



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ANÁLISE COMPARATIVA DO IMPLANTE DA MEMBRANA AMNIÓTICA E DA
GELEIA DE WHARTON NO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO COM
DISFUNÇÃO VENTRICULAR ESQUERDA – MODELO EXPERIMENTAL**

Mestrando: Marcos Antônio Denk

Orientador: Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza

Coorientador: Prof. Dr. Julio Cesar Francisco

Curitiba, abril/2024



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ANÁLISE COMPARATIVA DO IMPLANTE DA MEMBRANA AMNIÓTICA E DA
GELEIA DE WHARTON NO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO COM
DISFUNÇÃO VENTRICULAR ESQUERDA – MODELO EXPERIMENTAL**

Dissertação de mestrado acadêmico apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza

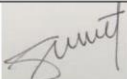
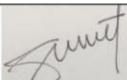
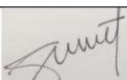
Coorientador: Prof. Dr. Júlio Cesar Francisco

Curitiba, abril/2024

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos **26 dias do mês de abril de 2024 às 19:00**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação **“ANÁLISE COMPARATIVA DO IMPLANTE DA MEMBRANA AMNIÓTICA E DA GELEIA DE WHARTON NO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO COM DISFUNÇÃO VENTRICULAR ESQUERDA – MODELO EXPERIMENTAL”** apresentado por **Marcos Antonio Denk** para obtenção do título de mestre; Área de concentração: Pesquisa Médica Translacional.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza - Presidente	
Prof. Dr. Roberto Hirochi Herai - PUCPR	
Prof. Dr. Luiz Antônio Rivetti - FCMSCSP	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza

Conceito: Aprovado

Prof. Dr. Roberto Hirochi Herai

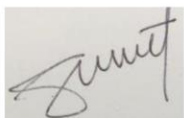
Conceito: Aprovado

Prof. Dr. Luiz Antônio Rivetti

Conceito: Aprovado

Parecer final: Aprovado

Observações da Banca Examinadora:



Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza
Presidente da Banca Examinadora



Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

FOLHA INFORMATIVA

A Dissertação foi elaborada conforme o formato tradicional, de acordo com as “Normas para Elaboração de Dissertações e Teses do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR)”, com citações bibliográficas de acordo com o estilo *Vancouver*. A pesquisa foi realizada no laboratório de técnica operatória e cirurgia experimental da Universidade Federal do Paraná sob orientação do Professor Doutor Luiz Cesar Guarita Souza e coorientação do Professor Doutor Júlio Cesar Francisco. O discente foi bolsista da PUC-PR. Declaramos que não há conflito de interesse na realização da presente Dissertação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o criador de todas as coisas;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, na pessoa da Coordenadora, Professora Doutora Cristina Pellegrino Baena;

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná e Universidade Federal do Paraná que permitiram a realização deste projeto;

A todo o corpo docente da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, principalmente aqueles que ministraram aulas e seminários durante o mestrado;

Agradeço também às colaboradoras Srtas Paula Maira Portela do Nascimento e Vanessa dos Santos de Almeida pelo excelente profissionalismo, e principalmente pela ajuda e orientações nas mais diversas dúvidas que surgiam durante as etapas do mestrado;

Ao meu orientador Professor Doutor Luiz Cesar Guarita Souza, pela amizade, disponibilidade, atenção, paciência e principalmente pela ética profissional;

Ao Professor Doutor Júlio Cesar Francisco pelo companheirismo, paciência e dedicação ao longo do projeto;

À Professora Doutora Lúcia de Noronha pelo equilíbrio e clareza nas mais ousadas perguntas;

Ao Professor Doutor Seigo Nagashima pelo apoio e esclarecimento das dúvidas com os processos laboratoriais estatísticos;

Às Biólogas do laboratório de patologia experimental da PUC-PR, Doutoradas Ana Paula Camargo Martins e Fernanda Noronha pela valorosa ajuda nos processos laboratoriais;

À Professora Márcia Olandoski pelo auxílio com a análise estatística;

Aos Professores Adriano Akira e Thyago Moraes pelas valiosas sugestões durante as etapas do mestrado;

Ao Professor Doutor Roberto Hirochi Herai pelas delicadas e ao mesmo tempo contundentes considerações e sugestões;

Ao Doutor Luiz Antônio Rivetti pela agradável e grandiosa forma de expressar suas considerações e sugestões;

A colega Doutora Luíze Kremer Gamba por sua excelente contribuição acadêmica e parceria, conduzindo com dedicação e ética todas as fases do projeto;

Agradeço também à colega Isabella Cristina Mendes Rossa por sua dedicação, parceria e principalmente por sua amizade, e às colegas Anna Clara Faidiga Silva e Júlia Letícia de Bortolo pelo apoio prestado, em especial pela ética na condução dos animais durante a pesquisa;

Agradeço ainda as gestantes que de maneira voluntária doaram os materiais para nossa pesquisa;

E um agradecimento especial à minha esposa e amiga Joelize Claudiane Stanoga Denk pela paciência, carinho e incentivo. Você foi a minha melhor escolha!

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda a comunidade de cientistas e pesquisadores do nosso país que dedicam seus esforços diariamente na busca por soluções inovadoras e eficazes, visando desenvolver novas formas de tratamento eficientes e seguras para todos os que necessitam.

RESUMO

Introdução: O infarto do miocárdio (IM) continua sendo a principal causa de mortalidade entre as doenças cardiovasculares em todo o mundo e uma das principais causas de insuficiência cardíaca. Estudos recentes sugeriram que a descelularização da geleia de *Wharton* (GW) e da membrana amniótica humana (MA) recuperaria a função ventricular após IM; no entanto, os mecanismos subjacentes a este efeito permanecem controversos. **Objetivos:** Comparar os efeitos do implante da GW e da MA descelularizadas em modelo animal com disfunção ventricular esquerda (DVE), através de análise funcional e histopatológica. **Métodos:** O IM foi induzido em 70 ratos *Wistar*, por oclusão da artéria coronária esquerda, sete dias após o IM os animais sobreviventes foram submetidos a uma análise ecocardiográfica e aqueles com fração de ejeção (FE %) $\leq 45\%$ foram incluídos e randomizados em três grupos e submetidos a uma esternotomia para aplicação intramiocárdica de NaCL 0,9% (grupo controle, n=12), implante de GW (GGW, n=12) e MA (GMA, n=12), sobre a área de fibrose do ventrículo esquerdo, trinta dias após foi realizada nova análise ecocardiográfica em 23 animais sobreviventes (grupo controle, n=7), (GGW, n=8) e (GMA, n=8), que foram eutanasiados obtendo assim material para análise histopatológica em 21 corações (controle, n= 7), (GW, n=7) e (MA, n=7). **Resultados:** Em relação à análise funcional, os resultados ecocardiográficos após 30 dias não demonstraram benefícios significativos pós-implante da GW e da MA em relação ao grupo controle. Na análise histopatológica, se observou que o grupo MA apresentou menor área de cicatriz na região do IAM em relação ao grupo controle (p=0,009). A proporção de colágeno tipo I predominou no grupo controle, enquanto o tipo III nos grupos GW e MA, no entanto, sem benefício significativo (p=0,274). **Conclusão:** Os dados deste estudo sugerem que não houve benefício funcional pós-implante da GW e da MA no IM em ratos *Wistar* com DVE, entretanto se identificou uma menor área de fibrose no grupo MA em relação ao grupo controle, demonstrando um benefício no processo de cicatrização da fibrose miocárdica destes animais.

Palavras-chave: infarto agudo do miocárdio; insuficiência cardíaca; descelularização; geleia de *wharton*; membrana amniótica.

ABSTRACT

Introduction: Myocardial infarction (MI) remains the leading cause of mortality among cardiovascular diseases worldwide and one of the main causes of heart failure. Recent studies suggested that decellularization of Wharton's jelly (WJ) and human amniotic membrane (AM) would restore ventricular function after MI; However, the mechanisms underlying this effect remain controversial. **Objectives:** To compare the effects of implanting decellularized GW and MA in an animal model with left ventricular dysfunction (LVD), through functional and histopathological analysis. **Methods:** MI was induced in 70 Wistar rats, by occlusion of the left coronary artery, seven days after MI. The surviving animals were subjected to an echocardiographic analysis and those with an ejection fraction (EF%) $\leq 45\%$ were included and randomized into three groups and underwent a sternotomy for intramyocardial application of 0.9% NaCL (control group, n=12), implantation of WJ (WJG, n=12) and AM (AMG, n=12), over the area of ventricular fibrosis left, thirty days later, a new echocardiographic analysis was performed on 23 surviving animals (control group, n=7), (WJG, n=8) and (AMG, n=8), which were euthanized, thus obtaining material for histopathological analysis in 21 hearts (control, n=7), (WJG, n=7) and (AMG, n=7). **Results:** Regarding functional analysis, echocardiographic results after 30 days did not demonstrate significant benefits after WJ and AM implantation in relation to the control group. In the histopathological analysis, it was observed that the AM group had a smaller scar area in the MI region compared to the control group (p= 0.009). The proportion of type I collagen predominated in the control group, while type III in the WJ and AM groups, however without significant benefit (p= 0.274). **Conclusion:** The data from this study suggest that there was no functional benefit after GW and MA implantation in the IM in Wistar rats with LVD, however, a smaller area of fibrosis was identified in the AM group in relation to the control group, demonstrating a benefit in the process of healing of myocardial fibrosis in these animals.

Key-words: acute myocardial infarction; heart failure; decellularization; wharton jelly amniotic membrane.

RESUMO POPULAR

O infarto do miocárdio é caracterizado pela obstrução de uma ou mais artérias que irrigam o coração e é uma das principais causas de morte mundial relacionadas ao coração humano. A complicação do infarto pode resultar em uma cicatriz no coração chamada fibrose e, como consequência, alguns pacientes podem desenvolver uma doença chamada insuficiência cardíaca, conhecida popularmente como coração crescido que provoca um enfraquecimento do mesmo, deixando o coração incapaz de bombear a quantidade de sangue necessária para os outros órgãos do corpo humano. O tratamento dessa doença é complexo e de alto custo, mas o seu objetivo é aliviar os sintomas e não tratar a principal causa. Na tentativa de amenizar os sintomas, mas, sobretudo, de reestabelecer a força do coração destes pacientes, alguns cientistas testaram com sucesso duas opções biológicas que são provenientes do cordão umbilical e da placenta humana extraídas de mulheres durante o trabalho de parto, a geleia de *Wharton* e a membrana amniótica, como uma possível opção de tratamento. Esta pesquisa foi conduzida em ratos de laboratório com insuficiência cardíaca causada por um infarto do miocárdio cirúrgico proposital, os ratos foram divididos em três grupos, dois grupos foram tratados com o implante cirúrgico de um pequeno tecido de geleia de *Wharton* ou membrana amniótica no local da cicatriz localizada em seus corações, o terceiro grupo denominado grupo controle recebeu apenas injeção de soro fisiológico no local da cicatriz localizada no seu coração. O resultado do estudo demonstrou que os ratos com insuficiência cardíaca que receberam o implante do tecido de membrana amniótica humana apresentaram redução no tamanho da cicatriz causada pelo infarto do miocárdio, o que pode ajudar a restaurar a força do coração.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICOS

Gráfico 1 – Mortalidade por insuficiência cardíaca nos Estados Unidos.....	25
---	----

FIGURAS

Figura 1 – Procedimento de indução do infarto agudo do miocárdio.....	40
Figura 2 – Imagem do cordão umbilical antes e depois da descelularização.....	43
Figura 3 – Processo de descelularização da membrana amniótica.....	43
Figura 4 – Implante de Biomaterial.....	44
Figura 5 – Medida do tamanho do infarto.....	47
Figura 6 – Corte histopatológico e identificação da área do infarto entre os grupos.....	53
Figura 7 – Corte histopatológico e identificação de colágeno tipo I e III.....	54

QUADROS

Quadro 1 – Fluxograma do estudo.....	50
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise intergrupos da FE (%), VS (ml) e VD (ml).....	51
Tabela 2 – Análise intragrupos da FE (%), VS (ml) e VD (ml).....	52
Tabela 3 – Resultados da análise da área do infarto.....	53
Tabela 4 – Comparação da área do infarto (μm^2) dois a dois.....	53
Tabela 5 – Análise do percentual de colágeno tipo I e III.....	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACE - Artéria Coronária Esquerda

AH - Ácido Hialurônico

AI - Angina Instável

CEUA-PUCPR - Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Pontifícia
Universidade Católica do Paraná

CI - Colágeno Intersticial

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CLO₂ - Solução de Dióxido de cloro

CT - Células-Tronco (do inglês – Stem Cells)

CTMs - Células-Tronco Mesenquimais

DAC - Doença Arterial Coronária (do inglês - Coronary Artery Disease)

DCV - Doenças Cardiovasculares (do inglês - Cardiovascular Disease)

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ECO - Ecocardiograma

EGF - Fator de Crescimento Epidérmico (do inglês - epidermal growth factor)

FE - Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo

GC - Grupo Controle

GW - Geleia de *Wharton* (do inglês - Wharton's Jelly)

HE - Hematoxilina - Eosina

IAM - Infarto Agudo do Miocárdio (do inglês - Acute Myocardial Infarction)

IC - Insuficiência Cardíaca (do inglês - Heart Failure)

IGF-I - Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1 (do inglês - *Insulin-Like Growth Factor 1*)

LVD - Left Ventricular Dysfunction

MAH - Membrana Amniótica Humana (do inglês - Human Amniotic Membrane)

NYHA - New York Heart Association

PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês - *Transforming Growth Factor*)

SIS - Solução Isotônica Salina (do inglês - Sterile Saline)

SUS - Sistema Único de Saúde

TGF- β - Fator de Transformação de Crescimento Beta (do inglês TGF- β)

