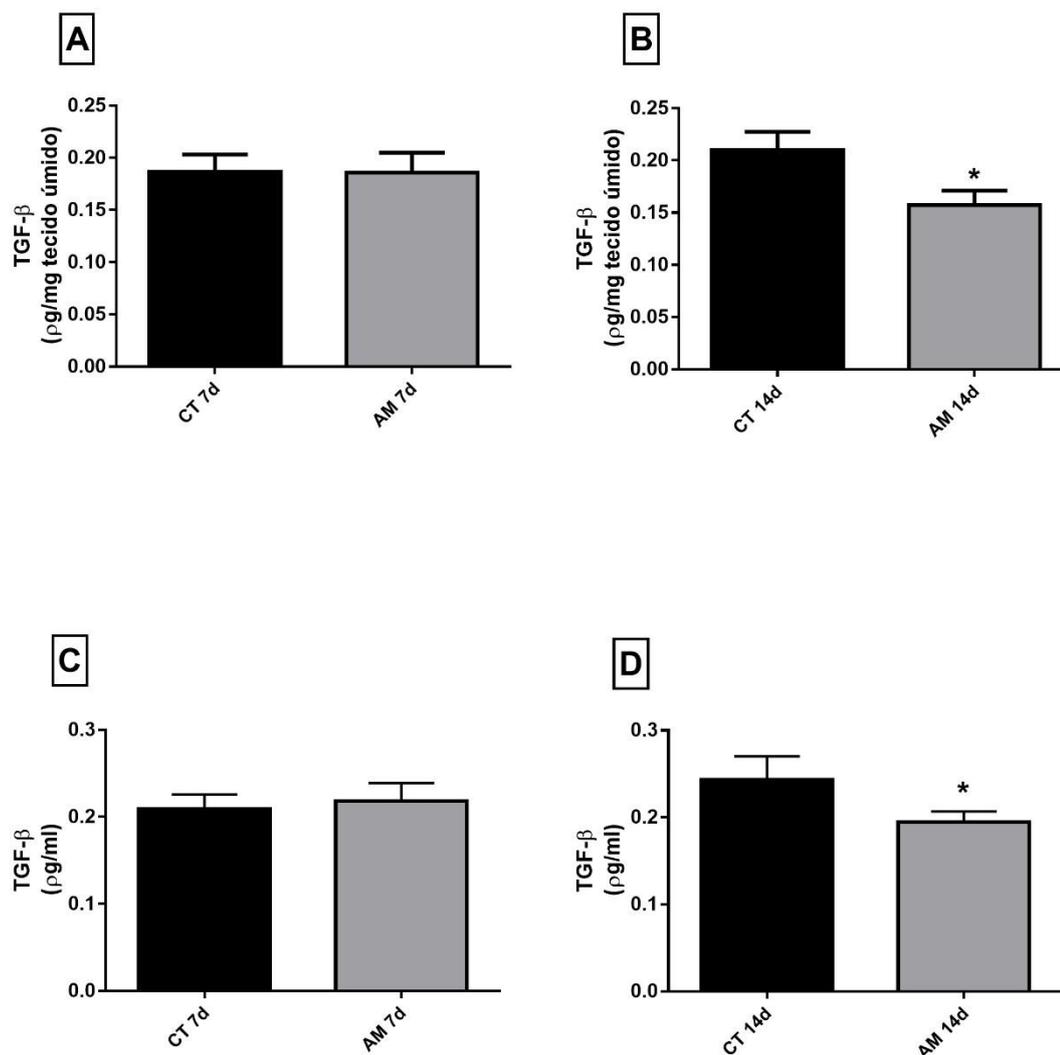
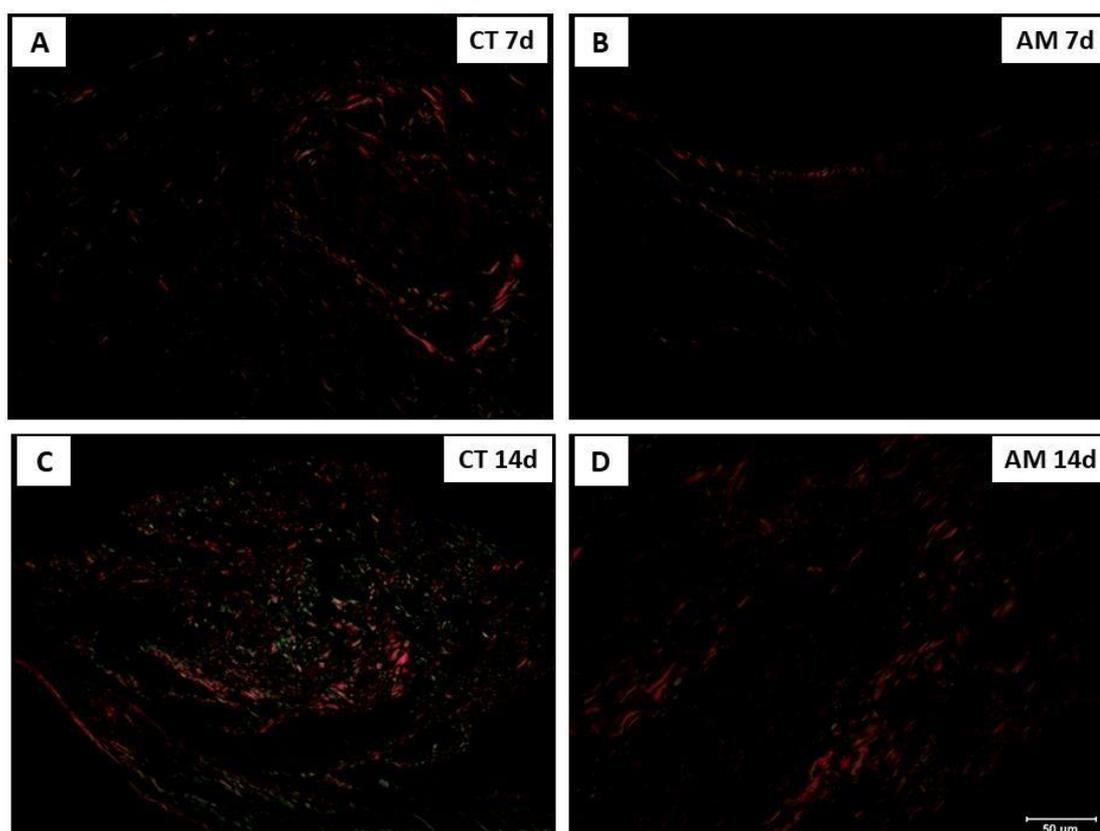


Figura 16 - Efeitos do tratamento com amitriptilina nos níveis local e sérico de TGF-β1. TGF-β1 em implantes (A e B) e no soro (C e D). Diferenças estatisticamente significativas nos níveis de TGF-beta 1 local e sistêmico foram observadas quando o tratamento foi iniciado 7 dias após o implante da esponja. Os valores são a média ± SEM de 5-8 animais em cada grupo. * P < 0,05; Teste t de Student. Grupo controle (CT), grupo tratado com amitriptilina (AM).

5.4.4 Deposição de colágeno no tecido fibrovascular induzido pela matriz da esponja.

O tratamento com amitriptilina (AM) inibiu significativamente o componente fibrogênico no tecido fibroproliferativo induzido por implante, quando o tratamento começou 7 dias após implantação. Essa inibição caracterizou-se pela redução na deposição de colágeno tipo I, III e total. O mesmo não foi observado quando o tratamento com AM começou no dia da implantação. Colágeno tipo I (CT 14d 241013 ± 17568) e (AM 14d 145101 ± 24726); tipo III (CT 14d 245060 ± 10335) e (AM 14d 34043 ± 6382); total (CT 14d 478315 ± 29013) e (AM 14d 170143 ± 30072) (**Fig. 17 A-E**).



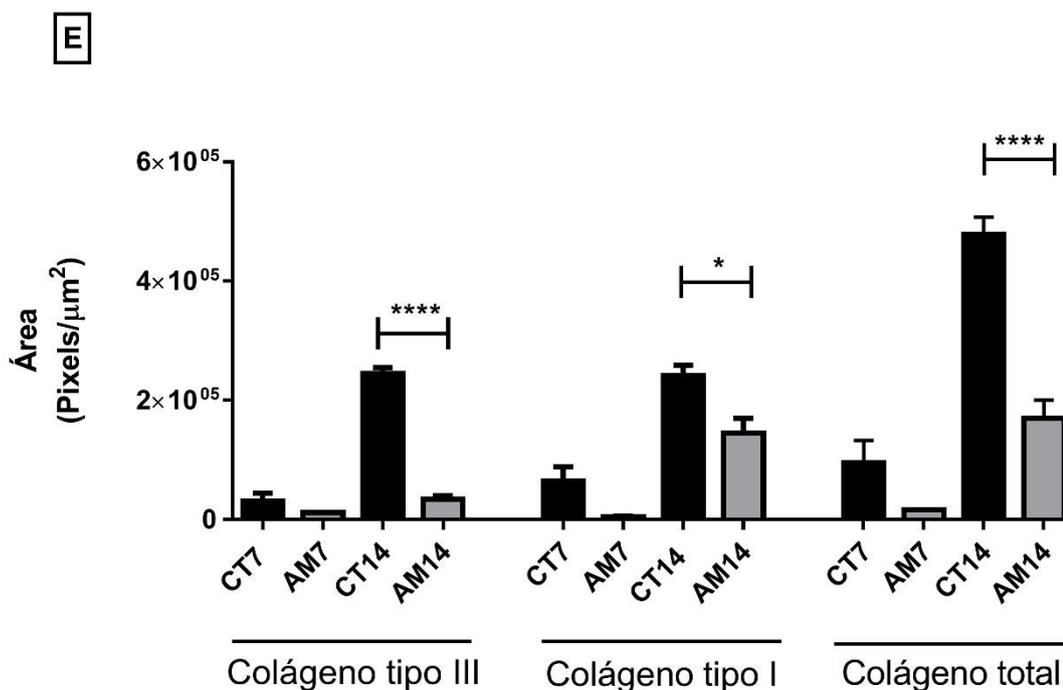


Figura 17 - Efeitos do tratamento com amitriptilina na deposição de colágeno no tecido fibrovascular. Cortes histológicos representativos (5μm) de implantes de esponja corados com Picrosirius red mostrando o padrão de infiltração de tecido fibrovascular e deposição de colágeno (A-D), e quantificação do colágeno tipo III, I e total (E e F). Diferenças estatisticamente significativas na deposição de colágeno tipo III, I e total foram observadas quando o tratamento foi iniciado 7 dias após o implante da esponja. Os valores são a média ± SEM de 5-8 animais em cada grupo. * P <0,05, ** P <0,01; *** P <0,001, **** P <0,0001; Teste t de Student. Grupo controle (CT), grupo tratado com amitriptilina (AM).

5.4.5 Avaliação histológica da cápsula fibrosa do implante

O tratamento com amitriptilina (AM) reduziu de maneira significativa a espessura da cápsula fibrosa formada ao redor do implante, quando iniciamos o tratamento 7 dias após implantação. CT 14d (109,9 ± 4,578) e AM 14d (76,3 ± 5,102) (**Fig. 18 C-D e F**). Essa diferença não foi observada quando o tratamento foi iniciado no dia da implantação (**Fig. 18 A-B e E**).

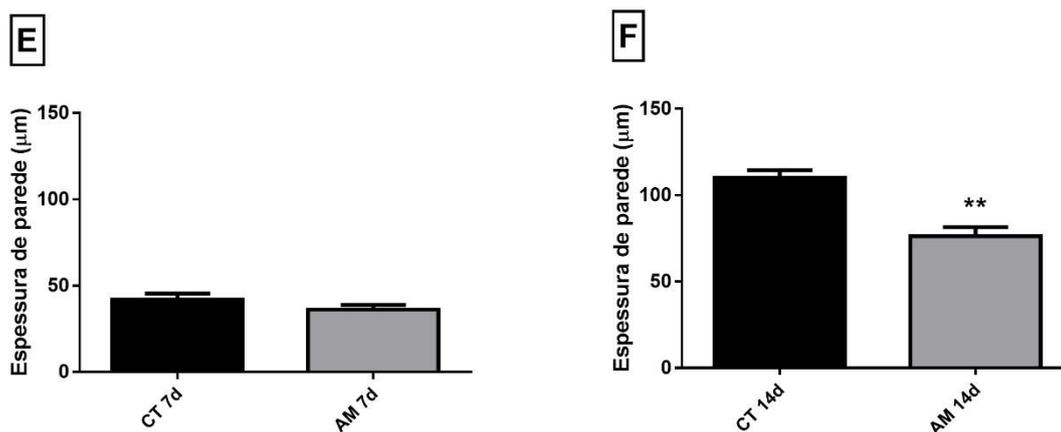
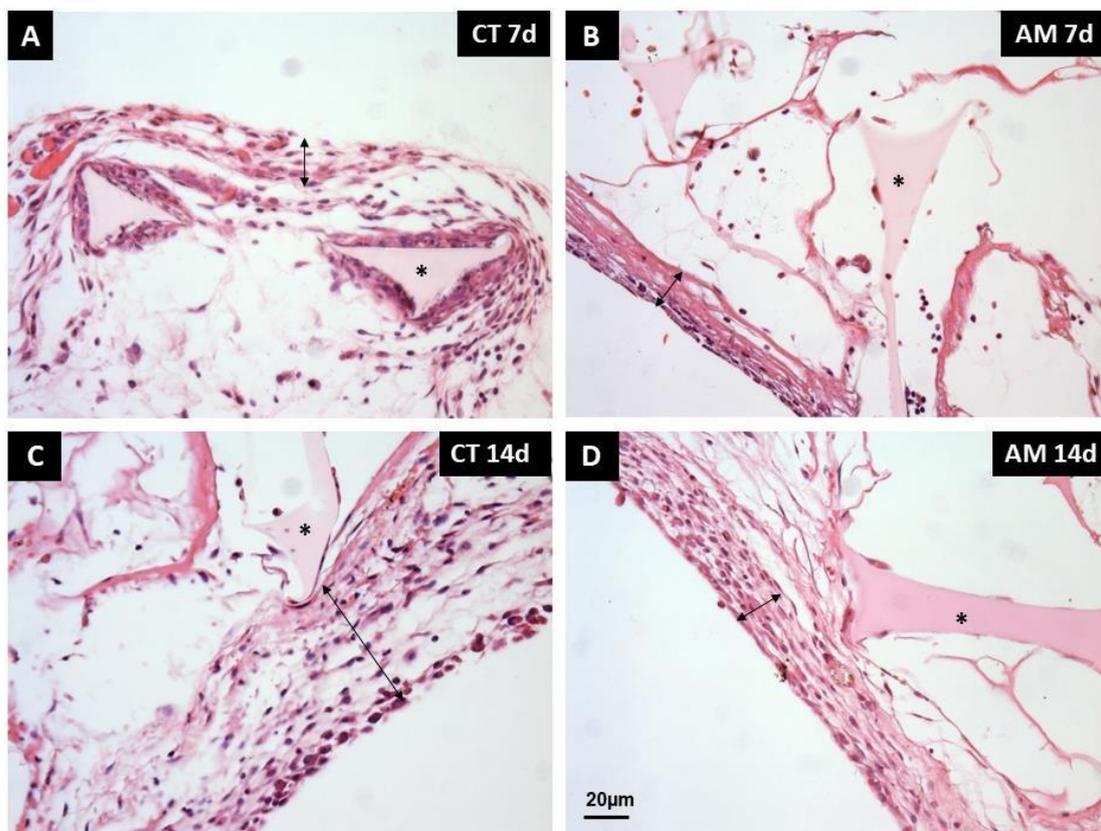


Figura 18 - Características histológicas da cápsula fibrosa dos implantes.