UFPR - Universidade Federal do Paraná

VD - Volume Diastólico Final Ventrículo Esquerdo

VE - Ventrículo Esquerdo

VM - Ventilação Mecânica

VS - Volume Sistólico Final Ventrículo Esquerdo

SUMÁRIO

1.0 – INTRODUÇÃO.....	17
2.0 – JUSTIFICATIVA.....	20
3.0 – REVISÃO DE LITERATURA (ESTADO DA ARTE).....	21
3.1 – Infarto agudo do miocárdio.....	21
3.2 – Insuficiência cardíaca.....	23
3.3 – Tratamento da insuficiência cardíac.....	25
3.4 – Células tronco.....	27
3.5 – Membrana amniótica humana.....	30
3.6 – Geleia de <i>Wharton</i>	32
4.0 – OBJETIVOS.....	35
4.1 – Objetivo geral.....	35
4.2 – Objetivos específicos.....	35
5.0 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
5.1 – Desenho do estudo e ética.....	36
5.2 – Amostra.....	36
5.3 – Modelo animal.....	37
5.4 – Biotério.....	38
5.5 – Anestesia.....	39
5.6 – Indução da lesão da artéria coronária esquerda.....	39
5.7 – Ecocardiografia.....	41
5.8 – Obtenção da geleia de <i>Wharton</i> e membrana amniótica humana.....	41
5.9 – Preparo da matriz da geleia de <i>Wharton</i> e da membrana amniótica humana.....	42
5.10 – Processo de descelularização da geleia de <i>Wharton</i>	42
5.11 – Processo de descelularização da membrana amniótica.....	43

5.12 – Procedimento de implante do biomaterial.....	44
5.13 – Eutanásia.....	45
5.14 – Análise histopatológica.....	46
5.15 – Avaliação do percentual de colágeno.....	46
5.16 – Avaliação da área do infarto.....	47
5.17 – Análise estatística.....	48
6.0 – RESULTADOS.....	49
6.1 – Resultados da análise funcional.....	50
6.2 – Comparação intergrupos.....	50
6.3 – Comparação intragrupos.....	51
6.4 – Análise histopatológica da área do infarto.....	52
6.5 – Análise histopatológica do percentual de colágeno.....	53
7.0 – DISCUSSÃO.....	55
8.0 – CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXOS.....	80
APÊNDICE.....	81

1.0 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são a causa mais comum de morte e de custos com cuidados de saúde em todo o mundo.¹ Estima-se que em 2019, no Brasil, as doenças cardiovasculares foram responsáveis por 27% das mortes, sendo as doenças isquêmicas do coração responsáveis por 32,3%.² E neste contexto destaca-se a doença arterial coronariana (DAC), caracterizada pelo fornecimento insuficiente de sangue ao coração através das artérias coronárias.^{3,4} Este evento ocorre quando há presença de um estreitamento importante do lúmen arterial em razão do acúmulo anormal de placas ateroscleróticas na parede endotelial das artérias.⁵ Manifestações agudas, como angina instável (AI) e o infarto agudo do miocárdio (IAM), são geralmente desencadeadas por desestabilização da placa aterosclerótica,⁶ e o prognóstico depende da rapidez do diagnóstico e da intervenção médica para restaurar a reperfusão coronariana e evitar a necrose do miocárdio e o remodelamento ventricular.⁷

Diversos tratamentos estão atualmente disponíveis e apoiados por evidências para a reperfusão imediata da artéria relacionada ao infarto, pois permite reduzir o tamanho do infarto e diminuir a incidência de insuficiência cardíaca (IC) e outros resultados adversos.^{8,9} Já no cenário da IC terminal, o transplante cardíaco representa um tratamento padrão, contudo, a disponibilidade de doadores de órgãos está longe de ser adequada para satisfazer a procura.¹⁰

Novas estratégias buscam impedir a propagação da fibrose na parede do ventrículo esquerdo (VE), através de tratamentos avançados que atuam na regulação de hormônios e receptores, reduzindo danos e complicações cardíacas.¹¹ No entanto, apesar de as terapias clínicas atuais melhorarem a função cardíaca, nenhuma delas foi

concebida para abordar diretamente a restauração da perda de cardiomiócitos pós-IAM.¹²

Recentemente, novas técnicas de medicina regenerativa e nanotecnologia têm surgido como alternativas para o tratamento de diversas doenças.¹³ Atualmente, existem vários agentes biológicos em uso clínico para tratamento de patologias cardiovasculares, como plasma rico em plaquetas, células da medula óssea, aspirado de tecido adiposo, líquido amniótico, combinação de células-tronco (CT) com nanopartículas, membrana amniótica humana (MA) e geleia de *Wharton* (GW).^{14,15}

Estudos anteriores independentes e isolados demonstraram que a terapia celular com MA melhorou a função do VE após IAM, além de promover a diferenciação de cardiomiócitos e reduzir a área de fibrose,^{16,17} no entanto, alguns obstáculos, como a baixa taxa de migração para o miocárdio isquêmico, a baixa retenção tecidual e a baixa taxa de sobrevivência após o transplante ainda permanecem um desafio a ser superado.¹⁸

Buscando novas alternativas, como os biomateriais, que podem ser uma opção promissora, o cordão umbilical tem ganhado notoriedade mostrando ser uma fonte de células-tronco mesenquimais primárias. A GW consiste em um material gelatinoso composto por células do tecido conjuntivo semelhantes aos fibroblastos, com uma composição rica em colágeno, predominando o colágeno tipo III, glicosaminoglicanos sulfatados e ácido hialurônico.¹⁹ Esta estrutura pode fornecer um arcabouço tridimensional por apresentar muitas características bioquímicas e propriedades biomecânicas associadas tornando um importante biomaterial, na forma de gel injetável apresentou benefício funcional quando injetado no miocárdio, entretanto como enxerto descelularizado ainda existem algumas dúvidas com relação ao seu real efeito.²⁰⁻²¹

A engenharia de tecidos tem utilizado biomateriais que são capazes de criar microambientes propícios à substituição ou reparo tecidual, fornecendo suporte estrutural para ancoragem e crescimento celular.^{22,23} A descelularização da MA e GW pode ser usada como estruturas biodegradáveis fáceis de obter, processar e transportar, e cujas propriedades as tornam úteis como biomateriais.^{24,25} Alguns estudos utilizando a MA como terapia alternativa demonstraram melhora na função e remodelação do VE e também diferenciação de cardiomiócitos após IAM.¹⁶

No mesmo cenário, a GW pode revelar um alto potencial devido às suas diversas características, como fatores de crescimento, efeito imunomodulador, função cardioprotetora e angiogênica após IAM, que a tornam uma opção para futuras terapias regenerativas em DCV.^{26,27} Além disso, apresenta menos questões éticas em comparação com outras fontes.²⁸

No presente estudo, objetivamos comparar a utilização da GW e da MA para a regeneração miocárdica em ratos *Wistar* submetidos a IAM experimental.

2.0 JUSTIFICATIVA

Apesar de todo avanço no tratamento das doenças cardiovasculares, a IC ainda representa uma síndrome clínica com altos índices de mortalidade, tornando-se um problema epidemiológico, econômico e de difícil controle clínico.

As limitações da eficácia apresentada pelas terapias atuais, tanto clínicas como cirúrgicas, encorajam a pesquisa de novos métodos de tratamento no intuito de diminuir os danos causados por esta patologia.

Na busca por novas alternativas para a regeneração miocárdica, a MA já apresentou resultados animadores com melhora da função cardíaca e colonização celular na região infartada.

A utilização da GW em forma de gel também apresentou resultado funcional favorável para recuperação miocárdica, entretanto, na forma de um enxerto descelularizado, ainda existem algumas dúvidas do seu real benefício.

Neste contexto, o implante de GW e MA, teoricamente, pode trazer uma nova alternativa para o tratamento da disfunção ventricular causada pelo IAM, pelo fato de já terem apresentado capacidade de regeneração tecidual em outros órgãos e tecidos.

3.0 REVISÃO DE LITERATURA (ESTADO DA ARTE)

3.1 Infarto Agudo do Miocárdio

Diante das mudanças no cenário epidemiológico mundial e da ascensão da DAC com uma prevalência bruta de 0,99% para 1,85% no período entre 1990 e 2019,² o IAM é a patologia que merece destaque devido à sua gravidade.²⁹ Estimativas apontam como responsável por cerca de 65 mil óbitos anuais, considerada a principal causa de morte no país no cenário das DCV.³⁰

A causa mais comum de IAM é a ruptura ou erosão da placa aterosclerótica coronariana, ocasionando formação de trombos e uma cascata de eventos trombóticos, e seu principal desfecho é a oclusão aguda de uma artéria coronária epicárdica, levando à diminuição de perfusão ao tecido miocárdico,³¹ nesta condição clínica ocorre uma necrose de origem isquêmica, que costuma se estender por toda ou quase toda a parede miocárdica resultando em uma necrose transmural e consequentemente podendo levar a morte celular, perda dos cardiomiócitos e substituição por tecido cicatricial fibrótico.³²

As terapias de reperfusão miocárdica mais comumente aplicadas são trombólises (química) e angioplastia primária (mecânica).³³ O tempo desde o início dos sintomas (oclusão da artéria coronária) até a instituição do tratamento (reperfusão química ou mecânica) é diretamente proporcional à ocorrência de eventos clinicamente relevantes e não deve ultrapassar os 90 minutos, visto que um maior tempo de isquemia causa maiores complicações no músculo cardíaco.^{34,35}

O tempo de reperfusão é fator fundamental para o benefício do tratamento, tanto imediato quanto tardio, com viabilidade de recuperar parte do miocárdio acometido evitando em muitos casos o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (IC), mas estas evidências só foram possíveis graças à hipótese revolucionária de Eugene Braunwald,

“tempo é músculo” propondo que o IAM seja um processo dinâmico e seu desfecho é determinado pelo tamanho do infarto e pelo tempo para o tratamento.³⁶ No entanto, estudos apontam que 25 a 40% dos pacientes com diagnóstico de IAM chegam ao setor de emergência com mais de seis horas de evolução do início dos sintomas.

Embora o tempo de reperfusão seja a chave para um melhor prognóstico a literatura mostra que até 20,7% dos pacientes tratados nos primeiros 90 minutos são readmitidos com IC, isto porque a própria reperfusão causa uma segunda onda de lesão, pela produção de espécies reativas de oxigênio, liberação de mediadores vasoativos do endotélio danificado, embolização de detritos trombóticos, tamponamento de microvasos por células inflamatórias que levam à disfunção microvascular contínua em até 50% dos casos.³⁷⁻⁴⁰

No infarto transmural, a área afetada pela isquemia inclui completamente ou quase inteiramente a parede do tecido ventricular irrigado por uma determinada artéria coronária. No infarto subendocárdico, a área afetada pela necrose isquêmica se estende por um terço ou parte da zona ventricular.⁴¹

Na fase aguda do IAM, a oclusão da artéria coronária pode causar dilatação ventricular aguda, caracterizada por contração e tensão da área infartada. Esta alteração é denominada de "Expansão da zona de infarto", proveniente do deslizamento de cardiomiócitos devido à desintegração do colágeno interfibrilar.⁴²

Já na fase tardia, são observados diferentes graus de expansão da cavidade. Este evento leva a um processo hipertrófico envolvendo os ventrículos direito e esquerdo e se manifesta como resposta ao aumento do estresse na parede ventricular. Ao mesmo tempo, também é observado acúmulo anormal de colágeno (fibrose) em áreas ativas do miocárdio, tanto no ventrículo infartado quanto na outra parede.⁴³

Essas alterações morfológicas são denominadas “remodelamento miocárdico”, caracterizado por alterações do tamanho, forma e função do coração, com áreas de discinesia ou acinesia miocárdica.⁴⁴ O processo de remodelação ventricular abrange uma série de características que incluem alterações mecânicas, celulares e bioquímicas, incluindo sobrecarga hemodinâmica pressórica ou volumétrica, hipertrofia de miócitos, necrose, apoptose, fibrose, aumento do colágeno fibrilar e proliferação de fibroblastos, angiotensina II, endotelina 1, catecolaminas, fator de necrose tumoral, interleucinas 1 e 6, fator de crescimento transformador β 1, fator de crescimento insulina-símile 1, óxido nítrico, cálcio e estresse oxidativo.^{45,46}

Uma vez instalado, o processo de remodelamento ventricular, após IAM, se associa a um pior prognóstico, representando uma causa predominante de IC, e ocorre em quase 30% dos pacientes com IAM anterior e em apenas aproximadamente 17% dos pacientes com infarto não anterior.⁴⁷

3.2 Insuficiência cardíaca

A IC é uma condição clínica causada por anormalidade na função sistólica, produzindo redução do volume sistólico (IC sistólica) ou anormalidade na função diastólica, levando a defeito no enchimento ventricular (IC diastólica), que também determina sintomas típicos de IC. Nesta condição, o coração é incapaz de bombear sangue de maneira suficiente para suprir as demandas metabólicas dos tecidos, ou consegue fazê-lo apenas com pressões de enchimento elevadas.⁴⁸

Evidências científicas sugerem que estresse oxidativo e presença do acúmulo de colágeno intersticial (CI) no espaço perivascular do miocárdio podem desempenhar papéis de destaque nas rotas de sinalização celular, resultando na hipertrofia, dilatação e disfunção ventricular pós-IAM.⁴⁹

Caracterizada por alterações no tamanho, formato e funcionamento do coração, a disfunção ventricular esquerda em pacientes pós-IAM sinaliza o início da IC que se apresenta como uma síndrome clínica complexa.⁵⁰

A apresentação clínica inclui uma série de sintomas como presença de dispneia, ortopneia, fadiga, dispneia paroxística noturna, edemas em membros inferiores (tornozelo) ou limitação de esforço físico dificultando a execução das atividades diárias e reduzindo a qualidade de vida devido a um distúrbio cardíaco estrutural ou funcional, que prejudica a capacidade do ventrículo esquerdo de encher ou ejetar sangue. Contudo, é importante ressaltar que em muitos pacientes coexistem disfunção sistólica e diastólica. Portanto, se concordou em definir pacientes com insuficiência cardíaca com base na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FE).⁵¹⁻⁵³

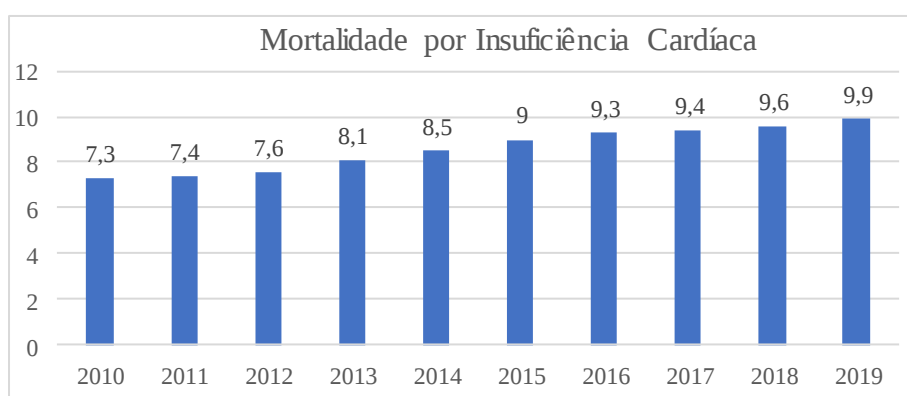
A IC tem sido amplamente sub-classificada conforme a FE em 3 categorias: IC com fração de ejeção preservada (FE 50-70%), IC com fração de ejeção moderada (FE 41-49%) e IC com fração de ejeção reduzida (FE 40%) e a gravidade dos sintomas é mais comumente graduada segundo o *New York Heart Association* (NYHA) que avalia os efeitos sintomáticos da IC. A NYHA classifica os pacientes acometidos pela IC em quatro classes: (classe I, não há limitação na atividade física normal; classe II, apenas sintomas leves durante a atividade normal; classe III, sintomas acentuados durante atividade, confortável apenas em repouso; classe IV, limitações severas e sintomas mesmo em repouso).^{54,55}

As hospitalizações são a principal consequência de insuficiência cardíaca descompensada, resultando em pior prognóstico e elevando os custos.⁵⁶ Dados do sistema único de saúde (SUS) apontam números expressivos de hospitalizações por IC entre os períodos de 2008 a 2018, com cerca de 3.085.359 internações (41,3%), representando um terço do total de hospitalizações clínicas relacionadas às condições

DCV. Os custos não ajustados foram de aproximadamente R\$ 3.957.126.308 neste mesmo período.^{57,58}

Nos Estados Unidos, a IC teve um crescimento de 2,6% entre os períodos de 2010 a 2019 (Gráfico 1) e seu custo anual foi estimado em 108 bilhões de dólares em 2012 por meio de uma revisão que incluiu 197 países intitulada *The annual global economic burden of heart failure*. O alto custo por paciente está diretamente relacionado à falta de terapias eficazes para o tratamento da IC.⁵⁹⁻⁶⁹

Gráfico 1. Mortalidade por insuficiência cardíaca nos Estados Unidos.



Fonte: National Heart, Lung, and Blood Institute from National Center for Health Statistics reports and data sets (2010-2019).

No Brasil as taxas médias de incidência e mortalidade entre os anos de 2019 e 2023 foram 92,73 e 11,28/100.000 habitantes. A taxa média de letalidade, por sua vez, ficou em 12,21%.⁷⁰

3.3 Tratamento da insuficiência cardíaca

Nas últimas décadas, o uso mais difundido de cardioversores-desfibriladores implantáveis e dispositivos de terapia de ressincronização cardíaca, bem como avanços importantes na terapia medicamentosa, melhoraram o prognóstico de pacientes com IC,

no entanto, as taxas de morbimortalidade e re-hospitalização permanecem elevadas, com estimativa em cinco anos de mortalidade superior a 50%.⁷¹⁻⁷⁴

As taxas de mortalidade são mais altas em estudos observacionais do que em estudos e ensaios clínicos.⁷⁵ Na coorte do condado de *Olmsted*, as taxas de um e cinco anos após o diagnóstico, para todos os tipos de pacientes com IC, foram de 20% e 53%, respectivamente, entre 2000 e 2010. Já o estudo que combinou o *Framingham Heart Study* e um estudo de saúde cardiovascular relatou uma taxa de mortalidade de 67% dentro de cinco anos após diagnóstico.^{76,77}

A IC requer um tratamento complexo que combina diversos medicamentos, o que é a base para a melhora dos sintomas e do prognóstico de todos os pacientes. A terapia medicamentosa, como inibidores da enzima de conversão da angiotensina, inibidores do receptor da angiotensina/inibidores da neprilisina, betabloqueadores e antagonistas dos receptores mineralocorticóides proporcionam benefício incremental com redução acentuada na mortalidade por todas as causas, mortalidade cardiovascular, hospitalizações por todas as causas, e hospitalizações por insuficiência cardíaca.⁷⁸⁻⁸⁰

Para os pacientes com sequelas graves pós-IAM (aqueles com FE reduzida <40%), as opções de tratamento disponíveis são dispositivos de assistência ventricular, implante de desfibriladores e ressincronizadores, correção de insuficiência mitral, ventriculectomia parcial, e transplante cardíaco.⁸¹

Os dispositivos de assistência ventricular e o transplante cardíaco, quando viáveis, são as terapias de escolha para o tratamento no estágio final para IC. Porém, ambos são realizados apenas em grandes centros, por demandarem altos custos e, no caso do transplante, sofrer com a baixa disponibilidade de doadores.⁸²

Na busca de novos tratamentos, algumas evidências científicas sugerem que pacientes portadores de IC com FE% reduzida podem se beneficiar com um tratamento

precoce envolvendo uma combinação de quatro medicamentos: um receptor da angiotensina – inibidor da neprilisina, betabloqueador, antagonistas dos receptores da aldosterona e inibidor do co-transportador 2 de sódio. Esses benefícios podem ser traduzidos em reduções significativas e sustentadas na mortalidade, readmissões hospitalares e alívio dos sintomas.^{83,84}

Embora novos tratamentos farmacológicos tenham apresentado reduções significativas de mortalidade e readmissões hospitalares, o objetivo principal do tratamento da IC é melhorar os sintomas e a qualidade de vida dos pacientes, no entanto, as opções terapêuticas atuais propostas, tanto clínicas como cirúrgicas, têm como principal objetivo tratar apenas as consequências do IAM e não a causa subjacente, a qual é a perda da célula contrátil, o cardiomiócito.⁸⁵

Na última década, houve uma crescente investigação sobre novas estratégias para regenerar o miocárdio lesionado, sendo que esse cenário clínico estimulou o desenvolvimento de linhas de pesquisa com a utilização de terapia gênica, terapia celular, fatores de crescimento e biomateriais para a recuperação da função cardíaca após IAM.⁸⁶⁻⁹¹

3.4 Células tronco

As CT, por definição, são células indiferenciadas e não especializadas, capazes de autorrenovação por meio de divisões mitóticas assimétricas e capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares do mesmo tecido e, aparentemente, de tecidos diferentes.^{92,93}

As CT foram classificadas pelo seu potencial de desenvolvimento como totipotentes (capazes de dar origem a todos os tipos de células embrionárias e extra-embrionárias), pluripotentes (capazes de dar origem a todos os tipos de células

embrionárias), multipotentes (capazes de dar origem a todos os tipos de células do embrião, um subconjunto de linhagens celulares), oligopotente (capazes de se diferenciar em apenas algumas células, como células-tronco linfóides ou mielóides) e unipotente (as células podem produzir apenas um tipo de célula, a sua própria), mas têm a propriedade de autorrenovação, o que os distingue a partir de células não-tronco.⁹⁴⁻⁹⁷

Já em relação ao seu estágio de desenvolvimento as CT podem ainda ser classificadas em quatro categorias: as CT embrionárias com capacidade de formar qualquer tipo de célula totalmente diferenciada,⁹⁹ as CT fetais são tipos de células primitivas encontradas nos órgãos do feto,¹⁰⁰ as CT do sangue do cordão umbilical que contém algumas células-tronco que são geneticamente idênticas ao recém-nascido,¹⁰¹ e as CT adultas que já foram isoladas de diversas fontes de tecidos, incluindo o sistema nervoso central, medula óssea, retina e músculo esquelético.¹⁰² Dentre as adultas, destacam-se as CT hematopoiéticas e as CT mesenquimais.

As CT hematopoiéticas dão origem as células do sangue (linfócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, células vermelhas e plaquetas), têm capacidade de autorrenovação e proliferação, caracterizado pela expressão do antígeno CD34, células progenitoras adultas multipotentes e células de crescimento excessivo de sangue CD14 capazes de se diferenciar em outras células além do sangue.¹⁰³

As CT mesenquimais são células estromais multipotentes que apresentam maior autorrenovação e capacidade de diferenciação. Estas células poderão originar células musculares, hepatócitos, osteócito, tecido adiposo, condrócitos e estroma.^{104,105}

O emprego de fatores de crescimento tem despertado interesse na medicina cardiovascular devido às suas implicações diretas em diversas funções celulares, como adesão, proliferação e migração. A indução de angiogênese por fatores de crescimento é um importante mecanismo de reparo e proteção do miocárdio sob condições de hipóxia,

contribuindo para a limitação do tamanho do infarto, promovendo a angiogênese e a remodelação vascular.¹⁰⁶

Em 2001, Orlic *et al.*, sugeriram que as células-tronco (CT) mononucleares da medula óssea humana poderiam regenerar o miocárdio infartado, pois elas são capazes de induzir à miogênese e à angiogênese.¹⁰⁷ Elas são ricas em fatores de crescimento que estimulam a quimiotaxia, proliferação, diferenciação celular, síntese de colágeno e neovascularização a partir de uma alta concentração celular.^{108,109}

Com um potencial promissor, a terapia celular poderia modificar a história natural do IAM, principalmente no que diz respeito à evolução para o remodelamento cardíaco em uma subpopulação de pacientes mais graves. Apesar de bem estabelecida a função regenerativa da CT no IAM, um fator importante na determinação da eficiência da CT está relacionado ao seu método de entrega ao miocárdio. O método endovenoso é considerado o menos invasivo, no entanto, estudos mostraram cerca de 0% de adesão celular no miocárdio. Outra possibilidade é a injeção intracoronária de CT, contudo, essa técnica não permite que as CT atinjam efetivamente áreas não perfundidas, com as áreas isquêmicas após o IAM diminuindo a sobrevivência e replicação celular.^{110,111}

As áreas de fibrose miocárdica após o IAM também limitam a eficácia das CT, isso ocorre porque o ambiente de fibrose miocárdica após o IAM torna a capacidade de sobrevivência, regeneração e diferenciação das CT menos favorável, já que o seu desenvolvimento é por diferenciação meio dependente, ou seja, as CT irão mimetizar o meio onde as mesmas serão injetadas e no caso de fibrose miocárdica, é difícil as CT se diferenciarem em cardiomiócitos.¹¹²

Outras desvantagens são as limitações de material obtido, população celular heterogênea e resultados inconsistentes em relação aos efeitos terapêuticos,¹¹³ além das

questões éticas, diversificação genética, possibilidade de rejeição do sistema imune e, por fim, ao potencial oncogênico das CT implantadas.^{114,115}

Recentemente, sistemas baseados em scaffolds usando estruturas tridimensionais biológicas ou sintéticas surgiram como uma ferramenta promissora para a entrega das CT diretamente na parede infartada do miocárdio, permitindo sua proliferação e diferenciação. Para tanto, foi encontrado um grande potencial em um grupo de CT mesenquimais (CTMs) a MA.¹¹¹

3.5 Membrana amniótica humana

A membrana amniótica humana é uma matriz extracelular à base de colágeno derivada da placenta humana, conhecida como âmnio, é a camada mais interna das membranas fetais, é uma membrana translúcida composta por uma camada de células epiteliais simples firmemente aderidas à camada mais interna, denominada camada mesenquimal, composta por três camadas: compacta, esponjosa e fibroblástica. Essas camadas contêm abundância de colágeno (tipo II, IV e V), laminina e uma espessa camada basal em conjunto, sem vascularização. As células-tronco tanto do fluido amniótico quanto da membrana amniótica possuem as características imunofenotípicas tanto das células-tronco mesenquimais (CTMs) adultas quanto das células-tronco embrionárias.¹¹⁶

As CTMs são células multipotentes, com capacidade de autorrenovação e diferenciação, e as CTMs de MA apresentaram expressão de marcadores de superfície similares as CTMs de medula óssea. A MA foi avaliada como um possível biomaterial no ano de 1910 por John Davis, usada pela primeira vez em um transplante de pele. No entanto, foram poucos os relatos clínicos sobre o seu uso até o início da década de 90, quando técnicas de processamento e procedimentos de armazenamento foram

desenvolvidos. Desde então, numerosos procedimentos clínicos com relatos do seu uso foram publicados.^{117,118}

O fator mais atrativo no uso da MA descelularizada como biomaterial esta, relacionado às suas características intrínsecas de biocompatibilidade, pois não causa tumorigenicidade e/ou reação imunológica no hospedeiro e também é facilmente obtida e processada, não gerando custos significativos para sua aquisição.¹¹⁹

Ensaio clínicos e estudos pré-clínicos demonstraram que a MA contém fatores de crescimento, proteases e inibidores de fibrose, o que confere seus efeitos inflamatórios e antimicrobianos, sendo estes cruciais para a medicina regenerativa.^{120,121}

Henry *et al.*, demonstraram que a administração injetável de Hidrogel de MA em corações de ratos com MI melhorou significativamente a contratilidade cardíaca e diminuiu a fibrose ($p = < 0,05$).¹²²