Cortes histológicos representativos (5µm) de implantes de esponja corados com hematoxilina e eosina (H&E), mostrando o padrão da cápsula fibrosa dos implantes de 7 e 14 dias (A-D). O tratamento com amitriptilina promoveu redução estatisticamente significativa na espessura da cápsula fibrosa do implante, quando o tratamento começou 7 dias pós-implante (F), diferença não observada quando o tratamento começou no dia do implante (E). Os valores são a média ± SEM de 5-8 animais em cada grupo. ** P <0,01; Teste t de Student. Grupo

controle (CT), grupo tratado com amitriptilina (AM). Os poros da matriz sintética são vistos como formas triangulares (*), já as setas indicam a cápsula fibrosa.

6. Discussão

Além da indicação terapêutica clássica para o tratamento de distúrbios psicológicos e de vários tipos de dor, incluindo dor inflamatória e neuropática, estudos têm mostrado que a amitriptilina (AM) é capaz de atuar como antiinflamatório e modulador de processos proliferativos, tanto em humanos como em modelos animais de inflamação aguda (VISMARI *et al.*, 2010; GOLDENBERG *et al.*, 1996; TALLEY *et al.*, 2015; O'NEILL *et al.*, 2016; JOHNSON *et al.*, 2016; GUAN *et al.*, 2019; ZAAFAN *et al.*, 2019). Considerando que o impacto do tratamento com AM no contexto da inflamação crônica é relativamente inexplorado, testamos a hipótese de que este composto também poderia modular a inflamação induzida pela matriz sintética de poliéter-poliuretano (modelo de implante de esponja em camundongo). O processo inflamatório que se desenvolve dentro e ao redor dos implantes de esponja de 14 dias exibe características compatíveis com uma inflamação de longa duração, como a presença de macrófagos, células gigantes, fibroblastos, leito vascular neoformado e deposição de colágeno tipos I e tipo III, conforme trabalhos já publicados por nosso grupo (CASTRO *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2018; CASSINI-VIEIRA *et al.*, 2018). Neste trabalho, confirmamos que a inflamação crônica foi a característica predominante observada no implante de 14 dias. No entanto, a quantidade de neutrófilos (característica marcante da inflamação aguda) não diminuiu no grupo controle neste momento. Esse achado é interessante e está de acordo com a noção de que os neutrófilos desempenham papel importante nas doenças inflamatórias crônicas. Os mecanismos relevantes incluem sua interação com a linhagem de monócitos, por exemplo, aumentando o recrutamento de monócitos e a ativação de macrófagos, além de seus efeitos pró-inflamatórios diretos, como a liberação de espécies reativas de oxigênio e armadilhas extracelulares (NETs), e atividade proteolítica (SOEHNLEIN *et al.*, 2017). Assim, é possível que a manutenção do recrutamento de neutrófilos no

14^o dia pós-implantação em nosso modelo também faça parte do processo inflamatório crônico induzido pelo implante.

O recrutamento de leucócitos da corrente sanguínea para o local da inflamação envolve uma sequência de eventos coordenados por citocinas e quimiocinas produzidas por células residentes no tecido (por exemplo, macrófagos e mastócitos), além da interação entre as células e a matriz celular (MEDZHITOV, 2008; STEWART & NICHOL, 2018). Em nosso trabalho, optamos por avaliar a produção da citocina TNF- α e das quimiocinas CXCL1/KC e CCL2/MCP-1, pois elas mostraram estar envolvidas em uma série de processos inflamatórios agudos e crônicos atuando no recrutamento/ativação de células inflamatórias e/ou endoteliais. Além disso, o número de mastócitos e as atividades enzimáticas de MPO e NAG foram determinadas (AHMED, 2011; SARASWATI *et al.*, 2018). Os ensaios das atividades de enzimas inflamatórias, como mieloperoxidase (MPO) e n-acetil- β D-glucosaminidase (NAG) avaliam indiretamente o número de leucócitos (neutrófilos e macrófagos, respectivamente) em processos e sítios inflamatórios, incluindo o implante de esponja (AVULA *et al.*, 2014; KAUFMANN *et al.*, 2020). O TNF- α é uma citocina pleiotrópica produzida por vários tipos de células, incluindo macrófagos, neutrófilos, linfócitos, células endoteliais e mastócitos. Esta citocina tem se mostrado um modulador potente da expressão de moléculas inflamatórias dependendo da concentração local ou duração da exposição (POPA *et al.*, 2007; MAGGIO & VLACHOS, 2018). As quimiocinas CXCL1/KC e CCL2/MCP-1 também mostraram induzir o recrutamento/ativação de células inflamatórias (CHINTAKUNTLAWAR & CHODOSH, 2009; GUABIRABA *et al.*, 2013; SALEM & WADIE, 2017).

Também examinamos se o fator de transcrição NF- κ B foi ativado no processo inflamatório induzido pelo implante e se o tratamento com AM foi capaz de modular sua transcrição. Este fator desempenha papéis importantes nas respostas inflamatórias e imunológicas, já que citocinas pró-inflamatórias modulam sua ativação, resultando na produção de mais citocinas próinflamatórias (LAWRENCE, 2009; HAYDEN & GHOSH, 2012) e na amplificação da inflamação.

O principal achado do estudo com nosso modelo experimental foi que os efeitos anti-inflamatórios do tratamento com amitriptilina foram mais evidentes quando o tratamento começou 7 dias após a implantação (inflamação crônica), mas não quando administramos a AM no mesmo dia da implantação da esponja. Isso contrasta com várias publicações que mostraram atividade antiinflamatória da AM em processos inflamatórios agudos (VISMARI *et al.*, 2012; FATTAHIAN *et al.*, 2016; XIA *et al.*, 2019). XIA *et al.*, (2019) mostraram através de um modelo de sepse murino que o tratamento com AM reduziu a inflamação e aliviou a coagulopatia induzida pela sepse. VISMARI *et al.*, (2010) por meio de um modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos, mostraram que a AM foi capaz de diminuir o edema e afetar o comportamento dos leucócitos em um processo inflamatório agudo, além de sugerir a participação dos receptores adrenérgicos alfa1 nos efeitos anti-inflamatórios da AM. VISMARI *et al.*, (2012) avaliaram o efeito da AM coadministrada com Lname (bloqueador da síntese de óxido nítrico) em ratos, nos modelos de edema de pata induzido por carragenina e de peritonite aguda, para investigar uma possível participação de NO nos efeitos anti-inflamatórios da AM. Como Lname potencializou os efeitos anti-inflamatórios induzidos pela AM no modelo de edema da pata, os efeitos anti-inflamatórios da AM podem ser devido a uma diminuição na produção de NO e podem estar associados a uma diminuição nos níveis séricos de IL-1 β e TNF- α . Essa discrepância pode ser atribuída ao uso de diferentes modelos animais, dosagem, protocolos de tratamento, etc. No entanto, nossos resultados compartilham semelhanças em relação aos parâmetros avaliados. Em nosso modelo, o efeito anti-inflamatório da AM foi associado à diminuição do recrutamento/ativação de células inflamatórias, como mastócitos, neutrófilos (atividade da mieloperoxidase) e macrófagos (atividade da N-acetil- β -D-glucosaminidase), conforme determinado nos implantes de 14 dias. Essa diminuição do número de células inflamatórias (contagem de mastócitos) e da ativação (atividade de enzima inflamatória) também foram relatados em outros modelos inflamatórios (CLEMONS *et al.*, 2011; GURGEL *et al.*, 2013; KANDIL *et al.*, 2016). Em nosso modelo, AM regulou negativamente a produção de IL-6, IFN- γ , TNF- α , CXCL1 e inibiu a ativação do fator de transcrição NF- κ B, que é um importante ativador de resposta pró-inflamatória, no implante de 14 dias.

Além disso, o nível sistêmico (soro) de TNF- α nos animais tratados com AM foi diminuído em comparação com os animais não tratados. Esses achados concordam com os trabalhos que mostraram que a AM foi capaz de diminuir esses parâmetros nos modelos de colite, sepse, etc. (FATTAHIAN *et al.*, 2016; XIA *et al.*, 2019; MEINERS *et al.*, 2019). É provável que a AM contribua para a redução de danos persistentes nos tecidos, sendo capaz de controlar os fatores envolvidos na inflamação.

A reação tipo corpo estranho é um processo complexo que compreende inflamação, angiogênese e fibrogênese, e a implantação de dispositivos biomédicos muitas vezes induz uma resposta tipo corpo estranho exacerbada que pode ser prejudicial à funcionalidade do biomaterial (GARDNER *et al.*, 2013; JULIER *et al.*, 2017). Baseados nas informações já publicadas de que a AM pode ser eficaz no tratamento desses processos individualmente, e que o tratamento com AM na cicatrização de feridas é relativamente inexplorado, testamos a hipótese de que este composto também pode modular as respostas proliferativas de angiogênese e fibrogênese induzidas pela matriz sintética de poliéter-poliuretano (modelo de esponja).

Ao estudar os componentes fibrovasculares da resposta de corpo estranho induzida por implantes subcutâneos de poliéter-poliuretano em camundongos, pudemos identificar a influência da AM nessa reação dentro e ao redor da matriz sintética. Na análise histológica dos implantes dos animais tratados com AM, houve menor deposição de colágeno e vascularização do que nos camundongos não tratados. Os parâmetros angiogênicos, como número de vasos/campo, VEGF e IL-1 β , foram significativamente reduzidos quando o tratamento começou 7 dias após implantação.

Assim como os efeitos anti-inflamatórios da amitriptilina (AM) foram significativos quando o tratamento começou na fase crônica da inflamação (7 dias após implantação), a atividade antifibrogênica da AM também foi significativa na fase crônica da inflamação, quando a fase proliferativa é mais proeminente. O efeito antifibrogênico promovido pelo tratamento com AM foi demonstrado por meio da redução significativa do TGF-beta (local e sistêmico), redução na espessura da cápsula fibrosa formada ao redor do implante, além da redução da deposição de colágeno tipos I, III e total, concordando com os

resultados de outros estudos já publicados (MORRISSEY, 2009; QUILLIN *et al.*, 2015; ZAAFAN *et al.*, 2019). ZAAFAN *et al.*, (2019) mostraram através de um modelo de fibrose pulmonar em ratos, que o tratamento com AM produziu um potente efeito antifibrótico ao suprimir a deposição de colágeno e proliferação de células fibroblásticas no tecido peribronquiolar, além de supressão significativa da elevação pulmonar de hidroxiprolina e TGF- β 1. O TNF- α pulmonar diminuiu significativamente, além da evidência de que o AM interfere na sinalização do NF- κ B.

Levando em consideração que a amitriptilina (AM) é um inibidor de ASM (enzima lisossomal esfingomielinase ácida), QUILLIN *et al.*, (2015), usando um modelo de fibrose hepática, mostrou que camundongos que receberam tratamento com AM ao mesmo tempo que a fibrose hepática foi induzida apresentaram diminuição da deposição de colágeno hepático e diminuição da expressão de mRNA de mediadores fibrogênicos hepáticos TGF- β 1, TIMP-1 (inibidor tecidual de metaloproteinase), colágeno e TNF- α . No mesmo estudo, um grupo de camundongos só começou a receber tratamento com AM 5 semanas após a indução da fibrose, para ver se ela é capaz de interferir na fibrose estabelecida, e observaram que a AM reduziu significativamente a deposição de colágeno. Em testes *in vitro* com HSC (célula estrelada hepática), AM inibiu completamente a expressão de colágeno induzido por TGF- β 1 e a proliferação induzida pelo fator de crescimento derivado de plaquetas- β - β (PDGF).

Em nosso modelo, o efeito antifibrogênico da amitriptilina (AM) foi associado à diminuição da resposta inflamatória e angiogênica que precede esse processo, caracterizada por interferências no recrutamento/ativação de células inflamatórias, regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias/angiogênicas e inibição do fator de transcrição NF- κ B. Esses achados estão de acordo com estudos que mostraram que a AM foi capaz de reduzir fatores relacionados à fibrogênese (MORRISSEY, 2009; QUILLIN *et al.*, 2015; ZAAFAN *et al.*, 2019). Com base em nossos resultados e no que já existe na literatura, é provável que a AM atue tanto preventivamente quanto na fibrose já estabelecida. Ou seja, seu desempenho como antifibrógeno depende da dose, da via de administração, do tempo de tratamento e do tempo de administração.

- ALTIERI, D. C.; MANNUCCI, P. M.; CAPITANIO, A. M. Binding of fibrinogen to human monocytes. *Journal of Clinical Investigation*, v. 78, n. 4, p. 968–976, 1986.
- ANDERSON, J. E.; OVALLE, W. K.; BRESSLER, B. H. Electron microscopic and autoradiographic characterization of hindlimb muscle regeneration in the mdx mouse. *The Anatomical Record*, v. 219, n. 3, p. 243–257, 1987.
- ANDERSON, J. M. Inflammatory response to implants. *ASAIO Transactions*, v. 34, n. 2, p. 101–107, 1988.
- ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology*. *Semin Immunol*, 2008.
- ANDERSSON, J. et al. Binding of C3 fragments on top of adsorbed plasma proteins during complement activation on a model biomaterial surface. *Biomaterials*, v. 26, n. 13, p. 1477–1485, 2005.
- ANDRADE, S. P. et al. Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. *Microvascular Research*, v. 54, n. 3, p. 253–261, 1997.
- ANDRADE, S. P.; FAN, T. P. D.; LEWIS, G. P. Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. *British Journal of Experimental Pathology*, v. 68, n. 6, p. 755–766, 1987.
- ANGHELINA, M. et al. Monocytes/macrophages cooperate with progenitor cells during neovascularization and tissue repair: Conversion of cell columns into fibrovascular bundles. *American Journal of Pathology*, v. 168, n. 2, p. 529–541, 2006.
- ANZAI, A. et al. Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling. *Circulation*, v. 125, n. 10, p. 1234–1245, 2012.
- ARPAIA, N. et al. A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. *Cell*, v. 162, n. 5, p. 1078–1089, 2015.
- ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004.
- AUERBACH, R. et al. A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. *Developmental Biology*, v. 41, n. 2, p. 391–394, 1974.
- AUERBACH, R.; AUERBACH, W.; POLAKOWSKI, I. Assays for angiogenesis: A review. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 51, n. 1, p. 1–11, 1991.

- AURORA, A. B. et al. Immune Complex-Dependent Remodeling of the Airway Vasculature in Response to a Chronic Bacterial Infection. *The Journal of Immunology*, v. 175, n. 10, p. 6319–6326, 2005.
- AUSPRUNK, D. H.; KNIGHTON, D. R.; FOLKMAN, J. Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: A structural and autoradiographic study. *Developmental Biology*, v. 38, n. 2, p. 237–248, 1974.
- AUSPRUNK, D. H.; KNIGHTON, D. R.; FOLKMAN, J. Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. Role of host and preexisting graft blood vessels. *American Journal of Pathology*, v. 79, n. 3, p. 597–618, 1975.
- AVILA, R.; BOTTINO, C. Cognitive changes update among elderly with depressive syndrome. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 28, n. 4, p. 316-20, 2006.
- AVULA, M. N. et al. Foreign body response to subcutaneous biomaterial implants in a mast cell-deficient Kitw-Sh murine model. *Acta Biomaterialia*, v. 10, n. 5, p. 1856–1863, 2014.
- BABENSEE, J. E. Interaction of dendritic cells with biomaterials Seminars in Immunology. *Semin Immunol*, 2008.
- BADYLAK, S. F.; GILBERT, T. W. Immune response to biologic scaffold materials. *Seminars in Immunology*, 2008.
- BAILEY, P. J. Sponge Implants as Models. *Methods in Enzymology*, v. 162, n. C, p. 327–334, 1988.
- BAO, P. et al. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *Journal of Surgical Research*, 2009.
- BECKMANN, N. et al. Inhibition of acid sphingomyelinase by tricyclic antidepressants and analogons. *Frontiers in Physiology*, 2014.
- BEDOYA, S. A. O. et al. Caracterização de colágenos tipos I e III no estroma do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 68, n. 1, p. 147–154, 2016.
- BELO, A. V. et al. Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor in mice. *Life Sciences*, v. 74, n. 23, p. 2827–2837, 2004.
- BERTHIAUME F.; MAGUIRE T. J.; YARMUSH M. L. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *The Annual Review of Chemical and Biomolecular*, v. 2, p. 403-430, 2011.