Já Cargnoni e Roy implantaram “*patches*” descelularizados da MA fresca no VE em modelos experimentais utilizando ratos com isquemia cardíaca, o resultado demonstrou potencial de angiogênese e regeneração de cardiomiócitos podendo auxiliar na prevenção de processos patológicos de remodelação pós-IAM, bem como melhorar a FE%.¹²³ Em conclusão, a utilização de “*patches*” de MA foi capaz de constituir um veículo conveniente para o fornecimento de células produtoras de fatores solúveis cardioprotetores, reforçando a noção de que este tecido constitui uma fonte celular com potencial clínico.¹²⁴

Recentemente, Blume *et al.*, utilizando as mesmas técnicas de terapia com MA, observaram recuperação da função cardíaca global, associada à angiogênese e regeneração de cardiomiócitos após 30 dias do implante das membranas em um modelo de infarto do miocárdio.¹²⁵

Outra possibilidade de tratamento da IC utilizando biomateriais como uma opção promissora para entrega de CT ao miocárdio pode ser explorada, em especial a GW, tecido rico em matriz extracelular com a função de proteção do cordão umbilical. Por, normalmente, ser um material descartado, a GW tem grande potencial como arcabouço natural com menos considerações éticas do que outras fontes e, no mais, a produção clínica de CTMs a partir de GW é simples e relativamente rápida.¹²⁶⁻¹²⁹

3.6 Geleia de Wharton

A GW do cordão umbilical parece ser uma das fontes mais promissoras de CTMs alogênicas, pois, pode ser colhida em abundância e sem dor, são facilmente isoladas e cultivadas, têm uma alta taxa proliferativa, são hipoimunogênicas e não tumorigênicas, multipotentes e são menos heterogêneos em comparação as CT adultas. Também é um compartimento rico em proteínas da matriz extracelular do cordão umbilical, composto de colágenos, glicosaminoglicanos e ácido hialurônico.^{130,131}

A GW se desenvolve durante o período da embriogênese e aumenta à medida que o mesoderma extraembrionário cria uma matriz extracelular robusta para proteger o cordão umbilical. Essa estrutura é rica em fatores de crescimento como ácidos e fatores básicos de crescimento de fibroblastos (aFGF, bFGF), fatores de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformador beta (TGF- β). Juntos, esses compostos têm a função primária de hidratar e estruturar o cordão umbilical. Além disso, a disponibilidade do tecido é fundamental, a facilidade e abundância na aquisição da GW possibilitam a viabilidade de pesquisa e, se necessário, sua comercialização.^{132,133}

Descrita pela primeira vez por *Thomas Wharton* em 1656,¹³⁴ a GW contém células primitivas com baixo risco de carregar mutações somáticas; por isso, são consideradas altamente imuno-privilegiadas em comparação com outras fontes potenciais de tecidos, sua aplicação clínica não é restrita por procedimentos de isolamentos invasivos e dolorosos ou comorbidades intrínsecas do doador (ou seja, fatores de risco cardiovascular).¹³⁵

Evidências suportam a ideia de que a GW constitui uma família de células com um alto grau de imparcialidade e perfis transcricionais únicos, com expressão significativa de níveis de mesoderma e células progenitoras cardíacas especializadas que representam fatores de desenvolvimento cardíaco,¹³⁶⁻¹³⁸ essas características indicam seu forte potencial para se diferenciar em cardiomiócitos, endotélios e formar redes neovasculares, para se integrarem em redes de tecidos cardíacos isquêmicos, que resultam na melhoria da função cardíaca.¹³⁹⁻¹⁴² Além disso, a GW pode secretar grandes quantidades de fatores antiapoptóticos, angiogênicos e fatores de crescimento, exercendo efeitos parácrinos para a regeneração do miocárdio e vasos coronários.¹⁴³ Estudos pré-clínicos demonstraram que a GW pode expressar moléculas específicas do coração (troponina-I, conexina-43), que se diferenciam em células endoteliais e semelhantes a cardiomiócitos *in vitro*, e também exercem efeitos parácrinos que melhoram a regeneração vascular e proteção de cardiomiócitos. Tais ações podem fundamentar a justificativa para a melhora na função cardíaca observada em modelos animais com IC a utilização de GW como terapia.¹⁴⁴

Estudos prévios pré-clínicos utilizando ratos e coelhos em modelos de IAM já demonstraram que as GW transplantadas proporcionam benefícios na viabilidade miocárdica e na FE (%) redução de fibrose e apoptose *in vivo*.^{138,145-148}

Recentemente o estudo clínico *RIMECARD Trial* demonstrou que a infusão intravenosa de GW foi segura em pacientes com IC estável e FE (%) reduzida com melhora na função ventricular esquerda, queda nos volumes sistólicos e volumes diastólicos finais do VE aos doze meses de acompanhamento clínico e consequentemente melhora na qualidade de vida em relação ao grupo tratado com placebo.¹⁴⁹

Também foi demonstrado que a GW poderia ser um substituto mais adequado de células endoteliais e células intersticiais na medicina regenerativa cardiovascular em comparação à MA devido à sua maior viabilidade, proliferação e propriedades superiores de deposição de colágeno.¹⁵⁰ Nimsanor *et al.*, observaram em seu estudo uma superexpressão de genes anti fibrose cardíaca, sugerindo que o uso *in vivo* da GW pode ser uma alternativa promissora para proteger e tratar a fibrose cardíaca. Dentro deste contexto, uma abordagem utilizando matriz descelularizada de MA e GW poderia ser capaz, então, de proporcionar um microambiente ideal para a regeneração do tecido miocárdio em infarto agudo do miocárdio experimental.¹⁵¹

A utilização das MA e GW em sua forma celular já demonstrou um efeito no que diz respeito à regeneração do miocárdio pós-IAM, no entanto, pouco se sabe ainda sobre a importância destas duas estruturas quando descelularizadas. Uma estrutura descelularizada pode trazer vantagens como um arcabouço por ser capaz de manter uma arquitetura do tecido original sem ser imunogênica, isto cria estrutura de suporte para que novas células possam migrar e serem recrutadas para o local do transplante.¹⁵²

Apesar de haver registros sobre o uso da MA em estudos clínicos, a utilização da GW descelularizada nesse cenário é recente. Até o momento, as pesquisas sobre o uso da GW descelularizada como matriz de arcabouço em IAM experimental ainda são bastante escassas.¹⁵³

4.0 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Realizar a análise funcional e histopatológica do efeito do implante de GW e MA no IAM experimental em modelos de ratos *Wistar* com disfunção ventricular esquerda.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar índices de função cardíaca e remodelamento ventricular nos grupos do estudo, analisando os seguintes parâmetros: FE (%), VD (ml), VS (ml), entre os períodos pré e pós-implante.
- Avaliar histologicamente a área de fibrose para mensurar o tecido cicatricial na região da área do infarto e avaliação do remodelamento da cavidade ventricular esquerda nos grupos do estudo.
- Avaliar a prevalência de colágeno tipo I e III como parâmetro de qualidade do tecido cicatricial formado.

5.0 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Desenho do estudo e ética

Trata-se de um projeto que se caracteriza metodologicamente como estudo experimental randomizado, sendo que os experimentos foram realizados seguindo as normas e princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).¹⁵⁴

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO-UFPR) sob o registro [23075.055324/2022-21/18/10/2022-R.O.09/2022] (ANEXO 1).

5.2 Amostra

Delineou-se um estudo experimental com um total de 70 ratos *Wistar* machos com idade de 2-3 meses e pesando 250-300 g que foram submetidos a IAM transmural e posteriormente foram randomizados (Randomização simples ¹⁵⁵) por sorteio, em três grupos que passaram por três fases.

Primeira fase: todos os animais participantes do estudo foram submetidos ao IAM por meio de ligadura da artéria coronária esquerda (ACE) e sete dias após o IAM, os participantes do estudo que sobreviveram foram submetidos a análise de ecocardiograma (ECO), analisando-se os seguintes parâmetros: FE (%), VS (ml), VD (ml), para avaliação da função cardíaca. O critério de inclusão para a segunda etapa do estudo foi função cardíaca, com análise da $FE \leq 45\%$. Animais com FE (%) superior a 45% foram excluídos do estudo e eutanasiados no sétimo dia.

Segunda fase: ainda no sétimo dia, os ratos que preencheram os critérios de inclusão foram divididos e randomizados em três grupos.

- Grupo I: GC receberam três injeções intramiocárdicas de NaCL 0,9% sobre a área de fibrose do VE;
- Grupo II: GGW receberam implante de geleia de *Wharton* descelularizada sobre a área de fibrose do VE;
- Grupo III: GMA receberam implante de membrana amniótica descelularizada sobre a área de fibrose do VE.

Terceira fase: no trigésimo dia, os animais sobreviventes foram submetidos a uma nova avaliação com ECO, analisando-se os mesmos parâmetros que os anteriores, e posteriormente eutanasiados para retirada do coração e avaliação histológica na região do IAM.

5.3 Modelo animal

Espécie de estudo: Rato *Wistar* machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*). A escolha do modelo foi baseada nos estudos experimentais já bem estabelecidos relacionados a lesões isquêmicas do miocárdio e na experiência da equipe pesquisadora com a espécie escolhida. Outra característica anatômica é que este modelo tem escassa circulação colateral, a exemplo do humano. Portanto, a oclusão da artéria coronária, muitas vezes leva a um infarto transmural.¹⁵⁶

O rato *Wistar* possui tamanho apropriado para realização do IAM e exames de imagem de controles posteriores, além de tolerância ao procedimento cirúrgico proposto, maximizando a quantidade de infartos bem-sucedidos, minimizando o número de animais utilizados. Atualmente, o modelo de ligadura da artéria coronária é um dos modelos mais utilizados em estudos experimentais.¹⁵⁷ Esse procedimento causa isquemia do miocárdio, e a extensão da área infartada deve ser superior a 40% do VE para estarem presentes sinais típicos de IC para a indução da liberação de moléculas

marcadoras de hipertrofia.¹⁵⁸ A mortalidade verificada nas primeiras 24 horas após a cirurgia situa-se entre 40 e 60%, podendo chegar até 65% nas 48 horas após o infarto.^{159,160}

Buscou-se alcançar um número mínimo de 6 a 10 animais para cada grupo de estudo para a viabilização de uma análise estatística adequada.

5.4 Biotério

Os animais foram alojados no biotério da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em número máximo de quatro animais por gaiola, e mantidos em condições ambientais constantes, temperatura, água e ração comercial padrão, livre acesso à água e mantidos em ciclo de claro/escuro de 12/12h. O biotério teve sistema de exaustão de ar e controle de ventilação, umidade e temperatura do ambiente, seguindo protocolos pré-estabelecidos.^{161,162}

O seguimento dos animais foi de 30 dias com acompanhamento diário dos pesquisadores e todos os animais receberam terapia para analgesia pós-operatória não esteroidal de 12/12h, limpeza das caixas, controle de temperatura, alimentação e hidratação adequadas. Visando o bem-estar animal, se houvesse manifestações clínicas da doença, os animais seriam eutanasiados previamente ao período estipulado pela pesquisa. Os critérios considerados foram:

- Sinais de depressão respiratória, respiração anormal, respiração ofegante e secreção nasal; edema agudo de pulmão;
- Fatores associados à falência da bomba cardíaca, como diminuição da circulação periférica, extremidades azuis e frias;
- Icterícia e secreções nos olhos e aparência dos pelos; (APÊNDICE)

5.5 Anestesia

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no laboratório de técnica operatória experimental da UFPR, seguindo o manual de utilização de animais/FIOCRUZ 2008.¹⁶³ Os animais foram submetidos à anestesia geral por via intramuscular, com administração de cloridrato de Ketamina a 5% (Vetanarcolâ, Konig do Brasil Ltda.) na dose de 50mg/kg, associado ao cloridrato de Xilazina a 2% (Rompunâ, Bayer S.A. Brasil) na dose de 10mg/kg.

Após atingir o plano anestésico, verificado através do reflexo pupilar e relaxamento, uma via aérea definitiva foi obtida por meio de intubação orotraqueal com um cateter venoso periférico número 14. Em seguida, cada animal foi conectado a um sistema de ventilação mecânica (VM) (*Harvard®*, Inc., respirador modelo 683, *Holliston*, MA, EUA) com oxigênio a 21% (ar ambiente), volume de 2,5 mL (O_2 /min) e frequência de 50 ciclos por minuto, observando a expansão pulmonar como já descrito em estudos prévios.¹⁶⁴

Realizado então tricotomia torácica, antisepsia com iodopovidona degermante (Riodine degermante ® – Rioquímica indústria Farmacêutica, São José do Rio Preto–SP) e assepsia do tórax com iodopovidona tópica (Riodine degermante ® – Rioquímica Indústria Farmacêutica, São José do Rio Preto–SP). Cada animal foi posicionado em decúbito dorsal com uma leve inclinação para a direita, facilitando desta maneira a exposição da área a ser abordada, fixando os membros anteriores e posteriores com fita adesiva para o acesso.

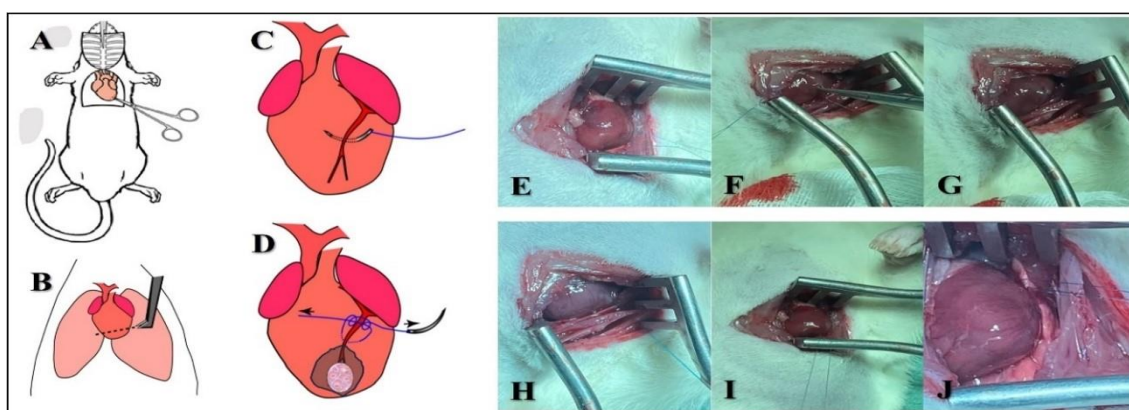
5.6 Indução da lesão da artéria coronária esquerda

Os 70 animais foram submetidos a uma toracotomia antero lateral esquerda, no terceiro espaço intercostal, após abertura da pleura esquerda, o pericárdio foi exposto para

deslocamento e melhor visualização da área a ser abordada. Após a exteriorização do coração, a aurícula esquerda foi afastada e a ACE localizada entre a artéria pulmonar e o átrio esquerdo. Em seguida, foi realizada a ligadura da coronária com fio de sutura polipropilene monofilamentar não absorvível prolene 7,0 (*Ethicon®*, Inc., Somerville, NJ). A região infartada foi imediatamente visualizada macroscopicamente pela diferença de coloração da área afetada (Figura 1).

Após ter sido verificada homeostasia, o coração foi reposicionado ao tórax, os pulmões hiperinsuflados e a parede torácica fechada por planos com fio mononylon 4,0 (*Ethicon®*, Inc., Somerville, NJ). A indução da lesão da ACE seguiu as etapas conforme definido em protocolos prévios.¹⁶⁵ Ao término do procedimento cirúrgico, foi realizada uma assepsia com Iodopovidona tópica e os animais foram mantidos em posição de *fowler* e seus sinais respiratórios e cardíacos foram avaliados até a sua total recuperação pós-anestésica. Após a recuperação da anestesia, os animais foram mantidos em gaiolas e alimentados com ração comercial padrão e livre acesso à água, receberam terapia para analgesia pós-operatória não esteroideal e foram encaminhados ao biotério.

Figura 1. **Procedimento de indução do infarto agudo do miocárdio**



Fonte: MAHMOUD *et al*¹⁶⁶ (Adaptado pelos Autores 2024)

a) toracotomia antero lateral no quarto espaço intercostal e abertura da caixa torácica; b, c e d) localização e ligação da ACE. As fotos (e até j) demonstram o procedimento cirúrgico realizado pelos autores: e) exteriorização do coração com localização da ACE; f, g, h e i) sutura “bloqueio” do segmento médio da ACE com fio polipropileno 7,0 e j) visualização macroscópica da área infartada.

5.7 Ecocardiografia

As análises ecocardiográficas foram realizadas sete dias após o IAM e 30 dias após o transplante celular. Resumidamente, os animais foram levemente anestesiados com 50mg/kg de cetamina e 10mg/kg de xilazina por via intramuscular e avaliados por ecocardiografia transtorácica (*Hewlett Packard Sonos* modelo 5500) usando uma sonda setorial S12 (5–10 MHz). Os parâmetros de análises adquiridos compreenderam superfícies sistólicas e diastólicas finais, comprimento diastólico e sistólico final do ventrículo esquerdo e frequência cardíaca para calcular a FE (%), VS (ml) e VD (ml) pelo método de Simpson.¹⁶⁷ As análises ecocardiográficas foram realizadas conforme descrito anteriormente.¹⁶⁸

Todas as medidas foram realizadas pelo mesmo observador (cardiologista e com especialização em ecocardiografia), três avaliações, sendo em seguida calculada a média de cada parâmetro de forma “cega”, ou seja, o examinador desconhecia a fase do estudo e a qual grupo o animal pertencia. Somente foram incluídos no estudo animais com FE $\leq$ 45%, justamente para caracterizar disfunção ventricular. Os animais que apresentaram FE > 45% foram excluídos do estudo, o que correspondeu a 30% da população total do estudo.

5.8 Obtenção da geleia de *Wharton* e da membrana amniótica humana

A MA e a GW foram obtidas a partir de doações voluntárias de gestantes a “termo” após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido de acordo com um protocolo aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos do Hospital Pequeno Príncipe com parecer nº 659.204 – 2014 e 0948-11.

Os seguintes critérios foram preenchidos: idade entre 20 e 30 anos; sem antecedentes de comorbidades; sem história de intercorrências clínicas durante a

gestação e tendo sido submetidas à cesariana com fetos normais; exames sorológicos negativos para HIV e vírus da hepatite B e C e sífilis.

5.9 Preparo da matriz da geleia de *Wharton* e da membrana amniótica humana

A Geleia de *Wharton* e a membrana amniótica foram coletadas de forma estéril, imediatamente após a dequitação placentária, composta de segmentos do cordão umbilical, da placa coriônica e das vilosidades coriônicas da placenta ainda em ambiente cirúrgico. Em câmara com proteção de fluxo laminar, a geleia de *wharton* e a membrana amniótica foram lavadas com soro fisiológico estéril. Após a remoção dos resíduos, foram divididas em fragmentos. Os coágulos de sangue foram imediatamente removidos com solução salina tamponada com fosfato (PBS), contendo 100U/mL de penicilina e 100mg/ml de estreptomicina. Já as células epiteliais foram removidas usando SDS (duodecil sulfato de sódio) em PBS e incubadas com velocidade de rotação de 100 rpm a 37 °C por 24 horas e mais três lavagens com PBS.^{169,170}

5.10 Processo de descelularização da geleia de *Wharton*

A descelularização foi realizada com técnica asséptica em uma cabine de segurança biológica classe II BioSAFE (Veco®). Para esse processo, a geleia de *Wharton* foi retirada do meio (PBS) tampão fosfato pH 7.2 (solução tampão PBS® - Laborclin LTDA. Pinhais, Brasil) e tratada com solução de SDS (duodecil sulfato de sódio) a 0,01% e SD (desoxicolato de sódio) a 0,01% por 24 horas a 37 °C, com auxílio de agitador mecânico (Mesa agitadora 109M, Nova Ética Ltda.). Posteriormente, a geleia de *Wharton* já descelularizada foi recortada em fragmentos de aproximadamente 10 x 10 mm² para aplicação nos animais (Figura 2). A efetividade da descelularização

foi comprovada por amostragem e análise histológica utilizando coloração Hematoxilina - Eosina (HE), conforme a metodologia descrita previamente.¹⁷⁰

Figura 2. Imagem do cordão umbilical antes e depois da descelularização

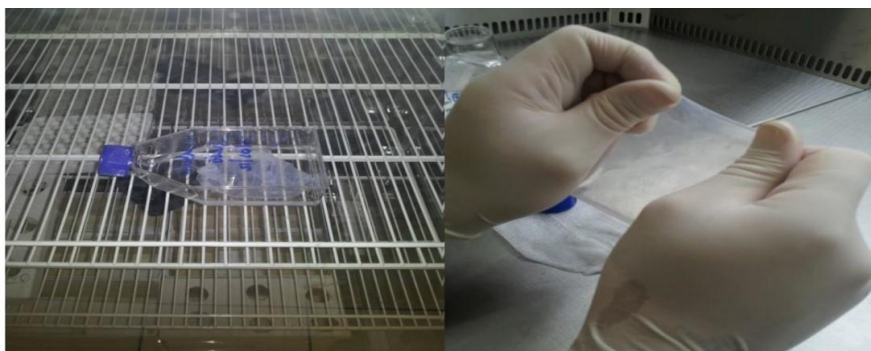


Fonte: Elaborada pelos Autores (2024)

5.11 Processo de descelularização da membrana amniótica

A descelularização foi realizada com técnica asséptica em uma cabine de segurança biológica classe II BioSAFE (Veco®). Para esse processo, a membrana amniótica foi retirada do meio (PBS) tampão fosfato pH 7.2 (solução tampão PBS® - Laborclin LTDA. Pinhais, Brasil) e tratada com solução de SDS (duodecil sulfato de sódio) a 0,01% e SD (desoxicolato de sódio) a 0,01% por 24 horas a 37 °C, com auxílio de agitador mecânico (Mesa agitadora 109M, Nova Ética Ltda.). Posteriormente, já descelularizada, a membrana amniótica foi recortada em fragmentos de aproximadamente 10 x 10 mm² para aplicação nos animais (Figura 3).

Figura 3. Processo de descelularização da membrana amniótica



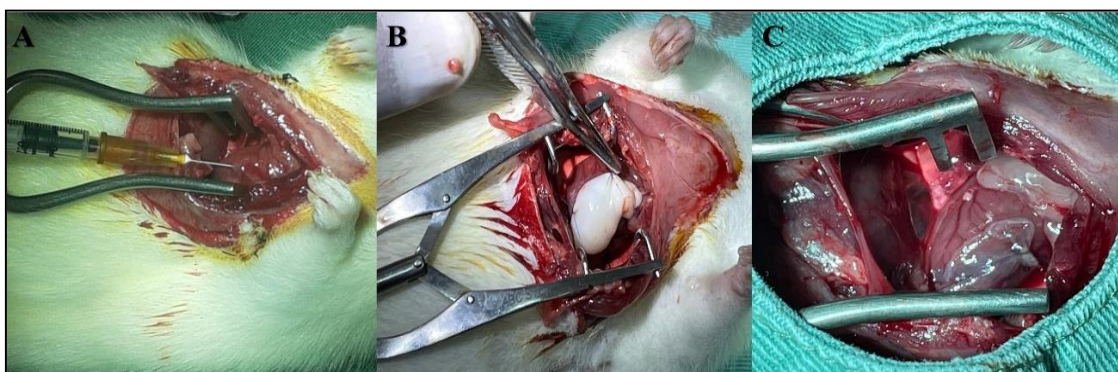
Fonte: FRANCISCO JC (2012)¹⁷¹

A efetividade da descellularização foi comprovada por amostragem e análise histológica utilizando coloração Hematoxilina - Eosina (HE), conforme a metodologia descrita previamente.¹⁶⁹

5.12 Procedimento de implante do biomaterial

No sétimo dia após o IAM, os animais sobreviventes e que preencheram os critérios de inclusão foram randomizados em três grupos: GC, GW e GMA conforme descrito na segunda fase do protocolo. Todos os animais receberam anestesia geral por via intramuscular semelhante ao procedimento da primeira fase com administração de Cetamina 50 mg/kg e Xilazina 10mg/kg e os animais foram novamente conectados ao sistema de ventilação mecânica (*Harvard®*, Inc., respirador modelo 683, MA, USA) para animais de pequeno porte, com oxigênio a 21% (ar ambiente), realizada antissepsia do tórax, esternotomia mediana e lise de pequenas aderências formadas no procedimento cirúrgico anterior em seguida submetido ao processo cirúrgico conforme demonstrado na Figura 4.

Figura 4. **Implante do biomaterial**



Fonte: Elaborada pelos Autores (2024)

a) Injeção de NaCL 0,9%, b) Implante do biomaterial grupo GW e c) Implante do biomaterial grupo MA.

Ao identificar a área de fibrose do VE sob visualização direta nos respectivos grupos, os seguintes procedimentos foram realizados: grupo controle, três injeções

intramiocárdicas de NaCL 0,9% sobre a área de fibrose do VE de cada animal do grupo; grupo MA implantado um segmento de 7 x 7 mm² de MA sobre a área de fibrose do VE de cada animal do grupo e grupo GW implantado um segmento de 7 x 7 mm² de GW sobre a área de fibrose do VE cada animal e grupo conforme técnica cirúrgica já descrita anteriormente.¹²⁵

Ao final dos procedimentos, os animais receberam terapia para analgesia pós-operatória não esteroideal e foram encaminhados ao biotério. O Biotério em questão consta com sistema de exaustão de ar e controle de ventilação, umidade e temperatura do ambiente. Todos os animais foram acompanhados no pós-operatório imediato, até 2 horas, com mensuração de frequência respiratória e cardíaca, a identificação de dor foi avaliada pela resposta ao pinçamento da orelha, reflexo palpebral e corneal, todos foram mantidos aquecidos, pois o laboratório de técnica operatória dispõe de sistema de ar-condicionado.

Os procedimentos cirúrgicos foram considerados de médio risco de efeitos adversos, entretanto, caso algum animal apresenta-se sinais de insuficiência respiratória e/ou cardíaca, seriam sedados novamente e submetidos à intubação orotraqueal até a plena recuperação.

No trigésimo dia, seguindo o mesmo protocolo da primeira fase, foi realizada nova avaliação ecocardiográfica em 23 animais que completaram o estudo, em seguida todos os animais sobreviventes foram eutanasiados.

5.13 Eutanásia

A eutanásia foi realizada no trigésimo dia, baseada em cálculos de perda de peso e na deterioração do estado clínico para a administração por meio de dose letal intraperitoneal (100mg/kg) de tiopental (Thiopentax® Cristalia Produtos Químicos

Farmacêuticos Ltda. Itapira–SP), conforme protocolos prévios.¹²⁵ Os procedimentos cirúrgicos e de eutanásia foram realizados no laboratório de técnica operatória experimental da UFPR.

5.14 Análise histopatológica

Os animais que concluíram a etapa final do estudo, foram eutanasiados, seus corações foram removidos para exame histopatológico 30 dias após o implante dos biomateriais. Os corações foram seccionados sagitalmente e preservados “*in totum*” em formol neutro a 10% durante 24 horas. Após este período, todos os órgãos seccionados foram clivados em quatro partes iguais transversais no micrótomo (Leica modelo RM 2145) com espessura de 5 μm^2 . As peças foram desidratadas e em seguida submetidas a banhos sucessivos em álcool 70%, 80%, 90% e três banhos em álcool 100% (em Leica modelo TP1020), durante o período de 60 minutos, conforme protocolo prévio.¹²⁵

Em seguida, houve impregnação de parafina líquida nos cortes por meio de três banhos a 65 °C no mesmo aparelho. Posteriormente, os cortes histológicos foram montados em lâminas e corados com solução hematoxilona-eosina (HE), tricrômico de Gomori e Picro Sirius Red. De cada fragmento, foram confeccionadas duas lâminas com os quatro cortes e as colorações citadas.