BHATTACHARYYA, S. et al. Fibronectin EDA promotes chronic cutaneous fibrosis through toll-like receptor signaling. *Science Translational Medicine*, v. 6, n. 232, 2014.

BHATTACHARYYA, S. et al. TLR4-dependent fibroblast activation drives persistent organ fibrosis in skin and lung. *JCI insight*, v. 3, n. 13, 2018a.

BHATTACHARYYA, S. et al. Pharmacological inhibition of tolllike receptor-4 signaling by TAK242 prevents and induces regression of experimental organ fibrosis. *Frontiers in Immunology*, v. 9, 2018b.

BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 81, n. 1, p. 1–5, 2007.

BLUFF, J. E. et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells do not contribute significantly to new vessels during incisional wound healing. *Experimental Hematology*, v. 35, n. 3, p. 500–506, 2007.

BOCCAFOSCHI, F.; MOSCA, C.; CANNAS, M. Cardiovascular biomaterials: When the inflammatory response helps to efficiently restore tissue functionality? *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2014.

BRANCHI, I.; ALLEVA, E.; COSTA, L. G. Effects of perinatal exposure to a polybrominated diphenyl ether (PBDE 99) on mouse neurobehavioural development. *NeuroToxicology*, v. 23, n. 3, p. 375–384, 2002.

BRANZK, N. et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nature Immunology*, v. 15, n. 11, p. 1017–1025, 2014.

BRECKENRIDGE, A.; JACOB, R. Overcoming the legal and regulatory barriers to drug repurposing. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 2004.

BRODBECK, W. G. et al. Lymphocytes and the foreign body response: Lymphocyte enhancement of macrophage adhesion and fusion. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 74, n. 2, p. 222–229, 2005.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2006.

BROWN, B. N.; BADYLAK, S. F. Expanded applications, shifting paradigms and an improved understanding of host-biomaterial interactions. *Acta Biomaterialia*, 2013.

BURD, P. R. et al. Activated mast cells produce interleukin 13. *Journal of Experimental Medicine*, v. 181, n. 4, p. 1373–1380, 1995.

BURZYN, D. et al. A Special Population of regulatory T Cells Potentiates muscle repair. *Cell*, v. 155, n. 6, p. 1282–1295, 2013.

CAMPOS, P. P. et al. Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. *Histology and Histopathology*, v. 21, n. 10–12, p. 1263–1270, 2006.

CAPETTINI, L. S. A. et al. Decreased production of neuronal NOS-derived hydrogen peroxide contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis. *British journal of pharmacology*, v. 164, n. 6, p. 1738–48, 2011.

CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, 2000.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, 2003.

CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 2005.

CASSINI-VIEIRA, P. et al. Lack of interferon-gamma attenuates foreign body reaction to subcutaneous implants in mice. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 106, n. 8, p. 2243–2250, 2018.

CASTRO, P. R. et al. Kinetics of implant-induced inflammatory angiogenesis in abdominal muscle wall in mice. *Microvascular Research*, v. 84, n. 1, p. 9–15, 2012.

CASTRO, P. R. et al. Deletion of the chemokine receptor CCR2 attenuates foreign body reaction to implants in mice. *Microvascular Research*, v. 95, n. 1, p. 37–45, 2014.

CHANG, D. T.; COLTON, E.; ANDERSON, J. M. Paracrine and juxtacrine lymphocyte enhancement of adherent macrophage and foreign body giant cell activation. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 89, n. 2, p. 490–498, 2009.

CHEN, F. et al. Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion. *Nature Immunology*, v. 15, n. 10, p. 938–946, 2014.

CHEN, J.-X. et al. 5-Lipoxygenase deficiency attenuates L-NAME-induced hypertension and vascular remodeling. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, v. 1865, n. 9, p. 2379–2392, 2019.

- CHINTAKUNTLAWAR, A. V.; CHODOSH, J. Chemokine CXCL1/KC and its receptor CXCR2 are responsible for neutrophil chemotaxis in adenoviral keratitis. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, v. 29, n. 10, p. 657–666, 2009.
- CHIUMIENTO, A.; LAMPONI, S.; BARBUCCI, R. Role of fibrinogen conformation in platelet activation. *Biomacromolecules*, v. 8, n. 2, p. 523–531, 2007.
- CHRISTENSON, L.; WAHLBERG, L.; AEBISCHER, P. Mast cells and tissue reaction to intraperitoneally implanted polymer capsules. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 25, n. 9, p. 1119–1131, 1991.
- CHRISTO, S. N. et al. Innate Immunity and Biomaterials at the Nexus: Friends or Foes. *BioMed Research International*, 2015.
- CHUNG, L. et al. Key players in the immune response to biomaterial scaffolds for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2017.
- CLEMONS, A. et al. Amitriptyline and prochlorperazine inhibit proinflammatory mediator release from human mast cells: Possible relevance to chronic fatigue syndrome. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 2011.
- COOPER, L. et al. Wound healing and inflammation genes revealed by array analysis of “macrophageless” PU.1 null mice. *Genome biology*, v. 6, n. 1, 2005.
- CUMMING, B. D.; MCELWAIN, D. L. S.; UPTON, Z. A mathematical model of wound healing and subsequent scarring. *Journal of the Royal Society Interface*, v. 7, n. 42, p. 19–34, 2009.
- CURTSINGER, J. M.; MESCHER, M. F. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Current Opinion in Immunology*, 2010.
- DA ROCHA E SILVA, M. et al. Clotrimazole is an inhibitor of inflammatory angiogenesis and the metabolic activity in sponge granuloma. *Inflammation*, v. 22, n. 6, p. 643–651, 1998.
- DANIELSON, T. J. Monoamine oxidase inhibitors and tricyclic antidepressants. *Handbook of Drug Interactions*, p 149-173, 2004.
- DANILOV, D. S. A 70-year history of tricyclic antidepressants. *Zhurnal Nevrologii i Psihiatrii imeni S.S. Korsakova*, 2019.
- DE MOURA, S. A. L. et al. Aqueous extract of brazilian green propolis: primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, v. 2011, p. 748283, 2011.

- DEOTARSE P. P., JAIN A. S., BAILE. M. B.1, KOLHE N. S., K. A. A. Drug Repositioning: A Review. *International Journal of Pharma Research & Review*, v. 4, n. 8, p. 51–58, 2015.
- DHANDAYUTHAPANI, B. et al. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. *International Journal of Polymer Science*, 2011.
- DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, 2004.
- DIPIETRO, L. A. Angiogenesis and scar formation in healing wounds. *Current Opinion in Rheumatology*, 2013.
- DUDLEY, J. T.; DESHPANDE, T.; BUTTE, A. J. Exploiting drug-disease relationships for computational drug repositioning. *Briefings in Bioinformatics*, v. 12, n. 4, p. 303–311, 2011.
- EKDAHL, K. N. et al. Innate immunity activation on biomaterial surfaces: A mechanistic model and coping strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011.
- ELICEIRI, B. P.; CHERESH, D. A. Role of αv integrins during angiogenesis. *Cancer Journal*, 2000.
- EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*, 2014.
- ENGELMANN, B.; MASSBERG, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2013.
- ESCHE, C.; STELLATO, C.; BECK, L. A. Chemokines: Key players in innate and adaptive immunity. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 125, n. 4, p. 615–628, 2005.
- EULALIA TORRENTE CASTELLS, EDUARDO VÁZQUEZ DELGADO, C. G. E. Use of amitriptyline for the treatment of chronic tension-type headache. Review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 13, n. 9, p. E567-72, 2008.
- FATTAHIAN, E. et al. Anti-inflammatory effect of amitriptyline on ulcerative colitis in normal and reserpine-induced depressed rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, v. 15, p. 125–137, 2016.
- FAZAN, RUBENS; DA SILVA, VALDO JOSÉ DIAS; SALGADO, H. C. Modelos de hipertensão arterial. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 8, n. 1, p. 19–29, 2001.

- FLICK, M. J. et al. Leukocyte engagement of fibrin(ogen) via the integrin receptor $\alpha\text{M}\beta\text{2}/\text{Mac-1}$ is critical for host inflammatory response in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, v. 113, n. 11, p. 1596–1606, 2004.
- FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis. *Advances in Cancer Research*, v. 19, n. C, p. 331–358, 1974.
- FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in oncology*, 2002.
- FRANTZ, S. et al. Innate immunity and angiogenesis. *Circulation Research*, 2005.
- FRANZ, S. et al. Immune responses to implants - A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials*, 2011.
- FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology*, v. 134, n. 6, p. 1655–1669, 2008.
- GARDNER, A. B. et al. Biomaterials-based modulation of the immune system. *BioMed Research International*, 2013.
- GARG, K. et al. Angiogenic potential of human macrophages on electrospun bioresorbable vascular grafts. *Biomedical Materials*, v. 4, n. 3, 2009.
- GARG, K. et al. Macrophage functional polarization (M1/M2) in response to varying fiber and pore dimensions of electrospun scaffolds. *Biomaterials*, v. 34, n. 18, p. 4439–4451, 2013.
- GASPERINI, L.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Natural polymers for the microencapsulation of cells. *Journal of the Royal Society Interface*, 2014.
- GERIS, L.; SCHUGART, R.; VAN OOSTERWYCK, H. In silico design of treatment strategies in wound healing and bone fracture healing. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2010.
- GIMBRONE, M. A. et al. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 52, n. 2, p. 413–427, 1974.
- GOLDENBERG, D. et al. A randomized, double-blind crossover trial of fluoxetine and amitriptyline in the treatment of fibromyalgia. *Arthritis and Rheumatism*, v. 39, n. 11, p. 1852–1859, 1996.

- GORBET, M. B.; SEFTON, M. V. Biomaterial-associated thrombosis: Roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*, 2004.
- GRANDJEAN-LAQUERRIERE, A. et al. Involvement of toll-like receptor 4 in the inflammatory reaction induced by hydroxyapatite particles. *Biomaterials*, v. 28, n. 3, p. 400–404, 2007.
- GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.
- GRIESS, P. No Title. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, v. 12, p. 426, 1879.
- GROSE, R.; WERNER, S. Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 2004.
- GROTH, T.; ZLATANOV, I.; ALTANKOV, G. Adhesion of Human Peripheral Lymphocytes on Biomaterials Preadsorbed with Fibronectin and Vitronectin. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v. 6, n. 8, p. 729–739, 1995.
- GUABIRABA, R. et al. Blockade of cannabinoid receptors reduces inflammation, leukocyte accumulation and neovascularization in a model of sponge-induced inflammatory angiogenesis. *Inflammation Research*, v. 62, n. 8, p. 811–821, 2013.
- GUAN, Y. et al. Tricyclic antidepressant amitriptyline inhibits autophagic flux and prevents tube formation in vascular endothelial cells. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, v. 124, n. 4, p. 370–384, 2019.
- GUO, J.; FRIEDMAN, S. L. Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. *Fibrogenesis and Tissue Repair*, 2010.
- GURGEL, J. A. et al. Amitriptyline, clomipramine, and maprotiline attenuate the inflammatory response by inhibiting neutrophil migration and mast cell degranulation. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 35, n. 4, p. 387–392, 2013.
- GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. *Nature*, 2008.
- HAHN, J. et al. Aggregated neutrophil extracellular traps resolve inflammation by proteolysis of cytokines and chemokines and protection from antiproteases. *FASEB Journal*, v. 33, n. 1, p. 1401–1414, 2019.
- HAJHASHEMI, V. et al. The role of central mechanisms in the anti-inflammatory effect of amitriptyline on carrageenan-induced paw edema in rats. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, v. 65, n. 11, p. 1183–7, 2010.

- HARTMAN, R. E. et al. Motor and cognitive deficits in mice bred to have low or high blood pressure. *Physiology and Behavior*, v. 105, n. 4, p. 1092–1097, 2012.
- HASAN, J. et al. Quantitative angiogenesis assays in vivo - A review. *Angiogenesis*, 2004.
- HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B, the first quarter-century: Remarkable progress and outstanding questions. *Genes and Development*, v. 26, n. 3, p. 203–234, 2012.
- HE, W.; DAI, C. Key Fibrogenic Signaling. *Current Pathobiology Reports*, 2015.
- HEALTH, R. ON T. G.-B. R. FOR; POLICY, B. ON H. S.; MEDICINE, I. OF. Drug Repurposing and Repositioning. [s.l.] National Academies Press, 2014.
- HEATH, D. E.; COOPER, S. L. Em Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E., eds.; Academic Press: Oxford, 2013, cap. 1.2.2. Polymers: Basic Principles.
- HED, J.; JOHANSSON, M.; LINDROTH, M. Complement activation according to the alternate pathway by glass and plastic surfaces and its role in neutrophil adhesion. *Immunology Letters*, v. 8, n. 6, p. 295–299, 1984.
- HINZ, B. et al. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *American Journal of Pathology*, v. 159, n. 3, p. 1009–1020, 2001.
- HOOPER, L. V. et al. Angiogenins: A new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nature Immunology*, v. 4, n. 3, p. 269–273, 2003.
- HUTCHINSON, M. R. et al. Evidence that tricyclic small molecules may possess toll-like receptor and myeloid differentiation protein 2 activity. *Neuroscience*, v. 168, n. 2, p. 551–563, 2010.
- IKUNO, Y. Overview of the complications of high myopia. *Retina*, v. 37, n. 12, p. 2347–2351, 2017.
- J M CURTSINGER 1, C S SCHMIDT, A MONDINO, D C LINS, R M KEDL, M K JENKINS, M. F. M. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 162, n. 6, p. 3256–3262, 1999.
- JACKSON, J. R. et al. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *The FASEB Journal*, v. 11, n. 6, p. 457–465, 1997.

JENNEY, C. R.; ANDERSON, J. M. Adsorbed serum proteins responsible for surface dependent human macrophage behavior. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 49, n. 4, p. 435–447, 2000.

JOHNSON, B. L. et al. Amitriptyline usage exacerbates the immune suppression following burn injury. *Shock*, v. 46, n. 5, p. 541–548, 2016. JONES, J. A. et al. Proteomic analysis and quantification of cytokines and chemokines from biomaterial surface-adherent macrophages and foreign body giant cells. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 83, n. 3, p. 585–596, 2007.

JULIER, Z. et al. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. *Acta Biomaterialia*, 2017.

KANBE, N. et al. Cord blood-derived human cultured mast cells produce transforming growth factor β 1. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 29, n. 1, p. 105–113, 1999.

KANDIL, E. A. et al. Imipramine and amitriptyline ameliorate the rotenone model of Parkinson's disease in rats. *Neuroscience*, v. 332, p. 26–37, 2016.

KAUFMANN, M. et al. N-acetylbDglucosaminidase: A potential biomarker for early detection of acute kidney injury in acute chest pain. *Nephrology*, v. 25, n. 2, p. 135–143, 2020.

KESELOWSKY, B. G. et al. Role of plasma fibronectin in the foreign body response to biomaterials. *Biomaterials*, v. 28, n. 25, p. 3626–3631, 2007.

KESELOWSKY, B. G.; COLLARD, D. M.; GARCÍA, A. J. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials*, v. 25, n. 28, p. 5947–5954, 2004.

KESELOWSKY, B. G.; LEWIS, J. S. Dendritic cells in the host response to implanted materials. *Seminars in Immunology*, 2017.

KIM, S. Y.; NAIR, M. G. Macrophages in wound healing: activation and plasticity. *Immunology and Cell Biology*, 2019.

KIM, Y. K. et al. Modification of Biomaterials with a Self-Protein Inhibits the Macrophage Response. *Advanced Healthcare Materials*, v. 3, n. 7, p. 989–994, 2014.

KLINGBERG, F. et al. The fibronectin ED-A domain enhances recruitment of latent TGF- β -binding protein-1 to the fibroblast matrix. *Journal of Cell Science*, v. 131, n. 5, 2018.

KOCZULLA, R. et al. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL37/hCAP-18. *Journal of Clinical Investigation*, v. 111, n. 11, p. 1665–1672, 2003.

KOFLER, N. M.; SIMONS, M. Angiogenesis versus arteriogenesis: Neuropilin 1 modulation of VEGF signaling. *F1000Prime Reports*, v. 7, 2015.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 2013.

KORNHUBER, J.; HENKEL, A. W.; GROEMER, T. W.; STÄDTLER, S.; WELZEL, O.; TRIPAL, P.; ROTTER, A.; BLEICH, S.; TRAPP, S. Lipophilic cationic drugs increase the permeability of lysosomal membranes in a cell culture system. *Journal of Cellular Physiology*, v. 224, n.1, p. 152-164, 2010.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, v. 30, n. 1, p. 16–34, jan. 2011.

KYRIAKIDES, T. R. et al. The CC chemokine ligand, CCL2/MCP1, participates in macrophage fusion and foreign body giant cell formation. *American Journal of Pathology*, v. 165, n. 6, p. 2157–2166, 2004.

L F FAJARDO, J KOWALSKI, H H KWAN, S D PRIONAS, A. C. A. The disc angiogenesis system. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, v. 58, n. 6, p. 718–724, 1988.

LABOW, R. S.; MEEK, E.; SANTERRE, J. P. Neutrophil-mediated biodegradation of medical implant materials. *Journal of Cellular Physiology*, v. 186, n. 1, p. 95–103, 2001.

LABROUSSE, A. Frustrated phagocytosis on micro-patterned immune complexes to characterize lysosome movements in live macrophages. *Frontiers in Immunology*, v. 2, p. 51, 2011.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2009.

LAWSON, K. A brief review of the pharmacology of amitriptyline and clinical outcomes in treating fibromyalgia. *Biomedicines*, 2017.

LEVENSON, S. M. et al. THE HEALING OF RAT SKIN WOUNDS. *Annals of surgery*, v. 161, n. 2, p. 293–308, 1965.

LI, X.-P. et al. LPS induces activation of the TLR4 pathway in fibroblasts and promotes skin scar formation through collagen I and TGF- β in skin lesions.

International journal of clinical and experimental pathology, v. 12, n. 6, p. 2121–2129, 2019.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C.; Historical evolution of the neurotransmission concept. Journal Neural Transmission, v. 116, n. 5, p. 515- 533, 2009.

LOVVORN, H. N. et al. Relative distribution and crosslinking of collagen distinguish fetal from adult sheep wound repair. Journal of Pediatric Surgery, 1999.

LUTZ, M. B.; SCHULER, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: Which signals induce tolerance or immunity? Trends in Immunology, 2002.

LYNN, A. D.; KYRIAKIDES, T. R.; BRYANT, S. J. Characterization of the in vitro macrophage response and in vivo host response to poly(ethylene glycol)based hydrogels. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, v. 93, n. 3, p. 941–953, 2010.

MA, B. et al. TLR4 stimulation by LPS enhances angiogenesis in a co-culture system consisting of primary human osteoblasts and outgrowth endothelial cells. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, v. 11, n. 6, p. 1779–1791, 2017.

MA, Y. et al. Temporal neutrophil polarization following myocardial infarction. Cardiovascular Research, v. 110, n. 1, p. 51–61, 2016.

MAGGIO, N.; VLACHOS, A. Tumor necrosis factor (TNF) modulates synaptic plasticity in a concentration-dependent manner through intracellular calcium stores. Journal of Molecular Medicine, v. 96, n. 10, p. 1039–1047, 2018.

MAHABELESHWAR, G. H. et al. Integrin signaling is critical for pathological angiogenesis. Journal of Experimental Medicine, v. 203, n. 11, p. 2495–2507, 2006.

MAJNO, G. Chronic inflammation: Links with angiogenesis and wound healing. American Journal of Pathology, 1998.

MANNING, J. et al. Amitriptyline is efficacious in ameliorating muscle inflammation and depressive symptoms in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Experimental physiology, v. 99, n. 10, p. 1370–86, 2014.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. Nature Reviews Neuroscience, 2005.

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: The good, the bad and the ugly. Trends in Cell BiologyTrends, 2005.

MATLAGA, B. F.; YASENCHAK, L. P.; SALTHOUSE, T. N. Tissue response to implanted polymers: The significance of sample shape. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 10, n. 3, p. 391–397, 1976.

MCFARLAND, C. D. et al. Protein adsorption and cell attachment to patterned surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 49, n. 2, p. 200–210, 2000.

MCKENZIE, B. S.; KASTELEIN, R. A.; CUA, D. J. Understanding the IL-23-IL17 immune pathway. *Trends in Immunology*, v. 27, n. 1, p. 17–23, 2006.

MCNALLY, A. K. et al. Vitronectin is a critical protein adhesion substrate for IL4-induced foreign body giant cell formation. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 86, n. 2, p. 535–543, 2008.

MCNALLY, A. K.; ANDERSON, J. M. Macrophage fusion and multinucleated giant cells of inflammation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 713, p. 97–111, 2011.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 2008.

MEINERS, J. et al. Intestinal acid sphingomyelinase protects from severe pathogen-driven colitis. *Frontiers in Immunology*, v. 10, 2019.

MESURE, L. et al. Gene Expression Study of Monocytes/Macrophages during Early Foreign Body Reaction and Identification of Potential Precursors of Myofibroblasts. *PLoS ONE*, v. 5, n. 9, p. e12949, 2010.

MILLERET, V. et al. Protein adsorption steers blood contact activation on engineered cobalt chromium alloy oxide layers. *Acta Biomaterialia*, v. 24, p. 343–351, 2015.

MIRASTSCHIJSKI, U. et al. Matrix metalloproteinase inhibition delays wound healing and blocks the latent transforming growth factor- β 1-promoted myofibroblast formation and function. *Wound Repair and Regeneration*, v. 18, n. 2, p. 223–234, 2010.

MONCRIEFF, J.; WESSELY, S.; HARDY, R. Active placebos versus antidepressants for depression. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2004.

MOORE, R. A. et al. Amitriptyline for neuropathic pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2015.

- MOR, F.; QUINTANA, F. J.; COHEN, I. R. Angiogenesis-Inflammation CrossTalk: Vascular Endothelial Growth Factor Is Secreted by Activated T Cells and Induces Th1 Polarization. *The Journal of Immunology*, v. 172, n. 7, p. 4618–4623, 2004.
- MORENO, R. A.; MORENO E MARCIA BRITO, D. H.; DE MACEDO SOARES, M. B. Psychopharmacology of antidepressant agents. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 1999.
- MORRISSEY, J. J. Pleiotropic effects of amitriptyline ameliorate renal fibrosis. *Kidney International*, 2009.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 2008.
- MOZAYANI, A.; RAYMON, L. P. Handbook of drug interactions - a clinical and forensic guide. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2004. Cap. 4, p. 149-173.
- MULLIGAN-KEHOE, M. J.; SIMONS, M. Vasa vasorum in normal and diseased arteries. *Circulation*, v. 129, n. 24, p. 2557–2566, 2014.
- MURPHY, K. E. et al. A two-compartment mechanochemical model of the roles of transforming growth factor β and tissue tension in dermal wound healing. *Journal of Theoretical Biology*, v. 272, n. 1, p. 145–159, 2011.
- MUSTAFA, K. et al. Production of transforming growth factor β_1 and prostaglandin E_2 by osteoblast-like cells cultured on titanium surfaces blasted with TiO_2 particles. *Clinical Oral Implants Research*, v. 14, n. 1, p. 50–56, 2003.
- NILSSON, B. et al. The role of complement in biomaterial-induced inflammation. *Molecular Immunology*, v. 44, n. 1–3, p. 82–94, 2007.
- NIMERI, G. et al. The influence of plasma proteins and platelets on oxygen radical production and F-actin distribution in neutrophils adhering to polymer surfaces. *Biomaterials*, v. 23, n. 8, p. 1785–1795, 2002.
- NIMERI, G. et al. Oxygen radical production in neutrophils interacting with platelets and surface-immobilized plasma proteins: Role of tyrosine phosphorylation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 67A, n. 2, p. 439–447, 2003.
- NORRBY, K.; JAKOBSSON, A.; SÖRBO, J. Mast-cell-mediated angiogenesis: a novel experimental model using the rat mesentery. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology*, v. 52, n. 1, p. 195–206, 1986.

- NORRBY, K.; JAKOBSSON, A.; SÖRBO, J. Quantitative angiogenesis in spreads of intact rat mesenteric windows. *Microvascular Research*, v. 39, n. 3, p. 341-348, 1990.
- NOSBAUM, A. et al. Cutting Edge: Regulatory T Cells Facilitate Cutaneous Wound Healing. *The Journal of Immunology*, v. 196, n. 5, p. 2010–2014, 2016.
- NOSENGO, N. Can you teach old drugs new tricks? *Nature*, v. 534, n. 7607, p. 314–316, 2016.
- NUMASAKI, M. et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood*, v. 101, n. 7, p. 2620–2627, 2003.
- O'NEILL, E. et al. Amitriptyline protects against TNF- α -induced atrophy and reduction in synaptic markers via a Trk-dependent mechanism. *Pharmacology Research and Perspectives*, v. 4, n. 2, 2016.
- ORELLANO, L. A. A. et al. Angiopreventive versus angiopromoting effects of allopurinol in the murine sponge model. *Microvascular research*, v. 101, p. 118–26, 2015.
- OVIEDO-SOCARRÁS, T. et al. Diabetes alters inflammation, angiogenesis, and fibrogenesis in intraperitoneal implants in rats. *Microvascular Research*, v. 93, p. 23–29, 2014.
- OVIEDO SOCARRÁS, T. et al. Foreign body response to subcutaneous implants in diabetic rats. *PLoS ONE*, v. 9, n. 11, 2014.
- PAIK, Y. H. et al. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology*, v. 37, n. 5, p. 1043–1055, 2003.
- PANKAJ, S.; SANTOSH, K. S.; RAJMANI, P. New approach for the determination of tricyclic antidepressant amitriptyline using β -cyclodextrin-peg system via spectrophotometry. *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation*, v. 2, n. 2, p. 103- 107, 2012.
- PASSANITI, A. et al. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Laboratory Investigation*, 1992.
- PEREIRA, B. G. et al. Development of thalidomide-loaded biodegradable devices and evaluation of the effect on inhibition of inflammation and angiogenesis after subcutaneous application. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 71, p. 21–28, 2015.

- PEREIRA, L. X. et al. Kinetics of pancreatic tissue proliferation in a polymeric platform in mice. *Pancreatology*, v. 18, n. 2, p. 221–229, 2018.
- PINHAL-ENFIELD, G. et al. An angiogenic switch in macrophages involving synergy between toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A2A receptors. *American Journal of Pathology*, v. 163, n. 2, p. 711–721, 2003.
- PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomaterials: types, applications, and marked. *Química Nova*, v. 38, n.7, p. 957-971, 2015.
- POLLET, I. et al. Bacterial lipopolysaccharide directly induces angiogenesis through TRAF6-mediated activation of NF- κ B and c-Jun N-terminal kinase. *Blood*, v. 102, n. 5, p. 1740–1742, 2003.
- POPA, C. et al. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *Journal of Lipid Research*, 2007.
- PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 1977.
- PUSHPAKOM, S. et al. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018.
- QUARTERO, A.; MEINECHE-SCHMIDT, V.; MURIS, J.; RUBIN, G.; DE WIT, N. Bulking agents, antispasmodic and antidepressant medication for the treatment of irritable bowel syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 2, p. 1- 120, 2005.
- QUILLIN, R. C. et al. Inhibition of acidic sphingomyelinase reduces established hepatic fibrosis in mice. *Hepatology Research*, v. 45, n. 3, p. 305–314, 2015.
- RATNER, B. D. Reducing capsular thickness and enhancing angiogenesis around implant drug release systems. *Journal of Controlled Release*, 2002
- RATNER, B. D.; BRYANT, S. J. Biomaterials: Where we have been and where we are going. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2004.
- REID, B. et al. PEG hydrogel degradation and the role of the surrounding tissue environment. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 9, n. 3, p. 315–318, 2015.
- REN, K.; DUBNER, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nature Medicine*, 2010.

- REZZANI, R. et al. Mast cells and the inflammatory response to different implanted biomaterials. *Archives of Histology and Cytology*, v. 67, n. 3, p. 211–217, 2004.
- RIBATTI, D.; CRIVELLATO, E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 2012.
- ROBICH, M. P. et al. Myocardial therapeutic angiogenesis: A review of the state of development and future obstacles *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 2011.
- ROCKEY, D. C.; BELL, P. D.; HILL, J. A. Fibrosis — A Common Pathway to Organ Injury and Failure. *New England Journal of Medicine*, v. 372, n. 12, p. 1138–1149, 2015.
- RODERO, M. P.; KHOSROTEHRANI, K. Skin wound healing modulation by macrophages. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2010.
- RODRIGUEZ, A. et al. T cell subset distributions following primary and secondary implantation at subcutaneous biomaterial implant sites. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 85, n. 2, p. 556–565, 2008.
- ROSETI, L. et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering*, 2017.
- ROSSI, F.; SANTORO, M.; PERALE, G. Polymeric scaffolds as stem cell carriers in bone repair. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2015.
- RUTELLA, S.; DANESE, S.; LEONE, G. Tolerogenic dendritic cells: Cytokine modulation comes of age. *Blood American Society of Hematology*, 2006.
- SADEGHI, H. et al. A study on the mechanisms involving the anti-inflammatory effect of amitriptyline in carrageenan-induced paw edema in rats. *European journal of pharmacology*, v. 667, n. 1–3, p. 396–401, 2011.
- SALEM, H. A.; WADIE, W. Effect of Niacin on Inflammation and Angiogenesis in a Murine Model of Ulcerative Colitis. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.
- SARASWATI, S.; ALHAIDER, A. A.; ABDELGADIR, A. M. Costunolide suppresses an inflammatory angiogenic response in a subcutaneous murine sponge model. *APMIS*, v. 126, n. 3, p. 257–266, 2018.
- SCAPINI, P. et al. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunological Reviews*, 2000.

- SCHAUER, C. et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nature Medicine*, v. 20, n. 5, p. 511–517, 2014.
- SCHNEIDER, J.; PATTERSON, M.; JIMENEZ, X. F. Beyond depression: Other uses for tricyclic antidepressants. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* Cleveland, 2019.
- SELDERS, G. S. et al. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regenerative Biomaterials*, v. 4, n. 1, p. 55–68, 2017.
- SHEIKH, Z. et al. Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials. *Materials*, 2015.
- SHEN, E. C. et al. Releasing growth factors from activated human platelets after chitosan stimulation: A possible bio-material for platelet-rich plasma preparation. *Clinical Oral Implants Research*, v. 17, n. 5, p. 572–578, 2006.
- SHEN, M. et al. Effects of adsorbed proteins and surface chemistry on foreign body giant cell formation, tumor necrosis factor alpha release and procoagulant activity of monocytes. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 70, n. 4, p. 533–541, 2004.
- SJ, C. et al. An integrated dataset for in silico drug discovery. *Journal of integrative bioinformatics*, v. 7, n. 3, 2010.
- SOEHNLEIN, O. et al. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 2017.
- SRIDHARAN, R. et al. Biomaterial based modulation of macrophage polarization: A review and suggested design principles. *Materials Today*, 2015.
- STEWART, D.; NICHOL, A. Inflammation, immunity and allergy. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 2018.
- SUSSMAN, E. M. et al. Porous implants modulate healing and induce shifts in local macrophage polarization in the foreign body reaction. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 42, n. 7, p. 1508–1516, 2014.
- SZABA, F. M.; SMILEY, S. T. Roles for thrombin and fibrin(ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo. *Blood*, v. 99, n. 3, p. 1053–1059, 2002.