5.15 Avaliação do percentual de colágeno

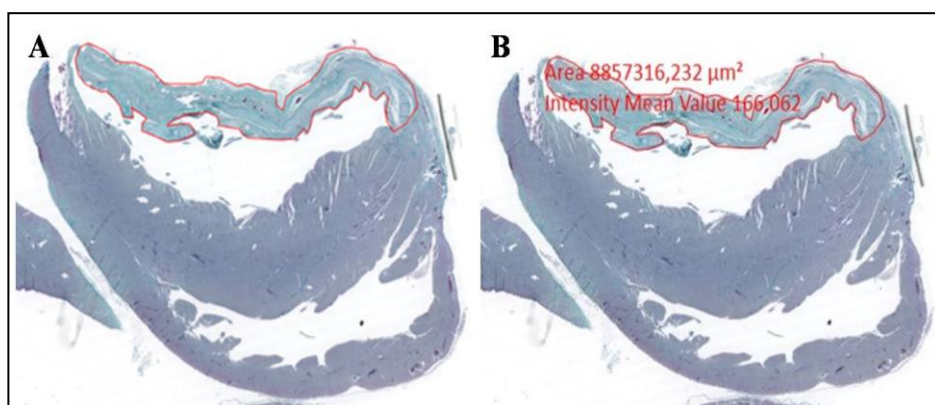
Os cortes histológicos foram montados em lâminas e corados com solução de hematoxilina eosina, para caracterização nuclear e de matriz extracelular e *Picrosirius red*, especificamente para fibras colágenas tipo I e III. A camada média das secções ventriculares esquerdas (5 μm) foi hidratada com Sirius Red (0,5% em ácido pícrico aquoso saturado, Sigma) e vistos sob luz polarizada. Dez campos em cada região do

coração foram selecionados aleatoriamente com 10 seções em séries não consecutivas, e o volume de colágeno foi quantificado como Sirius Red áreas positivas usando um microscópio *Zeiss Axiovert S100 TV* (*Zeiss, Jena, Alemanha*) 2.0 (*UTHSCSA, San Antonio, TX, EUA*). Cada sessão foi analisada com lente objetiva de 400x. As fibras de colágeno foram marcadas pela cor azul na luz direta, e digitalizaram-se as imagens. O percentual de CI de cada campo analisado foi obtido pela divisão da soma de toda a área de tecido conectivo e pela soma de toda área do tecido conectivo com a do cardiomiócito, como demonstrado anteriormente em estudos prévios.¹⁷²⁻¹⁷⁴

5.16 Avaliação da área do infarto

Para a estimativa da área infartada, foram empregados os mesmos cortes para quantificar a fração do volume de colágeno, contudo, optou-se por utilizar a coloração tricrômico de Gomori para estas medidas. As lâminas foram digitalizadas e as análises foram conduzidas através do *software Zen2 Blue Edition* (*Carl Zeiss Microscopy GmbH/Version 3.4.91.00000*). O infarto foi delimitado como a região da parede ventricular esquerda entre as bordas externas, onde o tecido de cicatrização foi identificado (Figura 5).

Figura 5. **Medida do tamanho do infarto**



Fonte: Elaborada pelos Autores (2024)

A extensão do infarto (em área μm^2) foi calculada pela razão percentual entre o comprimento da superfície endocárdica com infarto (extensão de fibrose) e o comprimento total da superfície endocárdica do ventrículo esquerdo, conforme descrito anteriormente.¹²⁵ Todas as medidas foram realizadas pelo mesmo observador, três avaliações, sendo em seguida calculada a média de cada medida de forma “cega”, ou seja, o examinador desconhecia a qual grupo o animal pertencia.

5.17 Análise estatística

Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS *Statistics* v.20.0. Armonk, NY: IBM Corp. Os resultados dos marcadores foram descritos por média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo. Para a comparação dos grupos quanto aos resultados da avaliação do sétimo dia e, também, quanto às diferenças entre as avaliações dos dias sete e trinta, em relação às variáveis fração de ejeção, volume sistólico e volume diastólico, foi usado o modelo de análise da variância (ANOVA) com um fator. A comparação dos grupos quanto aos resultados do dia 30 foi feita usando-se o modelo de análise de covariância (ANCOVA) com um fator incluindo os resultados da avaliação de sete dias como covariável. O teste *post-hoc* de Bonferroni foi usado para as comparações múltiplas após ANOVA e ANCOVA. Para a comparação dos resultados do dia sete com os resultados do dia trinta, dentro de cada grupo, foi usado o teste t de Student para amostras pareadas. Para a comparação dos grupos, em relação ao percentual de colágeno (tipo I e tipo III) e da área do infarto, foi usado o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*. O teste de *Dunn* com ajuste de *Bonferroni* foi usado para as comparações múltiplas dos grupos. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

6.0 RESULTADOS

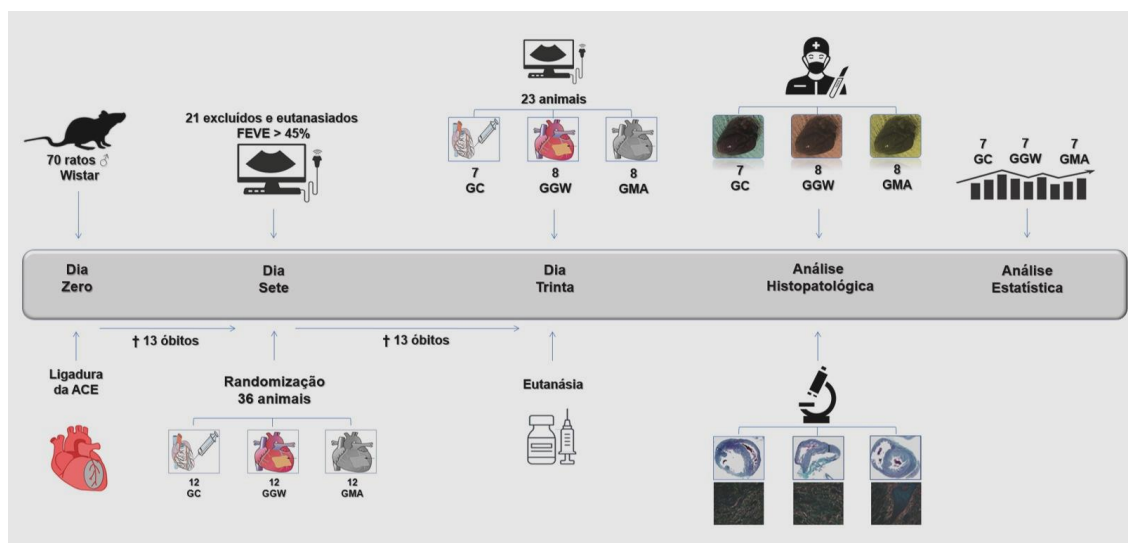
Participaram do estudo 70 ratos *Wistar*, os quais foram submetidos ao infarto transmural conforme fluxograma (Quadro 1) durante o trans-operatório de ligadura da artéria coronária esquerda e, no seguimento de sete dias, 13 animais evoluíram a óbito. No sétimo dia do experimento, foram realizadas as ecocardiografias em 57 animais sobreviventes, dos quais vinte e um (36,8%) foram excluídos e imediatamente eutanasiados por apresentarem FE > 45%.

Ainda no sétimo dia, trinta e seis animais foram randomizados dentro dos três grupos do estudo e submetidos a: (GC, n=12) administração intramiocárdica de NaCl 0,9%, (GGW, n=12) implante de biomaterial geleia de *Wharton* e implante de biomaterial membrana amniótica e (GMA, n=12), sobre a área de fibrose do VE. Durante o segmento de 30 dias, 13 animais foram a óbito, restando para a avaliação ecocardiográfica final 23 animais, totalizando 26 óbitos (37%) em todo o período do estudo.

No trigésimo dia, foram realizadas 23 ecocardiografias finais nos animais que completaram o estudo, sendo (GC, n=7), (GGW, n=8) e (GMA, n=8), sendo que após este exame todos os animais foram eutanasiados. Após a eutanásia, os corações de todos os animais foram dissecados para análise histopatológica para analisar o tamanho do IAM e volume do percentual de colágeno I e III.

Durante a análise histopatológica, duas lâminas foram excluídas da análise final por apresentarem artefatos de processamento de tecidos (GGW, n=1), (GMA, n=1), restando 21 lâminas para análise histopatológica final, (GC, n=7), (GGW, n=7) e (GMA, n=7).

Quadro 1. Fluxograma do estudo



Fonte: Elaborada pelos Autores (2024)

6.1 Resultados da análise funcional

Os resultados da avaliação funcional obtidos pela análise ecocardiográfica foram obtidos a partir de uma amostra de 23 animais randomizados, sobreviventes e que preencheram os critérios de inclusão do protocolo proposto. Os animais foram divididos em três grupos: (GC, $n=7$), (GGW, $n=8$) e (GMA, $n=8$). Todos os animais foram avaliados em dois momentos: dia 7 e dia 30.

6.2 Comparação intergrupos

No sétimo dia pós-IAM, foi identificada uma homogeneidade entre os três grupos do estudo, não revelando diferenças significativas em relação à FE (%), VS (ml) e VD (ml), ($p=0,601$, $p=0,127$ e $p=0,79$) respectivamente. No trigésimo dia pós-IAM, também não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos nos mesmos parâmetros analisados, com ($p=0,273$) para a FE (%), ($p=0,865$) para VS (ml) e ($p=0,838$) para o VD (ml) (tabela 1).

Tabela 1. **Análise intergrupos da FE (%), VS (ml) e VD (ml)**

Variável	Grupo	média±DP	*p comparação dos 3 grupos
FE (%) Dia 7	Controle (n = 7)	36,2 ± 5,3	0,601
	GW (n = 8)	36,6 ± 6,0	
	MA (n = 8)	34,0 ± 5,0	
VS (ml) Dia 7	Controle (n = 7)	0,165 ± 0,047	0,127
	GW (n = 8)	0,107 ± 0,053	
	MA (n = 8)	0,155 ± 0,069	
VD (ml) Dia 7	Controle (n = 7)	0,263 ± 0,067	0,79
	GW (n = 8)	0,167 ± 0,063	
	MA (n = 8)	0,283 ± 0,148	
FE (%) Dia 30	Controle (n = 7)	33,4 ± 5,8	0,273
	GW (n = 8)	39,7 ± 11,7	
	MA (n = 8)	36,8 ± 7,4	
VS (ml) Dia 30	Controle (n = 7)	0,219 ± 0,082	0,865
	GW (n = 8)	0,160 ± 0,089	
	MA (n = 8)	0,199 ± 0,063	
VD (ml) Dia 30	Controle (n = 7)	0,323 ± 0,091	0,838
	GW (n = 8)	0,264 ± 0,098	
	MA (n = 8)	0,319 ± 0,067	

7º dia: avaliação ecocardiográfica pós-infarto; 30º dia: avaliação ecocardiográfica pós-terapia; FE= fração de ejeção; VS= volume sistólico; VD= volume diastólico; GW= geleia de *Wharton*; MA= membrana amniótica; *ANCOVA com um fator incluindo D7 como covariável; p<0,05.

6.3 Comparação intragrupos

Com relação ao parâmetro da FE (%), nos animais do GC foi identificada uma diminuição dos valores de 36,2% para 33,4% (p=0,331), já nos animais dos GGW e GMA a FE (%) apresentou um discreto aumento no GGW foi de 36,6% para 39,7% e no GMA de 34% para 36,8% (p=0,381 e p=0,140) respectivamente, no entanto, não houve benefício estatístico.

Com relação ao VS (ml), houve acréscimo nos volumes dos três grupos ao final do trigésimo dia de evolução, no grupo GC foi de 0,165ml ± 0,047 para 0,219ml ± 0,082ml (p=0,97), no grupo GW de 0,107ml ± 0,053ml para 0,160ml ± 0,089ml (p=

0,053) e no grupo MA de $0,155\text{ml} \pm 0,069\text{ml}$ para $0,199\text{ml} \pm 0,063\text{ml}$ ($p=0,159$) no mesmo intervalo de tempo.

Na análise do VD (ml) também se observou acréscimos nos valores dos três grupos GC de $0,263\text{ml} \pm 0,067\text{ml}$ para $0,323\text{ml} \pm 0,091\text{ml}$ ($p=0,112$), GW de $0,167\text{ml} \pm 0,063\text{ml}$ para $0,264\text{ml} \pm 0,098\text{ml}$ ($p=0,005$) e GMA de $0,283\text{ml} \pm 0,148\text{ml}$ para $0,319\text{ml} \pm 0,067\text{ml}$ ($p=0,492$), respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. **Análise intragrupos da FE (%), VS (ml) e VD (ml)**

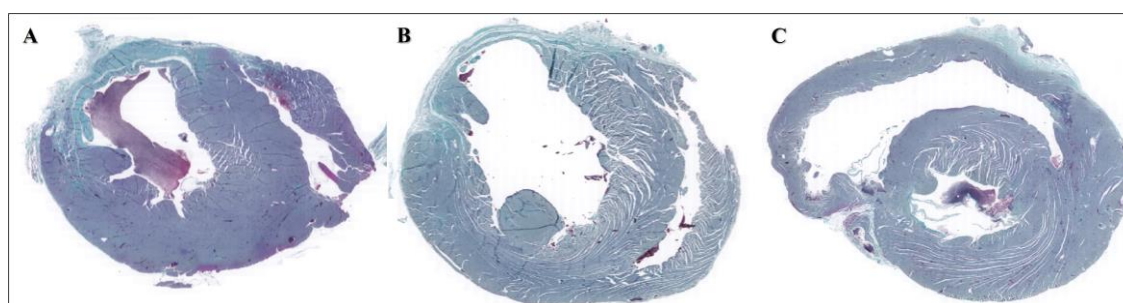
Variável	Grupo	7 dias	30 dias	*p comparação dos 3 grupos
FE (%)	Controle (n = 7)	36,2±5,3	33,4±5,8	0,331
	GW (n = 8)	36,6±6,0	39,7±11,7	0,381
	MA (n = 8)	34±5,0	36,8±7,4	0,140
VS (ml)	Controle (n = 7)	0,165±0,047	0,219±0,082	0,97
	GW (n = 8)	0,107±0,053	0,160±0,089	0,53
	MA (n = 8)	0,155±0,069	0,199±0,063	0,159
VD (ml)	Controle (n = 7)	0,263±0,067	0,323±0,091	0,112
	GW (n = 8)	0,167±0,063	0,264±0,098	0,005
	MA (n = 8)	0,283±0,148	0,319±0,067	0,492

7º dia: avaliação ecocardiográfica pós-infarto; 30º dia: avaliação ecocardiográfica pós-terapia; FE= fração de ejeção; VS= volume sistólico; VD= volume diastólico; GW= geleia de Wharton; MA= membrana amniótica; *Teste t de Student para amostras pareadas, $p<0,05$.