- SZABOWSKI, A. et al. c-Jun and JunB antagonistically control cytokineregulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell*, v. 103, n. 5, p. 745– 755, 2000.
- TACCHINI-COTTIER, F. et al. An Immunomodulatory Function for Neutrophils During the Induction of a CD4 + Th2 Response in BALB/c Mice Infected with *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*, v. 165, n. 5, p. 2628–2636, 2000.
- TALLEY, N. J. et al. Effect of amitriptyline and escitalopram on functional dyspepsia: A multicenter, randomized controlled study. *Gastroenterology*, v. 149, n. 2, p. 340- 349.e2, 2015.
- TANG, L.; EATON, J. W. Fibrinogen mediates acute inflammatory responses to biomaterials. *Journal of Experimental Medicine*, v. 178, n. 6, p. 2147–2156, 1993.
- TANG, L.; JENNINGS, T. A.; EATON, J. W. Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, n. 15, p. 8841– 8846, 1998.
- TEIXEIRA, A. S. et al. Angiogenesis and inflammation in skeletal muscle in response to ascites tumor in mice. *Life Sciences*, v. 78, n. 14, p. 1637–1645, 2006.
- THEVENOT, P.; HU, W.; TANG, L. Surface chemistry influences implant biocompatibility. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 8, n. 4, p. 270–80, 2008.
- THURASINGAM, T. et al. MAPKAPK-2 signaling is critical for cutaneous wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 130, n. 1, p. 278–286, 2010.
- TIAN, H.; TANG, Z.; ZHUANG, X.; CHEN, X. AND JING, X. Biodegradable synthetic polymers: preparation, functionalization and biomedical application. *Progress in Polymer Science*, v.37, n.2, p. 237-280, 2012.
- TOMASEK, J. J. et al. Myofibroblasts and mechano: Regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002.
- TREZZINI, C. et al. Fibrinogen association with human monocytes: Evidence for constitutive expression of fibrinogen receptors and for involvement of Mac-1 (CD18, CR3) in the binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 156, n. 1, p. 477–484, 1988.
- TSIROGIANNI, A. K.; MOUTSOPOULOS, N. M.; MOUTSOPOULOS, H. M. Wound healing: Immunological aspects. *Injury*, v. 37, 2006.

TURNER, E. H. et al. Selective Publication of Antidepressant Trials and Its Influence on Apparent Efficacy. *New England Journal of Medicine*, v. 358, n. 3, p. 252–260, 2008.

UNDERHILL, D. M.; GOODRIDGE, H. S. Information processing during phagocytosis. *Nature Reviews Immunology*, 2012.

VAN DEN DRIEST, J. J. et al. Amitriptyline for musculoskeletal complaints: A systematic review. *Family Practice*, 2017.

VEISEH, O. et al. Size- and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and non-human primates. *Nature Materials*, v. 14, n. 6, p. 643–651, 2015.

VENKAYYA, R. et al. The Th2 lymphocyte products IL-4 and IL-13 rapidly induce airway hyperresponsiveness through direct effects on resident airway cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 26, n. 2, p. 202–208, 2002.

VINISH, M. et al. Dendritic cells modulate burn wound healing by enhancing early proliferation. *Wound Repair and Regeneration*, v. 24, n. 1, p. 6–13, 2016.

VISHWAKARMA, A. et al. Engineering Immunomodulatory Biomaterials To Tune the Inflammatory Response. *Trends in Biotechnology*, 2016.

VISMARI, L. et al. A possible role to nitric oxide in the anti-inflammatory effects of amitriptyline. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, v. 34, n. 4, p. 578–585, 2012.

VISMARI, L.; ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Amitriptyline and acute inflammation: a study using intravital microscopy and the carrageenan-induced paw edema model. *Pharmacology*, v. 86, n. 4, p. 231–9, 2010.

VITTE, J. et al. Is there a predictable relationship between surface physicalchemical properties and cell behaviour at the interface? *European Cells and Materials*, 2004.

WEIRATHER, J. et al. Foxp3⁺ CD4⁺ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. *Circulation Research*, v. 115, n. 1, p. 55–67, 2014.

WENG, L. et al. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: A bridge to individualized cancer therapy. *Pharmacogenomics*, 2013.

- WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological Reviews*, 2003.
- WERNER, S.; KRIEG, T.; SMOLA, H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 127, n. 5, p. 998–1008, 2007.
- WETTERÖ, J.; BENGTSSON, T.; TENGVALL, P. Complement activation on immunoglobulin G-coated hydrophobic surfaces enhances the release of oxygen radicals from neutrophils through an actin- dependent mechanism. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 51, n. 4, p. 742–751, 2000.
- WILES, K. et al. The host immune response to tissue-engineered organs: Current problems and future directions *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 2016.
- WILSON, C. J. et al. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: A review. *Tissue Engineering*, 2005.
- WONG, J. Y.; BRONZINO, J. D. *Biomaterials*, Taylor & Francis Group: New York, 2007.
- WRIGHT, H. L. et al. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*, 2010.
- WU, Y. et al. The role of adsorbed fibrinogen in platelet adhesion to polyurethane surfaces: A comparison of surface hydrophobicity, protein adsorption, monoclonal antibody binding, and platelet adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 74, n. 4, p. 722–738, 2005.
- WYNN, T. A.; VANNELLA, K. M. *Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis*. Immunity Cell Press, 2016.
- XIA, B. T. et al. Amitriptyline Treatment Mitigates Sepsis-Induced Tumor Necrosis Factor Expression and Coagulopathy. *Shock (Augusta, Ga.)*, v. 51, n. 3, p. 356–363, 2019.
- YADAV, V. R.; TENG, B.; MUSTAFA, S. J. Enhanced A1 adenosine receptor-induced vascular contractions in mesenteric artery and aorta of in L-NAME mouse model of hypertension. *European Journal of Pharmacology*, v. 842, p. 111–117, 2019.
- YAMASHIRO, S. et al. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *Journal of leukocyte biology*, v. 69, n. 5, p. 698–704, 2001.

- YEU, Y.; YOON, Y.; PARK, S. Protein localization vector propagation: a method for improving the accuracy of drug repositioning. *Molecular BioSystems*, v. 11, n. 7, p. 2096–2102, 2015.
- YIU, E.; KORNBERG, A. Duchenne muscular dystrophy. *Neurology India*, 2008.
- YOKOYAMA, M. et al. Adhesion behavior of rat lymphocytes to poly(ether)–poly(amino acid) block and graft copolymers. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 20, n. 7, p. 867–878, 1986.
- ZAAFAN, M. A.; HARIDY, A. R.; ABDELHAMID, A. M. Amitriptyline attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis: modulation of the expression of NF- κ B, iNOS, and Nrf2. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 392, n. 3, p. 279–286, 2019.
- ZAISS, D. M. W. et al. Amphiregulin Enhances Regulatory T Cell-Suppressive Function via the Epidermal Growth Factor Receptor. *Immunity*, v. 38, n. 2, p. 275–284, 2013.
- ZAISS, D. M. W. et al. Emerging functions of amphiregulin in orchestrating immunity, inflammation, and tissue repair. *Immunity Cell Press*, 2015.
- ZDOLSEK, J.; EATON, J. W.; TANG, L. Histamine release and fibrinogen adsorption mediate acute inflammatory responses to biomaterial implants in humans. *Journal of Translational Medicine*, v. 5, 2007.
- ZHANG, L. et al. Zwitterionic hydrogels implanted in mice resist the foreignbody reaction. *Nature Biotechnology*, v. 31, n. 6, p. 553–556, 2013.
- ZHAO, Q. et al. Foreign body giant cells and polyurethane biostability: In vivo correlation of cell adhesion and surface cracking. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 25, n. 2, p. 177–183, 1991.
- ZIATS, N. P.; MILLER, K. M.; ANDERSON, J. M. In vitro and in vivo interactions of cells with biomaterials. *Biomaterials*, v. 9, n. 1, p. 5–13, 1988.

9. Anexos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do efeito modulatório do receptor do tipo Toll 4 (TLR4) na angiogênese", protocolo do CEUA: 331/2018 sob a responsabilidade de Paula Peixoto Campos Lopes que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 12/11/2018.

Vigência da Autorização	12/11/2018 a 11/11/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	11
Peso/Idade	24g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Cebio UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	11
Peso/Idade	24g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	CEBIO UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / C57BL/6
Nº de animais	11
Peso/Idade	24g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	René Rachou - Fiocruz MG

Considerações posteriores:

12/11/2018	Aprovado na reunião do dia 12/11/2018. Validade: 12/11/2018 à 11/11/2023
------------	--

Belo Horizonte, 18/11/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha

Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br



Amitriptyline Downregulates Chronic Inflammatory Response to Biomaterial in Mice

Karina Scheuermann,¹ Laura Alejandra Ariza Orellano,^{1,2} Celso Tarso Rodrigues Viana,¹ Clara Tolentino Machado,¹ Marcela Guimarães Takahashi Lazari,¹ Luciano Santos Aggum Capettini,³ Silvia Passos Andrade,⁴ and Paula Peixoto Campos^{1,5}

Received June 3, 2020; accepted October 2, 2020

Abstract—Recent data has signaled that in addition to its therapeutic indications as antidepressant and analgesic, amitriptyline (AM) exerts anti-inflammatory effects in humans and experimental animal models of acute inflammation. We tested the hypothesis that this compound could also modulate the chronic inflammatory process induced by synthetic matrix in mice. Polyether-polyurethane sponge disks were implanted subcutaneously in 9-week-old male C57BL/6 mice. The animals received by oral gavage 5.0 mg/kg of amitriptyline for seven consecutive days in two treatment regimens. In the first series, the treatment was initiated on the day of surgery and the implants removed at day 7 post-implantation. For the assessment of the effect of amitriptyline on chronic inflammation, the treatment was initiated 7 days post-implantation and the sponge discs removed 14 after implantation. The inflammatory markers evaluated, myeloperoxidase - MPO, nitrite content, IL-6, IFN- γ , TNF- α , CXCL1 and CCL2 levels, and NF- κ B transcription factor activation were reduced in implants when the treatment began 7 days post-implantation (chronic inflammation). In contrast, only mast cell number, MPO activity and activation of NF- κ B pathway decreased when the treatment began soon after implantation (sub-acute inflammation) in 7-day old implants. The anti-inflammatory effects of amitriptyline described here, extend its range of actions as a potential agent able to attenuate long-term inflammatory processes.

KEY WORDS: amitriptyline; anti-inflammatory; sponge model; chronic inflammation.

¹ Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627–Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais CEP 31270-901, Brazil

² Department of Pathology, University of Massachusetts Medical School, 368 Plantation St, Worcester, MA, United States

³ Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁴ Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁵ To whom correspondence should be addressed at Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627–Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais CEP 31270-901, Brazil. E-mail: paulapc@ufmg.br

INTRODUCTION

Antidepressant drugs, such as selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI), serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors (SSRI), and tricyclic antidepressants (TCA), initially used exclusively to treat depression, have been shown to lower inflammation markers in some pathological conditions in human and in experimental animal models [1, 2]. In *in vivo* studies that identified the anti-inflammatory effects of amitriptyline, several experimental

animal models were used. Intraperitoneal and intracerebroventricular administration of amitriptyline were able to decrease leukocyte infiltration and TNF- α and IL-1 β production in the carrageenan-induced paw edema model in rats [2, 3]. Amitriptyline was also effective in inhibiting myeloperoxidase activity and infiltrating leukocytes in the rat ulcerative colitis model [4]. The anti-inflammatory effects of this compound have also been demonstrated in mdx mice in Duchenne muscular dystrophy [5]. The mechanisms by which this compound exerts anti-inflammatory effects include inhibition of gene expression (Cdc6) involved in T cell proliferation, suppression of inflammatory proteins (STAT3 and COX2) [4], and/or regulation of pro and anti-inflammatory cytokine production (TNF- α , IL-10) [6].

Thus, in addition to the classic therapeutic indication in the treatment of psychological disorders and various types of pain, including inflammatory (rheumatoid arthritis and fibromyalgia) and neuropathic pain (neuropathic pain and postherpetic neuralgia), these reports extended the field of action of amitriptyline to pathological inflammatory processes. This concept of repositioning/reusing drugs, that is, finding new indications for existing drugs is of commercial and medical value, as it presents an excellent strategy to reach the ideal potential and maximize the value of a therapeutic drug [7].

The impact of amitriptyline treatment in the context of chronic wound care is relatively untapped. We hypothesize that this compound could also modulate inflammation in the mouse sponge implant model. In this chronic inflammation model, an acellular and avascular synthetic matrix, implanted subcutaneously on the back of the mouse, induces migration, proliferation, and activation of various cell types responsible for the development of fibrovascular tissue underlying chronic pathological conditions such as inflammatory processes and cancer [8, 9]. Using this model, we have been able to identify modulatory effects on the inflammatory and angiogenic components of the newly formed tissue induced by the synthetic matrix by a range of compounds which were primary designed for totally different pharmacological purposes (thalidomide, allopurinol, clotrimazole, dipyrindamole) and thus, proposing new therapeutic indication for well-known drugs [10–12].

We report here that amitriptyline was effective in inhibiting inflammation in the mouse sponge model. Thus, extending its effects to chronic inflammatory processes induced by biomaterial implantation.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Ethics Approval

Male C57/BL6 mice 9 weeks of age (20–25-g bodyweight) provided by the CEBIO (Center for Bioterism–UFMG/Brazil) were used. All animals had free access to water and feed and were housed with light cycles of 12 h and temperature controlled. The use of the mice and the procedures of this project were approved by CEUA-UFMG (Ethics Committee on Animals), through protocol 331/2018.

Sponge Discs Implantation and Amitriptyline Treatment

Polyether-polyurethane sponge disks (Vitafoam Ltd., Manchester, United Kingdom), 8 mm in diameter and 5 mm thick, were used as a matrix. For this, they remained immersed in ethanol 70% v/v overnight, with subsequent disinfection by boiling in distilled water for 20 min. Before to sponge implant surgery, the mice were anesthetized by intraperitoneal injection of the ketamine (60 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) mixture and trichotomized, and skin antisepsis with ethanol 70% v/v was performed. The sponge was implanted subcutaneously on the dorsum of the mice, and the incision was closed with nonabsorbable suture. After surgery, the mice were housed in individual boxes, with a normal diet and free water. Post-operatively, the animals were monitored for any signs of infection, discomfort or distress. The mice were divided into two groups of 8–10 animals; the control group received oral filtered water by gavage and the treated group received 5 mg/kg amitriptyline diluted in oral filtered water by gavage. The dosage was based on a pilot experiment and on published work [13]. Euthanasia was performed on the 7th or 14th post-implant; both groups received amitriptyline for 7 days. The 7th-day group began to receive treatment on the same day of implantation and the 14th-day group on the 7th post-implantation day. The implants were carefully removed, separated, and/or weighed for histopathological and inflammatory marker analyses.

Determination of Myeloperoxidase (MPO) Activities

Neutrophil infiltration into implants was indirectly determined by the analysis of modified myeloperoxidase activity [14]. The implants were weighed, homogenized in pH 4.7 buffer (0.1 M NaCl, 0.02 M Na₃PO₄ and 0.015 M Na₂EDTA) and centrifuged at 10.000 \times g at 4 °C for 15 min. The pellets were then resuspended in 0.05 M NaPO₄ buffer

(pH 5.4) containing 0.5% HTAB, followed by three freezing and thawing cycles in liquid nitrogen. MPO activity in the supernatant of the samples was determined by measuring the change in absorbance (optical density; OD) at 450 nm using TMB (1.6 mM) and H₂O₂ (0.3 mM) in duplicate 96-well plates. The reaction was stopped by the addition of H₂SO₄ (4 M). Results were expressed as change in wet tissue OD/mg.

Determination of N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase (NAG) Activities

Macrophage infiltration into the implants was quantified by measuring the levels of the lysosomal enzyme N-acetylglucosaminidase [14]. Samples were homogenized in NaCl (0.9% v/v) solution containing 0.1% v/v Triton X-100 (Promega, USA) and centrifuged at 3,000×g at 4 °C for 10 min. In 96-well plates, duplicate sample supernatant was incubated for 30 min at 37 °C with diluted p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide (Sigma-Aldrich, USA) in citrate phosphate buffer (0.1 M C₆H₈O₇, 0.1 M Na₂HPO₄, pH 4.5) at a final concentration of 2.24 mM. The reaction was stopped by the addition of 0.2 M glycine buffer (pH 10.6). Substrate hydrolysis was determined by measuring absorption at 400 nm. Results were expressed as nmol/mg wet tissue.

Measurement of Cytokines

The concentrations of cytokines were estimated in sponge homogenate by ELISA, using the kits standardized by R&D systems and following the manufacturer's recommendations. To obtain the homogenate, the implants were homogenized with Drabkin's reagent (Labtest) and centrifuged at 10,000×g at 4 °C for 40 min. Subsequently, the supernatant of the samples was filtered using a 0.22-μm filter set (Millipore), and the resulting material was used. 96-well plates (Nunc, MaxiSorp™) were incubated with 1× PBS (pH 7.4) containing capture antibody overnight at 4 °C. After incubation, plates were washed with wash buffer (1× PBS pH 7.4 + 0.05% Tween 20) and blocked with blocking buffer (1× PBS pH 7.4 + 1% BSA). After incubation for 2 h, the plates were washed, received the standard curve, blank and samples, and were again incubated overnight at 4 °C. The following day, the plates were washed and incubated for 2 h at room temperature with detection antibody diluted in dilution buffer (1× PBS pH 7.4 + 0.1% BSA). Developing occurred with the addition of substrate (H₂O₂ + OPD) and after approximately 20–30 min of incubation, the reaction was stopped by the addition of 1 M H₂SO₄. Color intensity was determined by

a plate reader with a 492-nm filter. Results were compared to a specific standard curve for each cytokine/chemokine evaluated, and results were expressed as μg/mg wet tissue. Some analyses were also performed on serum; however, the results were expressed as μg/ml.

Measurement of Nitric Oxide (NO) Production

Nitric oxide (NO) production was determined by nitrite levels according to the method described by GRIESS, 1879 [15], and modified by CASTRO *et al.* [16]. Samples were homogenized in NaCl (0.9% v/v) solution containing 0.1% v/v Triton X-100 (Promega, Madison, WI, USA) and centrifuged at 3,000×g at 4 °C for 10 min. In 96-well plates, the sample supernatant and the standard curve, in duplicate, were incubated with sulfanilamide solution (1% sulfanilamide + 5% H₃PO₄) for 10 min at room temperature. Subsequently, the blank, standard curve and samples were incubated with NED solution (NED diluted in 0.1% Milli-Q water) for 10 min at room temperature. The reading was taken on a 540-nm filter plate reader, and the amount of nitrite was calculated using the sodium nitrite (NaNO₂) curve as standard. Results were expressed as μmol/mg wet tissue.

Western Blot

Western blotting was performed as previously described by CAPETTINI *et al.* [17], with modifications [18]. The sponge implants were dissected and immediately frozen at –80 °C. Subsequently, they were homogenized in lysis buffer (Gyorke) (in mmol·L⁻¹: 150 NaCl, 50 Tris-HCl, 5 EDTA.2Na and 1 MgCl₂ containing 1% Triton X-100 and 0.5% SDS) plus a cocktail of protease inhibitors (SigmaFAST®, Sigma, USA) and phosphatase (20 mmol L⁻¹ NaF; 0.1 mmol L⁻¹ Na₃VO₄). Nuclear extraction buffer (1× solution composed of 20 mM Tris HCl, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 1 mM PMSF, and 25% (v/v) glycerol, adjusted for nuclear extraction) was used to pH 8.0. Denaturation of 50 μg of protein, separation by 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transfer to a nitrocellulose membrane (Millipore, USA). Blocking of nonspecific markings was performed at room temperature for 1 h with skim milk powder diluted in 2.4% PBS 1× and 0.1% Tween 20. Subsequently, the polyclonal rabbit anti-NF-κB p65 antibody was incubated (1:1000) and mouse anti-β-tubulin monoclonal antibody (1:1000) at –4 °C overnight. Immunoreactive bands were detected using fluorescent secondary antibodies (Santa Cruz, USA).

Histological Evaluation

The implants were fixed in formalin (10% v/v in 1× PBS) for 24 h and subsequently processed for paraffin embedding. Sections were made in microtome 5 μm thick and stained with hematoxylin/eosin (H&E) and Dominici. For mast cell count, all fields were captured with a ×40 objective optical microscopy ×400 final magnification) and analyzed.

Statistical Analysis

Results are presented as mean ± SEM. Normality and homoscedasticity were determined for further statistical analysis. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7.0 software, and a value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Comparisons between the two groups were made by Student's *t* test for unpaired groups.

RESULTS

The treatment was well tolerated by the animals. There were no signs of toxicity, infection or implant rejection in the untreated and treated groups.

The effect of amitriptyline (AM) treatment was predominantly inhibitory on the inflammatory component of implant-induced fibroproliferative tissue when systemic administration of AM (5 mg/kg) was started 7 days post-implant. AM treatment was unable to reduce the cellular infiltrate in the fibrovascular tissue of 7-day old implants but attenuated cellularity of 14-day old implants (H&E staining; Fig. 1a–d). In implant section staining with Dominici, mast cell number was reduced in 7-day old implants of the treated group compared with the number in the control group. The decrease in mast cell number in 14-day old implants of AM-treated animals did not reach statistical significance (Fig. 2a–f).

AM was effective in decreasing neutrophil numbers (MPO activity-OD/mg wet tissue) in both groups of treated acute and chronic (Fig. 3a, b). The treatment was unable to change macrophages numbers (NAG activity-nmol/mg wet tissue) in both treated groups relative to the control values (Fig. 3c, d). Nitric oxide release (nitrite content-μmol/mg wet tissue) in implant-induced fibrovascular tissue was decreased by AM only when the treatment was started 7 days post-implant (Fig. 3e, f).

AM was also effective in reducing the levels of the pro-inflammatory cytokines, IL-6, IFN-γ, and TNF-α (pg/mg wet tissue) in 14-day old implants when the treatment

began 7 days post-implantation (Fig. 4a–f). We did not observe a significant change in the production of anti-inflammatory cytokine IL-10 in the two analyzed periods (Fig. 4g, h). The production of the chemokines CXCL1 and CCL2 in the implants after AM treatment was reduced only in 14-day old implants compared with the control values (Fig. 5a–d).

Western blotting evaluation of p65 expression also confirmed the anti-inflammatory effects of amitriptyline by showing that treatment reduced p65 translocation to the nucleus, and consequently reduced NF-κB expression in the implants of both groups of treated animals (Fig. 6a–c). AM was able to reduce the circulating TNF-α levels (CT 0.02 ± 0.006 AM 0.03 ± 0.006, 7 days and CT 0.04 ± 0.02 AM 0.02 ± 0.004 pg/ml, 14 days) in the serum of treated animals for 14 days relative to their control counterparts (Fig. 7a, b).

DISCUSSION

In addition to the classic therapeutic indication for Amitriptyline (AM) in the treatment of psychological disorders and various types of pain, including inflammatory (rheumatoid arthritis and fibromyalgia) and neuropathic (neuropathic pain and postherpetic neuralgia) pain, reports have shown the effects of AM in pathological inflammatory processes in humans and experimental animal models of acute inflammation [19–22]. As the impact of amitriptyline treatment in the context of chronic inflammation is relatively untapped and based on existing reports, we tested the hypothesis that this compound might also modulate inflammation induced by the synthetic matrix of polyether-polyurethane (the mouse sponge implant model). Using our sponge implant inflammatory model, we have been able to identify the anti-inflammatory activity of AM. The inflammatory process that develops inside and around 14-day old implants has been shown, by our group, to exhibit relevant features of long duration inflammation, such as presence of macrophages, fibroblasts, newly formed vascular bed, and type III and type 1 collagen [14, 16, 23]. In this work, we have confirmed that chronic inflammation was the predominant characteristic observed in 14-day old implants of the control group. However, the amount of neutrophils (hallmark feature of acute inflammation) did not decrease in the untreated group at this time point. This finding is interesting and in agreement with the notion that neutrophils play important role in chronic inflammatory diseases. Relevant mechanisms include their interplay with the monocyte lineage—for example, the

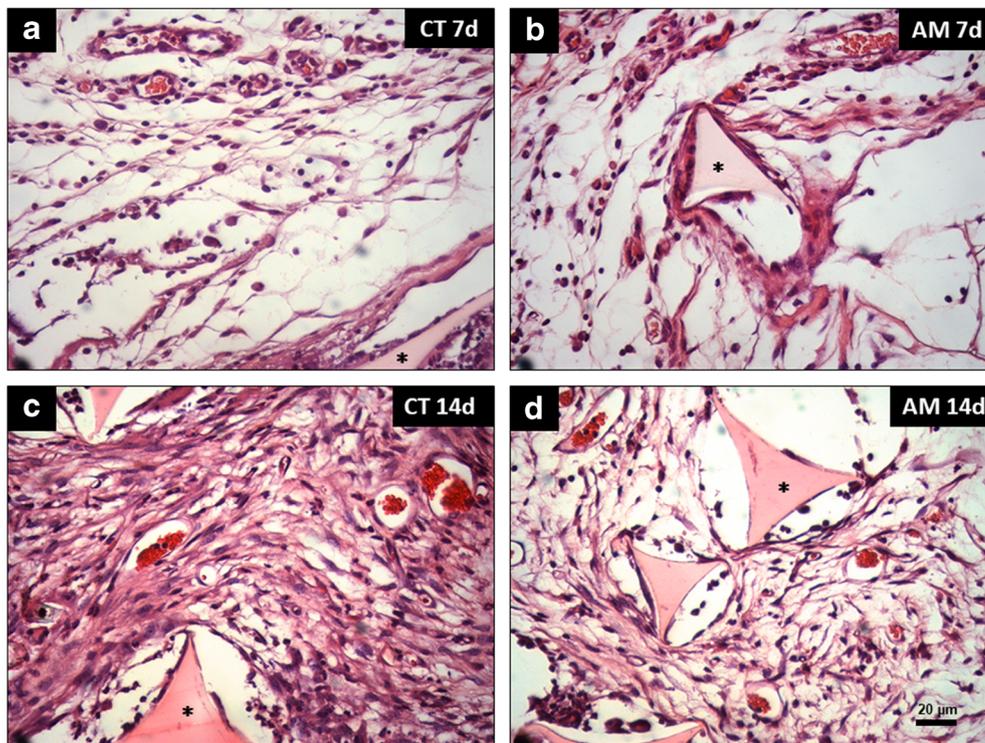


Fig. 1. Histology evidence of amitriptyline treatment decreases acute but not chronic inflammation induced by sponge matrix. Representative histological sections (5 μ m) of sponge implants stained with hematoxylin and eosin (H&E) showing the pattern of the fibrovascular tissue infiltration (**a–d**). The pores of the synthetic matrix, seen as triangular shapes (*), are occupied by inflammatory cells, fibroblasts, and blood vessels embedded in the extracellular matrix. Treatment with amitriptyline reduced cellularity of 14-day old implants (**b**), but we did not observe significant differences in cellularity between 7-day old implants of treated and non-treated groups (**d**). CT control groups, AM amitriptyline-treated groups.

enhancement of monocyte recruitment and the activation of macrophages—and their direct pro-inflammatory effects, such as release of reactive oxygen species and neutrophil extracellular traps (NETs), and neutrophil-derived proteolytic activity [24]. Thus, it is possible that, maintenance of neutrophil recruitment at day 14-post implantation in our system is also part of the chronic inflammatory process induced by the implant.

Recruitment of leukocytes from the bloodstream to the inflammatory site involves a sequence of events coordinated by cytokines and chemokines produced by tissue-resident cells (*e.g.*, macrophages and mast cells), and the interaction between cells and cell-matrix [25, 26]. In our work we have chosen to evaluate the production of the cytokine (TNF- α) and the chemokines (CXCL1/KC and CCL2/JE) because they have been shown to be involved in a number of acute as well as chronic inflammatory processes acting in the recruitment/activation of inflammatory and/or endothelial cells. In addition, the number of mast cells and enzymatic activities of MPO and NAG were determined [27, 28]. TNF- α is a pleiotropic cytokine

produced by a variety of cell types, including macrophages, neutrophils, lymphocytes, endothelial, and mast cells. This cytokine has been shown to be a potent modulator of the expression of inflammatory molecules depending on the local concentration or duration of the exposure [29, 30]. The chemokines CXCL1/KC and CCL2/JE have also been shown to induce inflammatory cell recruitment/activation [31–33]. Activities of inflammatory enzymes such as myeloperoxidase-MPO and n-acetyl- β -D-glucosaminidase-NAG are well established assays to evaluate indirectly the number of leukocytes (neutrophils and macrophages, respectively) in inflammatory sites and processes including in the sponge implant [34, 35].

We have also examined whether NF- κ B transcription factor was activated in the inflammatory process induced by the implant and whether AM was able to modulate its transcription. This factor plays important roles in inflammatory and immune responses where pro-inflammatory cytokines drive activation of NF- κ B, and the activation of NF- κ B drives proinflammatory cytokine production [36, 37].

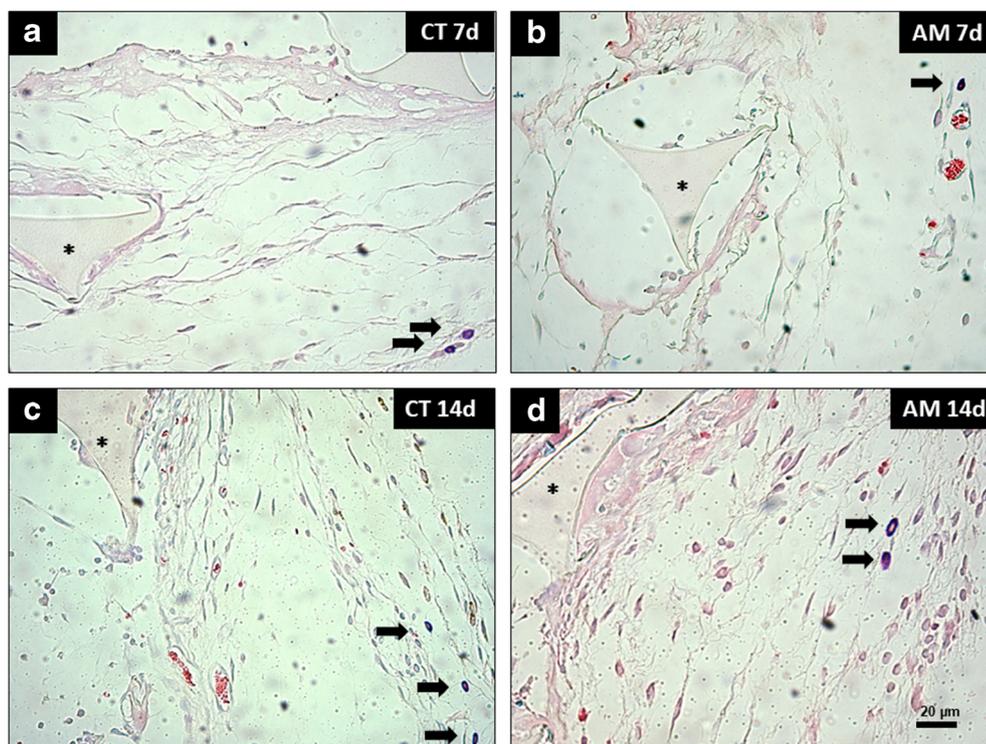


Fig. 2. Effect of amitriptyline treatment on mast cell recruitment. Representative histological sections (5 μ m) of sponge implants stained with Dominici showing mast cell number (a–d). The pores of the synthetic matrix are seen as triangular shapes (*). Treatment with amitriptyline significantly reduced mast cell number when the treatment started on the same day of implantation (e). Arrows: mast cells. Values are means \pm SEM of 5 animals in each group. * $p < 0.05$ —Student's t test; CT, control groups; AM, amitriptyline-treated groups.