6.4 Análise histopatológica da área do infarto

Para análise da área do infarto, foram utilizados cortes corados com Tricrômico de Gomori em 21 lâminas (GC, n=7), (GGW, n=7) e (GMA, n=7). A região foi delimitada ao estender a pigmentação das fibras de colágeno que predominam na área fibrosada. A figura 6 e a tabela 3 demonstram os resultados obtidos através da análise de medida em área (μm^2). O GC apresentou a maior área de cicatriz $18 \times 10^6 \mu\text{m}^2$, seguido do GGW com área de cicatriz de $9 \times 10^6 \mu\text{m}^2$, já o GMA apresentou a menor área de cicatriz $8 \times 10^6 \mu\text{m}^2$, estes resultados apresentaram significância estatística ($p=0,008$).

Figura 6. Corte histopatológico e identificação da área do infarto entre os grupos



30º dia: corte histopatológico e identificação da área do infarto entre os grupos pós-terapia; tamanho da amostra: a) (controle, n= 7); b) (GW, n= 7) e c) (MA, n= 7); GW= geleia de *Wharton*; MA= membrana amniótica.

Tabela 3. Resultados da análise da área do infarto

Variável	Grupo	Média	Desvio padrão	*p
Área de infarto (área μm^2)	Controle (n = 7)	$18 \times 10^6 \mu\text{m}^2$	$4 \times 10^6 \mu\text{m}^2$	-
	GW (n = 7)	$9 \times 10^6 \mu\text{m}^2$	$4 \times 10^6 \mu\text{m}^2$	-
	MA (n = 7)	$8 \times 10^6 \mu\text{m}^2$	$5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$	0,008

30º dia: avaliação do tamanho da área do infarto nos três grupos; GW= geleia de *Wharton*; MA= membrana amniótica; *teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*.

Na comparação dos grupos dois a dois (Tabela 4), se observou diferença significativa no tamanho da cicatriz do infarto entre o grupo GC $18 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ vs GMA $8 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ respectivamente ($p=0,009$).

Tabela 4. Comparação da área do infarto (μm^2) dois a dois

Comparação entre os grupos	(*p) Área do infarto
Controle vs GW	0,60
Controle vs MA	0,009
GW vs MA	1

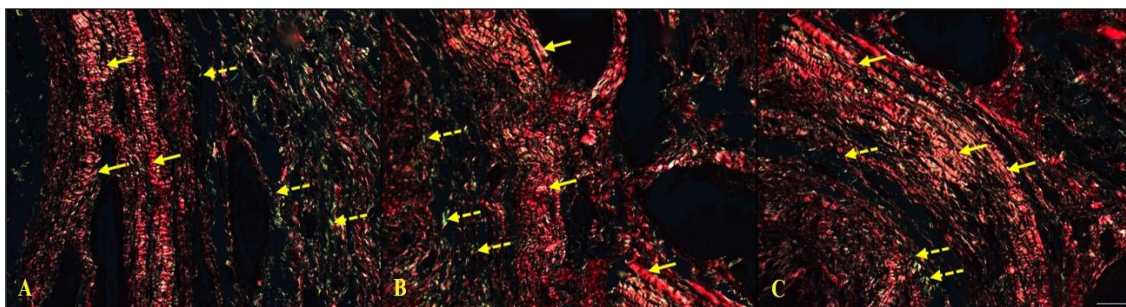
30º dia: comparação da área do infarto entre os grupos dois a dois; tamanho da amostra: (controle, n= 7); (GW, n= 7); (MA, n= 7); GW= geleia de *Wharton*; MA= membrana amniótica; *Teste post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni, $p<0,05$

6.5 Análise Histopatológica do percentual de Colágeno

A análise do percentual de colágeno I e III foi realizada em uma amostra de 21 lâminas e é demonstrada nas fotomicrografias 400x. A coloração de Picrosírius Red destaca o colágeno tipo I em vermelho e o colágeno tipo III em verde, indicados pelas

setas amarelas sólidas e pontilhadas, respectivamente (Figura 7).

Figura 7. Corte histopatológico e identificação de colágeno Tipo I e III



30º dia: corte histopatológico e identificação de colágeno tipo I e III entre os grupos pós-terapia; tamanho da amostra: a) (controle, n= 7); b) (GW, n= 7) e c) (MA, n= 7); GW= geleia de *Wharton*; MA= membrana amniótica.

A análise das imagens capturadas no microscópio de luz polarizada mostrou uma predominância de colágeno tipo I (maduro) nas áreas de cicatriz do grupo controle GC $97,3\% \pm 3,1\%$, GGW $90\% \pm 13,2\%$ e GMA $85,2\% \pm 15,1\%$, no entanto, sem relevância estatística ($p=0,74$). Em relação ao colágeno tipo III os índices (%) apresentados foram os seguintes: GC $2,7\% \pm 3,1\%$, GGW $10\% \pm 13,2\%$ e GMA $14,8\% \pm 15,1\%$ respectivamente, no entanto, esta diferença (%) também não obteve significância estatística ($p=0,74$), (Tabela 5).

Tabela 5. Análise do percentual de colágeno tipo I e III

Variável	Grupo	Média	Mediana	*p
Colágeno I (%)	Controle (n = 7)	97,3±3,1	98,8	-
	GW (n = 7)	90±13,2	97,8	-
	MA (n = 7)	85,2±15,1	92,7	0,074
Colágeno III (%)	Controle (n = 7)	2,7±3,1	1,2	-
	GW (n = 7)	10±13,2	2,2	-
	MA (n = 7)	14,8±15,1	7,3	0,074

30º dia: avaliação do percentual de colágeno tipo I e III entre os grupos; GW= geleia de *Wharton*; MA= membrana amniótica; Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p<0,05$

7.0 DISCUSSÃO

Após a promoção da necrose miocárdica, o processo inflamatório inicia-se na área infartada nas primeiras horas e é caracterizado pelo acúmulo de células inflamatórias e edema, seguido por uma fase de proliferação de fibroblastos com deposição de colágeno e substituição de tecido necrótico por tecido fibroso, estas alterações morfológicas são denominadas remodelamento ventricular, caracterizado por alterações no tamanho, formato e funcionamento do coração.^{175,176} A intensidade em que o processo de remodelamento ventricular ocorre está diretamente relacionada a um pior prognóstico,¹⁷⁷ e apesar das evidências da sua efetividade, a prescrição dos medicamentos que modificam este prognóstico é inferior ao desejado, como demonstrado em registros recentes.^{178,179} Estudos experimentais utilizando geleia de *Wharton* e membrana amniótica identificaram agentes terapêuticos promissores na regeneração cardíaca após IAM.¹⁸⁰⁻¹⁸³

Diante de tais evidências, o presente estudo procurou comparar a eficácia do implante da geleia de *Wharton* e da membrana amniótica descelularizadas e na forma de arcabouço em ratos *Wistar* portadores IC como consequência do infarto agudo do miocárdio experimental.

No presente estudo, não se observou um benefício terapêutico referente à análise funcional intragrupos no trigésimo dia pós-IAM. Os parâmetros da FE% do ventrículo esquerdo apresentados demonstraram um discreto aumento em seus índices entre o sétimo e o trigésimo dia que foi de 36,6% para 39,7% no grupo GW e de 34% para 36,8% no grupo MA, no entanto, estes acréscimos não sustentaram uma significância estatística ($p=0,381$ e $p=0,140$), respectivamente. Achados similares já foram demonstrados em estudos prévios, utilizando células mioblásticas esqueléticas e mesenquimais.¹⁸⁴ Estes achados podem estar relacionados ao remodelamento

ventricular, não obstante, da discreta melhora da função cardíaca, pois o tamanho e a geometria do VE. Alguns autores, no entanto, acreditam que a capacidade de regeneração do tecido cardíaco pós-IAM, utilizando células mioblásticas esqueléticas, seja restrita à região onde as células foram injetadas, sem impacto abrangente na reversão do remodelamento ventricular é possível que a ação da GW e da MA, provenientes da CTMs podem ter sofrido este mesmo impacto.¹⁸⁵ Por outro lado, Balbi *et al.*, que utilizaram CTMs provenientes da membrana amniótica em seu estudo sugeriram que a melhora da função ventricular em estudos *in vivo* utilizando estas células pode estar relacionada a dose distribuída,¹⁸⁶ reforçando esta teoria alguns autores sugerem que exista uma relação direta entre o número de células migratórias e a melhora funcional como também o seu tamanho e forma, no entanto, esses mecanismos ainda não foram totalmente elucidados.^{187,188}

Com relação aos VS (ml) e VD (ml) do ventrículo esquerdo, observou-se um aumento tanto no grupo controle como nos grupos GW e MA, após um mês de acompanhamento clínico, sugerindo uma perda da atividade contrátil nos três grupos devido à ocorrência de remodelamento ventricular. Em 2021, Simeoni *et al.*, avaliaram os benefícios deletérios da celulose em forma de arcabouço em prevenir o remodelamento ventricular e também não obtiveram resultados satisfatórios em relação às análises do VS (ml) e VD (ml) em seus grupos de estudo.¹⁸⁹ Já o estudo experimental de Blume *et al.*, demonstrou melhorias significativas na FE (%) e nos VS (ml) e VD (ml) do ventrículo esquerdo no grupo de seu estudo que utilizou a MA descelularizada como terapia, porém, sua casuística apresentou animais com infartos considerados 36,7% menores se comparados ao grupo MA do presente estudo.¹²⁵ Dentro deste contexto, alguns autores já sugeriram que o tamanho do infarto é o principal determinante da presença e intensidade da remodelação ventricular pós-IAM.^{177,190}

Contudo, é importante ressaltar que o estudo randomizado conduzido por Gal *et al.*, acompanhou 116 pacientes pós-IAM, dos quais 58 pacientes receberam administração intracoronária de GW e ao final de 18 meses de evolução os resultados evidenciaram um efeito anti remodelamento significativo em relação ao grupo placebo, porém tais resultados não foram reproduzidos em relação à redução do tamanho do infarto.¹⁹¹

Embora as terapias propostas no presente estudo não tenham demonstrado resultados significativos na análise funcional e no efeito anti remodelamento, os resultados de 30 dias derivados da análise histopatológica referentes à área de cicatriz pós-IAM mostrou benefício significativo para o grupo que recebeu o tratamento com MA em relação ao grupo controle ($p=0,009$). Nesta análise, observou-se uma redução da área de cicatriz no tecido cardíaco, reproduzindo resultados de estudos prévios.^{16,192} Tais achados podem estar relacionados ao potencial das CTMs em promover a indução de miogênese e angiogênese, fatores de crescimento que possuem atividade tanto parácrina como autócrina, capacidade de diferenciação celular, síntese de colágeno e neovascularização resultando na formação de novos vasos e consequentemente, aumento da perfusão tecidual gerando, em última instância, uma melhora na função cardíaca.^{108,193,194}

A relevância de identificar o tamanho do infarto é evidenciada ao determinar o nível de comprometimento do ventrículo esquerdo, sendo um ponto crucial na análise das consequências estruturais e operacionais pós-IAM.¹⁹⁵ Além disso, é comum que grandes infartos estejam associados a diferentes níveis de fibrose nas áreas não afetadas pelo infarto, tornando a presença de fibrose um fator de mau prognóstico para os pacientes com IC, pois alguns autores identificaram por meio de estudos histopatológicos de pacientes com IC que sofreram morte súbita, uma estreita correlação entre a causa da morte e a presença de fibrose miocárdica.^{18,196}

Outro aspecto muito importante a ser considerado é a presença do CI no miocárdio, pois o percentual de colágeno tipo I e III pode determinar a ocorrência de reparo celular. Estudos prévios, já demonstraram que alterações na estrutura do CI podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da disfunção ventricular miocárdica em cardiopatias, as regiões não infartadas do ventrículo esquerdo apresentam um aumento na expressão de RNAm para pré-colágeno tipo I e III, podendo resultar em acúmulo progressivo desta proteína.¹⁹⁷⁻²⁰⁰

O colágeno tipo I representa uma proteína fibrilar rígida que fornece resistência à tração. Portanto, o aumento dos seus níveis pode impor aumento da rigidez miocárdica, comprometendo a função sistólica e diastólica do VE.²⁰¹

No presente estudo, a análise histopatológica mostrou uma predominância de colágeno tipo I no grupo controle ao final do experimento (30º dia). GC $97,3 \pm 3,1\%$, seguido do GW $90 \pm 13,2\%$. Já o GMA apresentou menores taxas de colágeno tipo I no mesmo intervalo de tempo, $85,2 \pm 15,1\%$, porém não houve significância estatística nos testes realizados ($p = 0,74$). Pauschinger e *Colts* observaram em pacientes com cardiomiopatia dilatada uma maior quantidade de colágeno intersticial naqueles que apresentavam FE $< 50\%$ em comparação com aqueles com FE $> 50\%$ ($4,3 \pm 0,1\%$ vs. $2,7 \pm 0,9\%$, $p < 0,0035$), o que foi associado ao aumento da relação dos colágenos tipo I e III decorrentes da remodelação ventricular.²⁰² Estes achados corroboram com os achados apresentados.