The main finding of our study was that the anti-inflammatory effects of amitriptyline treatment in our experimental system were most evident when the treatment started 7 days after implantation (chronic inflammation) but not when AM was administered in the same day of sponge implantation. This is in contrast with several publications that have shown anti-inflammatory activity of AM in acute inflammatory processes such as the work by [1, 2, 4]. XIA *et al.* [1] showed in a murine sepsis model that amitriptyline treatment reduced inflammation and alleviated sepsis-induced coagulopathy. VISMARI *et al.* [14], by means of a carrageenan-induced paw edema model in rats, showed that amitriptyline was able to decrease edema and affect leukocyte behavior in an acute inflammatory process, as well as suggesting alpha-1-adrenoceptors participation in the anti-inflammatory effects of amitriptyline. VISMARI *et al.* [2] evaluated the effect of amitriptyline co-administered with L-name (a NO synthase inhibitor) in rats in a carrageenan-induced paw edema model and another in acute peritonitis to investigate a possible participation of NO in the anti-inflammatory effects of amitriptyline. As L-name potentiated

amitriptyline-induced anti-inflammatory effects in the paw edema model, the anti-inflammatory effects of amitriptyline may be due to a decrease in NO production and may be associated with a decrease in serum levels of the IL-1 β and TNF- α . This discrepancy may be attributed to different animal models, dosage, treatment protocol, *etc.* However, our results share similarities regarding the parameters evaluated. In our model, the anti-inflammatory effect was associated with decreased recruitment/activation of inflammatory cells such as mast cells, neutrophils (myeloperoxidase activity) and macrophages (N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity) as determined in the 14-day old implants. The decrease in inflammatory cell number (mast cell counting) and activation (inflammatory enzyme activity) has been reported in other inflammatory models [38–41]. In our system, AM downregulated IL-6, IFN- γ , TNF- α , and CXCL1 production and inhibited activation of the transcription factor NF- κ B, an important pro-inflammatory response activator in the 14-day old treated implant. Furthermore, the systemic level (serum) of TNF- α in AM-treated animals was decreased compared with that of untreated animals. These findings agree with the works

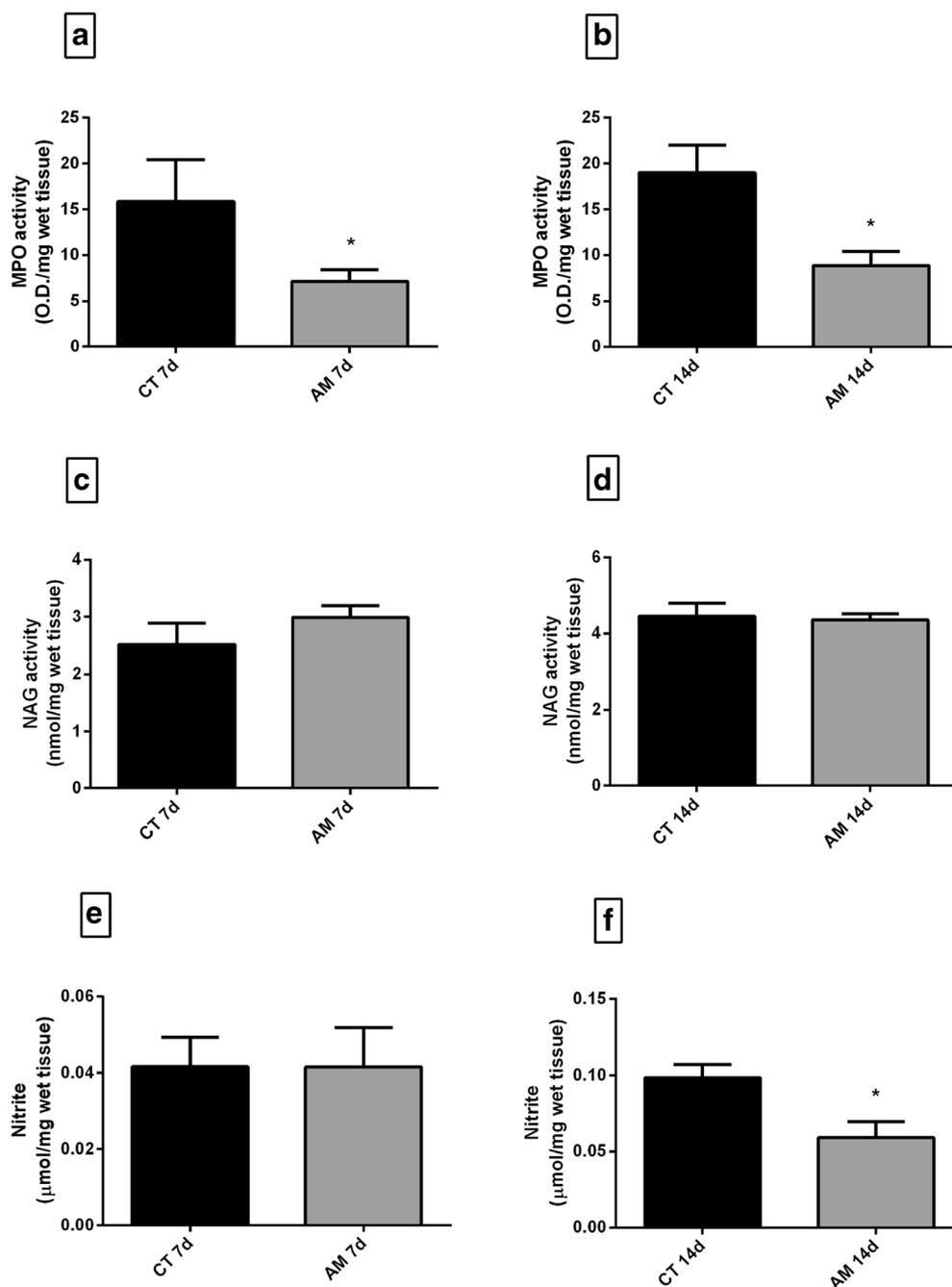


Fig. 3. Effects of amitriptyline treatment on neutrophils and macrophages recruitment/activation *in vivo*. (a, b) myeloperoxidase - MPO, (C and D) n-acetyl- β -D-glucosaminidase - NAG, and (E and F) nitrite production - NO. the inflammatory markers MPO and nitrite significantly decreased when the treatment started 7 days after implantation but not when the treatment started on the day of implantation. Values are mean \pm SEM of 5–8 animals in each group. * $p < 0.05$ —Student’s *t* test. CT, control groups; AM, amitriptyline-treated groups.

that have shown that AM was able to decrease these parameters in colitis, sepsis, etc. [1, 4, 42] AM is likely to contribute to the reduction of persistent tissue damage by

being able to control factors involved in inflammation in our study.

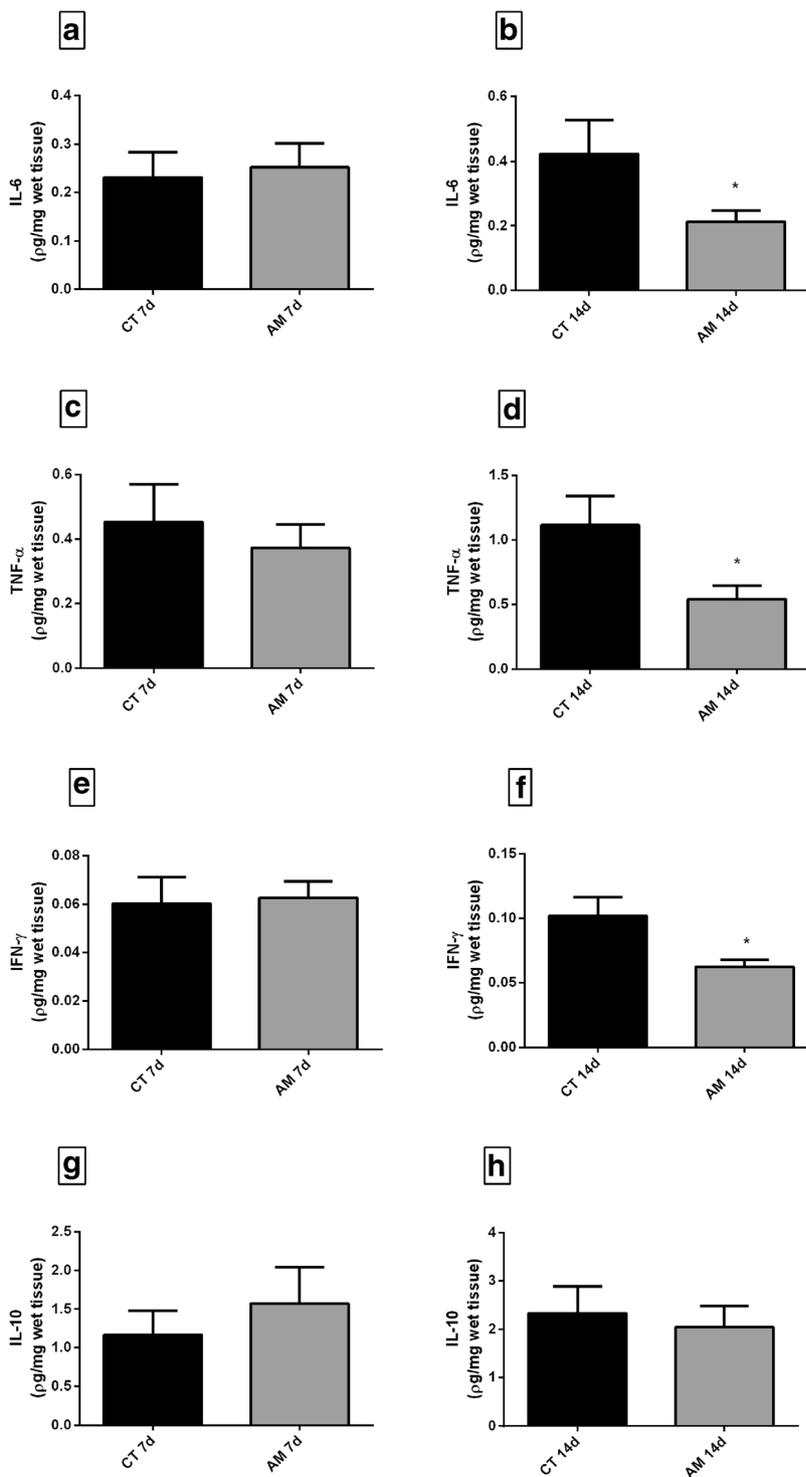


Fig. 4. Effects of amitriptyline treatment on cytokine levels in fibrovascular connective proliferating tissue. (a, b) IL-6, (c, d) TNF- α , (E and F) IFN- γ and (G and H) IL-10. The proinflammatory cytokines production IL-6, TNF- α , and IFN- γ decreased when the treatment started 7 days after implantation. The production of IL-10 was not affected by AM in two periods evaluated. Values are mean \pm SEM of 5–8 animals in each group. * $p < 0.05$ —Student’s t test. CT, control groups; AM amitriptyline-treated groups.

Amitriptyline Downregulates Chronic Inflammatory Response

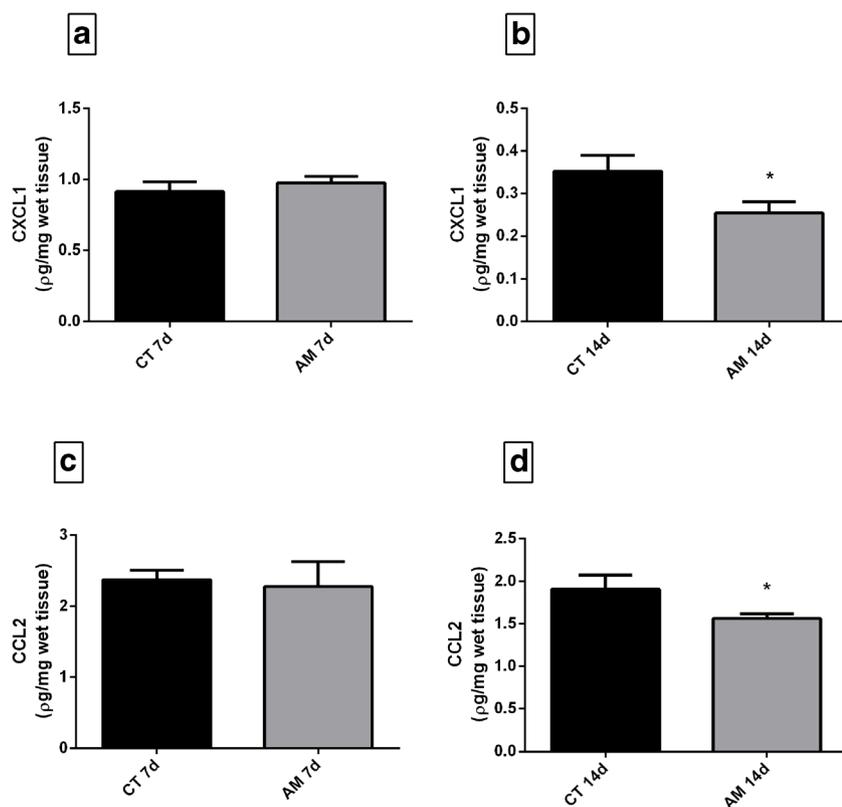


Fig. 5. Biochemical corroboration of amitriptyline treatment reduces acute but not chronic inflammation induced by sponge matrix. Chemokine levels of (a, b) CXCL1 and (c, d) CCL2 in the fibrovascular tissue induced by the sponge matrix. This chemokines production significantly decreased when the treatment started 7 days after implantation but not when the treatment started on the day of the implantation. Values are mean \pm SEM of 5–8 animals in each group. * $p < 0.05$ —Student’s *t* test. CT, control groups; AM, amitriptyline-treated groups.

Biomaterial implantation is a common therapeutic procedure that very often induces an inflammatory response impairing the functionality of the device. Thus, based on our findings, it is tempting to propose that AM

holds potential therapeutic value in the management of adverse inflammatory response to foreign material extending the range of actions of a well-known drug. This concept of repositioning/reusing drugs, that is, finding new

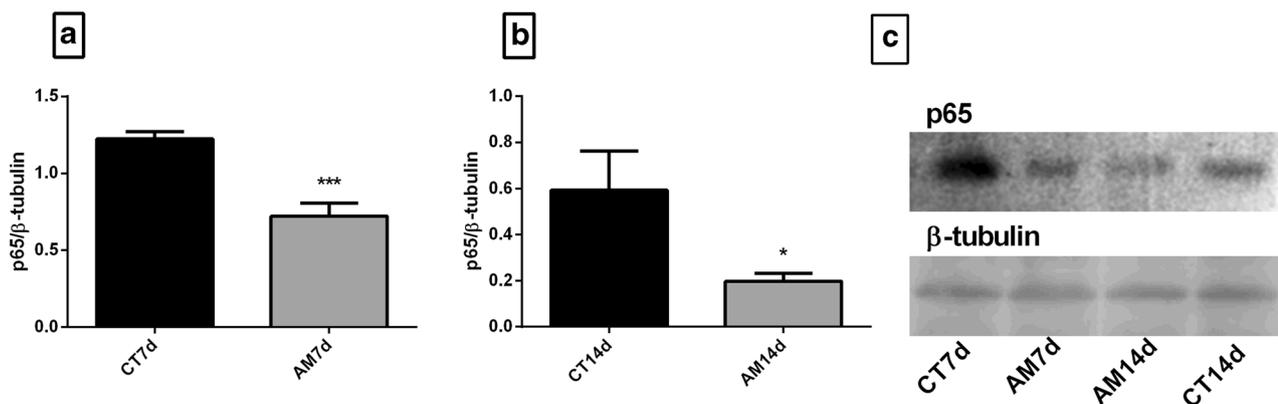


Fig. 6. Effect of amitriptyline treatment on p65 (nucleus) translocation. In 7-day old (a) and 14-day old implants (b). Amitriptyline induced downregulation in the translocation of p65 to nucleus (c). Images are representative blots from four separate experiments. The results are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ —Student’s *t* test. CT, control groups; AM, amitriptyline-treated groups.

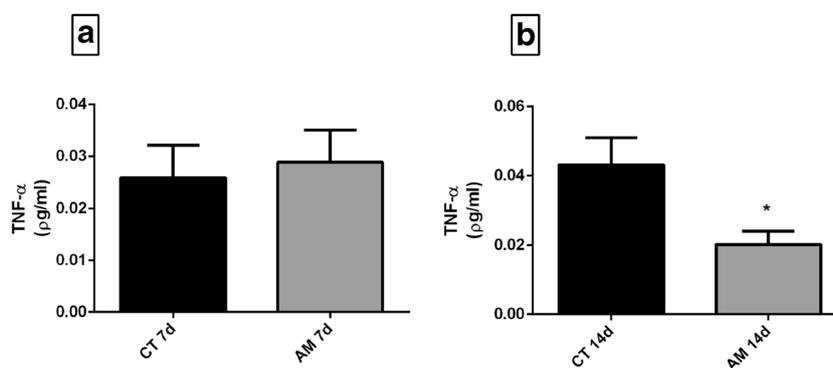


Fig. 7. Systemic effects of amitriptyline treatment. TNF- α serum levels (a, b). Significant decrease in TNF- α levels was observed in both treated groups compared with the control. Values are mean \pm SEM of 5–8 animals in each group. * $p < 0.05$ —Student's t test. CT, control groups; AM, amitriptyline-treated groups.

indications for existing drugs is of commercial and medical value, as it presents an excellent strategy to reach the ideal potential and maximize the value of a therapeutic drug [19].

CONCLUSIONS

The inflammatory markers MPO, nitrite, IL-6, IFN- γ , TNF- α , CXCL1 and CCL2 levels, and NF- κ B transcription factor activation were reduced in implants when the treatment began 7 days post-implantation (chronic inflammation);

Mast cell number, MPO activity, and activation of NF- κ B pathway decreased when the treatment began soon after implantation (sub-acute inflammation) in 7-day old implants.

The anti-inflammatory effects of amitriptyline showed that it can act as a potential agent able to attenuate long-term inflammatory processes.

ACKNOWLEDGMENTS

The western blots images shown in this work were obtained using Typhoon™ FLA 9000 scanner equipment in the Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI-ICB/UFMG).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection, and analysis were performed by Karina Scheuermann, Laura Alejandra Ariza Orellano, Luciano Santos Aggum Capettini, Silvia Passos Andrade, and Paula Peixoto Campos. The first draft

of the manuscript was written by Paula Peixoto Campos and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

The Brazilian Research Support from FAPEMIG and CNPq funded this project (grant number: APQ-01140-13 and 448853/2014-0).

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

Conflict of Interest. The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Xia, Brent T., Nadine Beckmann, Leah K. Winer, Young Kim, Holly S. Goetzman, Rosalie E. Veile, Erich Gulbins, Michael D. Goodman, Vanessa Nomellini, and Charles C. Caldwell. 2019. Amitriptyline treatment mitigates sepsis-induced tumor necrosis factor expression and coagulopathy. *Shock* 51: 356–363. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001146>.
- Vismari, Luciana, Glaucie J. Alves, Marcelo N. Muscará, and João Palermo-Neto. 2012. A possible role to nitric oxide in the anti-inflammatory effects of amitriptyline. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 34: 578–585. <https://doi.org/10.3109/08923973.2011.638305>.
- Hajhashemi, Valiollah, Hossein Sadeghi, Mohsen Minaian, Ahmad Movahedian, and Ardeshtir Talebi. 2010. The role of central mechanisms in the anti-inflammatory effect of amitriptyline on carrageenan-induced paw edema in rats. *Clinics* 65: 1183–1187. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322010001100022>.
- Fattahian, Ehsan, Valiollah Hajhashemi, Mohammad Rabbani, Mohsen Minaian, and Parvin Mahzouni. 2016. Anti-inflammatory effect of amitriptyline on ulcerative colitis in normal

Amitriptyline Downregulates Chronic Inflammatory Response

- and reserpine-induced depressed rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 15: 125–137. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2016.1813>.
5. Manning, Jennifer, Rebecca Kulbida, Prerana Rai, Lindsay Jensen, Judith Bouma, Sanjay P. Singh, D. O'Malley, and Deniz M. Yilmazer-Hanke. 2014. Amitriptyline is efficacious in ameliorating muscle inflammation and depressive symptoms in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Experimental Physiology* 99: 1370–1386. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2014.079475>.
 6. Szałach, Lukasz P., Katarzyna A. Lisowska, and Wiesław J. Cudała. 2019. The influence of antidepressants on the immune system. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 67. Springer International Publishing: 143–151. <https://doi.org/10.1007/s00005-019-00543-8>.
 7. Ashburn, Ted T., and Karl B. Thor. 2004. Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 3: 673–683. <https://doi.org/10.1038/nrd1468>.
 8. Orellano, Laura Alejandra Ariza, Simone Aparecida de Almeida, Luciana Xavier Pereira, Clara Tolentino Machado, Celso Tarso Rodrigues Viana, Silvia Passos Andrade, and Paula Peixoto Campos. 2020. Implant-induced inflammatory angiogenesis is upregulated in obese mice. *Microvascular Research* 131. Elsevier Inc: 104014. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104014>.
 9. Viana, Celso Tarso Rodrigues, Laura Alejandra Ariza Orellano, Luciana Xavier Pereira, Simone Aparecida de Almeida, Leticia Chinait Couto, Marcela Guimarães Takahashi de Lazari, Silvia Passos Andrade, and Paula Peixoto Campos. 2018. Cytokine production is differentially modulated in malignant and non-malignant tissues in ST2-receptor deficient mice. *Inflammation* 41. Inflammation: 2041–2051. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0847-y>.
 10. Belo, Andreza V., Lucíola S. Barcelos, Mauro M. Teixeira, Mônica A.N.D. Ferreira, and Silvia P. Andrade. 2004. Differential effects of antiangiogenic compounds in neovascularization, leukocyte recruitment, VEGF production, and tumor growth in mice. *Cancer Investigation* 22: 723–729. <https://doi.org/10.1081/CNV-200032992>.
 11. Orellano, L. A.A., S. A. Almeida, P. P. Campos, and S. P. Andrade. 2015. Angiopreventive versus angiopromoting effects of allopurinol in the murine sponge model. *Microvascular Research* 101. Elsevier Inc.: 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2015.07.003>.
 12. Marques, Suzane M., Pollyana R. Castro, Paula P. Campos, Celso T.R. Viana, Patricia M. Parreira, Mônica A.N. Ferreira, and Silvia P. Andrade. 2014. Genetic strain differences in the development of peritoneal fibroproliferative processes in mice. *Wound Repair and Regeneration* 22: 381–389. <https://doi.org/10.1111/wrr.12177>.
 13. Furgala, Anna, Robert Sałat, and Kinga Sałat. 2018. Acute cold allodynia induced by oxaliplatin is attenuated by amitriptyline. *Acta Neurobiol Exp* 78: 315–321. <https://doi.org/10.21307/ane-2018-030>.
 14. Cassini-Vieira, Puebla, Melissa de Carvalho Santuchi, Rafaela Fernandes da Silva, Remo Castro Russo, Fernanda Assis Araújo, Robson Augusto Souza dos Santos, Silvia Passos Andrade, Mauro Martins Teixeira, and Lucíola Silva Barcelos. 2018. Lack of interferon-gamma attenuates foreign body reaction to subcutaneous implants in mice. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 106: 2243–2250. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36416>.
 15. Griess, Peter. 1879. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt Ueber einige Azoverbindungen. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 12: 426–428. <https://doi.org/10.1002/cber.187901201117>.
 16. Castro, Pollyana R., Suzane M. Marques, Celso T.R. Viana, Paula P. Campos, Mônica A.N.D. Ferreira, Lucíola S. Barcelos, and Silvia P. Andrade. 2014. Deletion of the chemokine receptor CCR2 attenuates foreign body reaction to implants in mice. *Microvascular Research* 95. Elsevier Inc.: 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2014.07.002>.
 17. Capettini, L.S.A., S.F. Cortes, J.F. Silva, J.I. Alvarez-Leite, and V.S. Lemos. 2011. Decreased production of neuronal NOS-derived hydrogen peroxide contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis. *British Journal of Pharmacology* 164: 1738–1748. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01500.x>.
 18. Orellano, Laura Alejandra Ariza, Simone Aparecida de Almeida, Luciana Xavier Pereira, Leticia Chinait Couto, Marcela Guimarães Takahashi de Lazari, Celso Tarso Rodrigues Viana, Silvia Passos Andrade, and Paula Peixoto Campos. 2018. Upregulation of foreign body response in obese mice. *Obesity* 26: 531–539. <https://doi.org/10.1002/oby.22102>.
 19. Goldenberg, Don, Michael Mayskiy, Christopher Mossey, Robin Ruthazer, and Christopher Schmid. 1996. A randomized, double-blind crossover trial of fluoxetine and amitriptyline in the treatment of fibromyalgia. *Arthritis and Rheumatism* 39: 1852–1859. <https://doi.org/10.1002/art.1780391111>.
 20. Johnson, Bobby L., Teresa C. Rice, Brent T. Xia, Kirsten I. Boone, Ellis A. Green, Erich Gulbins, and Charles C. Caldwell. 2016. Amitriptyline usage exacerbates the immune suppression following burn injury. *Shock* 46: 541–548. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000648>.
 21. O'Neill, Eimear, Billy Kwok, Jennifer S. Day, Thomas J. Connor, and Andrew Harkin. 2016. Amitriptyline protects against TNF- α -induced atrophy and reduction in synaptic markers via a Trk-dependent mechanism. *Pharmacology Research and Perspectives* 4: 1–15. <https://doi.org/10.1002/prp2.195>.
 22. Talley, Nicholas J., G. Richard Locke, Yuri A. Saito, Ann E. Almazar, Ernest P. Bouras, Colin W. Howden, Brian E. Lacy, et al. 2015. Effect of amitriptyline and escitalopram on functional dyspepsia: A multicenter, randomized controlled study. *Gastroenterology* 149. Elsevier Ltd: 340–349.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.020>.
 23. Pereira, Luciana Xavier, Celso Tarso Rodrigues Viana, Laura Alejandra Ariza Orellano, Simone Aparecida de Almeida, Marcela Guimarães Takahashi de Lazari, Leticia Chinait Couto, Anilton Cesar Vasconcelos, Silvia Passos Andrade, and Paula Peixoto Campos. 2018. Kinetics of pancreatic tissue proliferation in a polymeric platform in mice. *Pancreatology* 18: 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2017.12.011>.
 24. Soehnlein, Oliver, Sabine Steffens, Andrés Hidalgo, and Christian Weber. 2017. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nature Reviews Immunology* 17. Nature Publishing Group: 248–261. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.10>.
 25. Stewart, Darryl, and Alistair Nichol. 2018. Inflammation, immunity and allergy. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* 19. Elsevier Ltd: 534–539. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2018.08.011>.
 26. Medzhitov, Ruslan. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454: 428–435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>.
 27. Ahmed, Afsar U. 2011. An overview of inflammation: Mechanism and consequences. *Frontiers of Biology in China* 6: 274–281. <https://doi.org/10.1007/s11515-011-1123-9>.
 28. Saraswati, Sarita, Abdulqader A. Alhaider, and Abdelgalil M. Abdelgadir. 2018. Costunolide suppresses an inflammatory angiogenic response in a subcutaneous murine sponge model. *Apmis* 126: 257–266. <https://doi.org/10.1111/apm.12808>.
 29. Maggio, Nicola, and Andreas Vlachos. 2018. Tumor necrosis factor (TNF) modulates synaptic plasticity in a concentration-dependent manner through intracellular calcium stores. *Journal of Molecular*

- Medicine* 96. *Journal of Molecular Medicine*: 1039–1047. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1674-1>.
30. Popa, Calin, Mihai G. Netea, Piet L.C.M. Van Riel, Jos W.M. Van Der Meer, and Anton F.H. Stalenhoef. 2007. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *Journal of Lipid Research* 48: 751–752. <https://doi.org/10.1194/jlr.R600021-JLR200>.
 31. Guabiraba, Rodrigo, Remo C. Russo, Amanda M. Coelho, Mônica A.N.D. Ferreira, Gabriel A.O. Lopes, Ariane K.C. Gomes, Silvia P. Andrade, Luciola S. Barcelos, and Mauro M. Teixeira. 2013. Blockade of cannabinoid receptors reduces inflammation, leukocyte accumulation and neovascularization in a model of sponge-induced inflammatory angiogenesis. *Inflammation Research* 62: 811–821. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0638-8>.
 32. Salem, Hesham Aly, and Walaa Wadie. 2017. Effect of niacin on inflammation and angiogenesis in a murine model of ulcerative colitis. *Scientific Reports* 7. Springer US: 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07280-y>.
 33. Chintakuntlawar, Ashish V., and James Chodosh. 2009. Chemokine CXCL1/KC and its receptor CXCR2 are responsible for neutrophil chemotaxis in adenoviral keratitis. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 29: 657–666. <https://doi.org/10.1089/jir.2009.0006>.
 34. Kaufmann, Manuel, Michael Schlossbauer, Ute Hubauer, Stefan Stadler, Marcus Fischer, Stefan Wallner, Julian Hupf, Markus Zimmermann, Evelyn Orso, Florian Zeman, Andreas Luchner, Lars Maier, and Carsten Jungbauer. 2020. N-acety-b-D-glucosaminidase: A potential biomarker for early detection of acute kidney injury in acute chest pain. *Nephrology* 25: 135–143. <https://doi.org/10.1111/nep.13664>.
 35. Avula, M. N., A. N. Rao, L. D. McGill, D. W. Grainger, and F. Solzbacher. 2014. Foreign body response to subcutaneous biomaterial implants in a mast cell-deficient Kitw-Sh murine model. *Acta Biomaterialia* 10. Acta Materialia Inc.: 1856–1863. doi:<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.056>.
 36. Hayden, Matthew S., and Sankar Ghosh. 2012. NF- κ B, the first quarter-century: Remarkable progress and outstanding questions. *Genes and Development* 26: 203–234. <https://doi.org/10.1101/gad.183434.111>.
 37. Lawrence, Toby. 2009. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1: 1–11. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>.
 38. Gurgel, José Alves, Roberto César Pereira Lima-Júnior, Cristiano Oliveira Rabelo, Breno Bezerra Gomes Pinho Pessoa, Gerly Anne Castro Brito, and Ronaldo Albuquerque Ribeiro. 2013. Amitriptyline, clomipramine, and maprotiline attenuate the inflammatory response by inhibiting neutrophil migration and mast cell degranulation. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 35: 387–392. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2012-0977>.
 39. Clemons, Anthony, Magdalini Vasiadi, Duraisamy Kempuraj, Taxiarchis Kourelis, Gregory Vandoros, and Theoharis C. Theoharides. 2011. Amitriptyline and prochlorperazine inhibit pro-inflammatory mediator release from human mast cells: Possible relevance to chronic fatigue syndrome. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 31: 385–387. <https://doi.org/10.1097/JCP.0b013e3182196e50>.
 40. Kandil, Esraa A., Noha F. Abdelkader, Bahía M. El-Sayeh, and Samira Saleh. 2016. Imipramine and amitriptyline ameliorate the rotenone model of Parkinson's disease in rats. *Neuroscience* 332. IBRO: 26–37. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.040>.
 41. Xia, Brent T., Nadine Beckmann, Leah K. Winer, Amanda M. Pugh, Timothy A. Pritts, Vanessa Nomellini, Erich Gulbins, and Charles C. Caldwell. 2019. Amitriptyline reduces inflammation and mortality in a murine model of sepsis. *Cellular Physiology and Biochemistry* 52: 565–579. <https://doi.org/10.33594/000000040>.
 42. Meiners, Jana, Vittoria Palmieri, Robert Klopffleisch, Jana Fabienne Ebel, Lukasz Japtok, Fabian Schumacher, Ayan Mohamud Yusuf, Katrin A. Becker, Julia Zöller, Matthias Hose, Burkhard Kleuser, Dirk M. Hermann, Richard N. Kolesnick, Jan Buer, Wiebke Hansen, and Astrid M. Westendorf. 2019. Intestinal acid sphingomyelinase protects from severe pathogen-driven colitis. *Frontiers in Immunology* 10: 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01386>.