Já na análise de colágeno tipo III se observou predominância desta proteína no GMA em relação aos demais grupos, no entanto, não houve uma significância estatística. A área de tecido cicatricial, caracterizada pela deposição de matriz extracelular rica em colágeno tipo III, apresentou índices maiores nas regiões tratadas com MA se comparadas aos demais grupos. Embora os testes estatísticos referentes ao

percentual de colágeno intersticial tipo III também não tenham produzido resultados significativos ($p=0,74$), a predominância desta proteína encontrada ao final dos trinta dias de evolução pós-terapia com MA em ratos com IC pode estar relacionada à melhora da cicatriz miocárdica. O estudo de Uemura *et al.*, demonstrou que a CT teve influência significativa ($p<0,001$) no percentual de colágeno tipo III em relação ao grupo controle em modelo de infarto experimental com ratos *Wistar*. Estes resultados podem ter influenciado no benefício funcional da FE (%) apresentados em seu estudo.¹⁵

Evidências de redução de cicatrizes miocárdicas após tratamento com biomateriais GW e MA usados para o reparo miocárdico levantam questões interessantes sobre os mecanismos pelos quais as células-tronco podem influenciar a regeneração do tecido cardíaco.²⁰³⁻²⁰⁵

Embora a terapia proposta com GW não tenha demonstrado nenhum benefício clínico significativo no tratamento da IC, foi identificada uma estabilidade nos parâmetros da FE (%) e aumento no volume de CI tipo III no grupo que recebeu o biomaterial de GW descelularizada em relação ao grupo controle ao final dos trinta dias de evolução. Até o momento, há poucos estudos a respeito de sua eficácia no contexto de IC, contudo, a combinação desta terapia em conjunto com células-tronco da medula óssea pode representar uma nova abordagem terapêutica no futuro, o suporte estrutural oferecido pela GW descelularizada poderia facilitar a migração e o recrutamento de novas células para o local do transplante aumentando assim a sobrevivência e replicação celular.

Em relação a utilização da MA descelularizada, algumas de suas características biológicas, como camada acelular rica em colágeno e uma membrana basal densa, já ajudaram a reduzir a inflamação e promover a epitelização em estudos anteriores.^{206,207} Dentro deste contexto, é possível que estas propriedades biológicas justifiquem os

efeitos terapêuticos observados no grupo que recebeu a terapia com a MA descelularizada. Entretanto, testes mais aprimorados e com uma maior coorte utilizando essa terapia de forma isolada e/ou associada a células-tronco da medula óssea podem fornecer mais respostas e tornar a utilização da MA uma opção de tratamento no futuro, trazendo melhorias significativas na qualidade de vida dos pacientes portadores de IC que não respondem significativamente aos tratamentos convencionais com medicamentos e dispositivos mecânicos.

A DAC é uma patologia complexa, caracterizada por disfunção endotelial, inflamação vascular, acúmulo de lipídios modificados, células inflamatórias e detritos celulares em “placas” dentro da parede vascular e apesar dos grandes progressos nas estratégias preventivas e terapêuticas, a DAC e as suas sequelas continuam sendo a principal causa de morbimortalidade em todo o mundo.^{208,209} Esta estatística alarmante trouxe à luz a complexa etiologia da aterosclerose, que têm sido reconhecida como não sendo induzida apenas por fatores de risco convencionais, como hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, dislipidemia, sexo masculino e tabagismo mas também associada à microbiota intestinal, após alguns autores encontrarem DNA (ácido desoxirribonucleico) de múltiplas espécies de bactérias em uma placa aterosclerótica,²¹⁰ esta, dependendo de sua estabilidade, pode causar eventos isquêmicos e trombóticos, como a doença coronariana, infarto agudo do miocárdio e no pior dos cenários a IC.

A IC é uma das principais causas de morbidade relacionada à DAC e não é apenas uma epidemia específica da população, mas também global. Para os pacientes com IC cujas vidas são afetadas pela doença, mesmo um bom tratamento parece ter efeitos variados na sua qualidade de vida, atualizações científicas recentes sugerem que os tratamentos com medicamentos ainda apresentam resultados ambíguos e principalmente discrepâncias nas indicações,^{211,212} além disso, alguns autores sugerem

que as terapias com algumas drogas e com dispositivos convencionais podem estar próximos de atingir seu máximo potencial na redução de danos no coração, no tamanho do infarto agudo do miocárdio e principalmente na redução de eventos cardiovasculares maiores compostos por morte, transplante ou implante de assistência ventricular.²¹³ Em contrapartida, acumulam-se evidências do uso bem-sucedido dos biomateriais na engenharia de tecidos cardíacos biológicos.^{214,215}

Em nossa pesquisa experimental, escolhemos usar e comparar a eficácia terapêutica da geleia de *Wharton* e da membrana amniótica descelularizadas em ratos *Wistar* com IC, pois essa técnica reduz a quantidade de antígenos que podem causar rejeição no tecido, diminui a resposta do sistema imunológico após o implante e facilita a integração no organismo, e principalmente por preservar colágeno, proteínas e fatores de crescimento, que são mantidos intactos durante a descelularização.^{216,217}

O processo de descelularização é um avanço importante na área de pesquisa, sendo um sistema ideal para a entrega de medicamentos e nanopartículas com fatores de crescimento, proporcionando um ambiente favorável para células e tecidos.²¹⁸

No presente estudo, a diminuição da área de cicatriz miocárdica, utilizando membrana amniótica descelularizada como terapia pode influenciar o processo de cicatrização e promover a regeneração do tecido, e também pode ter um impacto significativo na função cardíaca e na diminuição de eventos arrítmicos após um infarto agudo do miocárdio.

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados: o tamanho da população pode ser insuficiente para avaliar a segurança dos biomateriais, a ausência de um braço utilizando as mais recentes terapias medicamentosas e a falta de um acompanhamento mais longo.

8.0 CONCLUSÃO

Neste estudo experimental, analisamos os efeitos do uso da geleia de *Wharton* e da membrana amniótica humana descelurizadas no tratamento da insuficiência cardíaca causada por infarto agudo do miocárdio experimental em ratos *Wistar*.

Os dados deste estudo sugerem que não houve benefício funcional pós-implante de GW e de MA no infarto do miocárdio em ratos *Wistar* com disfunção ventricular esquerda.

Entretanto, foi identificada uma menor área de fibrose no grupo MA em relação ao grupo controle, sugerindo um benefício no processo de cicatrização da fibrose miocárdica destes animais.

REFERÊNCIAS

1. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, et al. GBD-NHLBI-JACC Global Burden of Cardiovascular Diseases Writing Group. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Dec 22; 76(25): 2982-3021.
2. Oliveira GM; Brant LC, Polanczuk CA. Et al. Cardiovascular Statistics - Brazil 2021. *Estatística Cardiovascular – Brasil 2021*. Arquivos brasileiros de cardiologia, 2022;118(1):115-373.
3. Stevens B, Pezzullo L, Verdian L, et. al. Os Custos das Doenças Cardíacas no Brasil. *Arq Bras Cardiol*. 2018; 111(1): 29-36.
4. Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol*. 2004; 84 (4): 1381-478.
5. Jiang WL, He HW, Yang ZJ. The angiotensinogen gene polymorphism is associated with heart failure among Asians. *Sci Rep*. 2014 Feb 27;4:4207.
6. Terra LN, Ehlers OR. Ácidos graxos ômega 3 e aterosclerose. In: Clemente E, Jeckel-Neto EA. *Aspectos Biológicos e Geriátricos do Envelhecimento*. Porto Alegre: EDIPUCRS; 1998. p.135-47.
7. Dengler TJ, Katus HA. Stem cell therapy for the infarcted heart (“cellular cardiomyoplasty”). *Herz*, 2002; 7: 598-610.
8. Stone GW, Selker HP, Thiele H, et al. Relationship between infarct size and outcomes following primary PCI: patient-level analysis from 10 randomized trials. *J Am Coll Cardiol*. 2016; 67: 1674–83.
9. Gersh BJ, Stone GW, White HD, et al. Pharmacological facilitation of primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: is the slope of the curve the shape of the future? *JAMA*. 2005; 293:979–86.
10. Piperata A, Caraffa R, Bifulco O, et al. Marginal donors and organ shortness: concomitant surgical procedures during heart transplantation: a literature review. *J Cardiovasc Med*. (2022) 23:167–75.
11. Ishii H, Amano T, Matsubara T, et al. Pharmacological intervention for prevention of left ventricular remodeling and improving prognosis in myocardial infarction. *Circulation*. 2008; 118:2710–8.
12. Heidenreich P, Bozkurt B, Aguilar D, et al. 2022 Aha/Acc/Hfsa guideline for the management of heart failure: a report of the American college of cardiology/American heart association joint committee on clinical practice guidelines. *Circulation*. (2022) 2022:1063.

13. Roura S, Gálvez-Montón C, Mirabel C, et al. A. Mesenchymal stem cells for cardiac repair: are the actors ready for the clinical scenario? *Stem Cell Res Ther.* 2017 Oct 27; 8(1):238.
14. Gupta A, El-Amin SF, Levy HJ, et al. Umbilical cord-derived Wharton's jelly for regenerative medicine applications. *J Orthop Surg Res.* 2020 Feb 13;15(1):49.
15. Uemura L, Simeoni RB, Júnior PA, et al. Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells (BMMC)-Associated Anti-Inflammatory Nanoparticles for Cardiac Repair after Myocardial Infarction. *J Funct Biomater.* 2022 May 13; 13(2):59.
16. Blume GG, Machado-Júnior PAB, Paludo Bertinato G, et al. Tissue-engineered amniotic membrane in the treatment of myocardial infarction: a systematic review of experimental studies. *Am J Cardiovasc Dis.* 2021 Feb 15;11(1):1-11.
17. Couture M. A Single-center, Retrospective Study of Cryopreserved Umbilical Cord for Wound Healing in Patients Suffering from Chronic Wounds of the Foot and Ankle. *Wounds.* 2016 Jul;28(7):217-25.
18. Guo Y, Yu Y, Hu S, et al. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells for cardiovascular diseases. *Cell Death Dis.* 2020 May 11;11(5):349.
19. Franc S, Rousseau JC, Garrone R, et al. Microfibrillar composition of umbilical cord matrix: characterization of fibrillin, collagen VI and intact collagen V. *Placenta.* 1998; 19(1):95– 104.
20. Ferguson VL, Dodson RB. Bioengineering aspects of the umbilical cord. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009 May;144 Suppl 1:S108-13.
21. Main BJ, Maffulli N, Valk JA, Rodriguez HC, Gupta M, El-Amin 3rd SF, et al. Umbilical cord-derived Wharton's jelly for regenerative medicine applications: A systematic review. *Pharmaceuticals.* 2021;14(11):1-5.
22. Tseng CC, Ramjankhan FZ, de Jonge N, Chamuleau SA. Advanced Strategies for End-Stage Heart Failure: Combining Regenerative Approaches with LVAD, a New Horizon? *Front Surg.* 2015; 2:10.
23. Jakus AE, Laronda MM, Rashedi AS, et al. "Tissue Papers" from Organ-Specific Decellularized Extracellular Matrices. *Adv Funct Mater.* 2017; 27(3).
24. Wang JS, Xie HT, Zhang MC. Characterization of Ex Vivo Expanded Oral Mucosal Epithelium Cells on Acellular Porcine Corneal Stroma for Ocular Surface Reconstruction. *J Ophthalmol.* 2017; 2017:6761714.
25. Badylak SF. Decellularized allogeneic and xenogeneic tissue as a bioscaffold for regenerative medicine: Factors that influence the host response. *Ann Biomed Eng.* 2014;42(7):1517–27.
26. Oliver-Vila I, Coca MI, Grau-Vorster M, Pujals-Fonts N, Caminal M, Casamayor-Genescà A, et al. Evaluation of a cell-banking strategy for the production of

clinical grade mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly. *Cytotherapy*. 2016 Jan 1 ;18(1):25–35.

27. Majka M, Sułkowski M, Badyra B. Regeneration of Ischemic Cardiovascular Damage Using Wharton's Jelly as an Unlimited Source of Therapeutic Stem Cells. Capítulo 21 (pag 286).

28. Moore Marc C, Van De Walle Aurore, Chang Jerry JC and MPS. *Adv Healthc Mate*. HHS Public Access. 2017; 6(18):01–22.

29. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs). Fact sheet nº 317. Geneva: WHO; 2015. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html> (Acessado em 11 de maio de 2022).

30. Falcão, C.A. et al. Infarto agudo do miocárdio com supradesnívelamento do segmento ST. In: Falcão, C.A. et al. (Ed.). *Condutas em Cardiologia*. Rio de Janeiro: Medbook, 2008. p. 331-342.

31. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 1995; 92(3):657-71.

32. Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, Chiu RC. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: Pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 122(4): 699-705.

33. Smith SC Jr, Feldman TE, Hirshfeld JW Jr, et al. ACC/AHA/ SCAI guidelines for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention). *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: e1–121.

34. Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction--executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to revise the 1999 guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction). *J Am Coll Cardiol*. 2004; 44(3):671-719.

35. Wang J, Shum-Tim D, Galipeau J, et al. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: Feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 120(5): 999-1006.

36. Braunwald, E. (1998). Evolution of the management of acute myocardial infarction: A 20th century saga. *Lancet*, 352 (9142), 1771-1774.

37. Huang YH, How CK, Ho CS. Factors Affecting Delayed Hospital Arrival of Patients with Acute Myocardial Infarction in Kinmen. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Jan 25; 19 (3):1323.

38. Sheifer SE, Rathore SS, Gersh BJ, et al. Time to presentation with acute myocardial infarction in the elderly: associations with race, sex, and socio economic characteristics. *Circulation*. 2000 Oct 3;102(14):1651-6.
39. Terkelsen CJ, Jensen LO, Tilsted HH, et al. Health care system delay and heart failure in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention: follow-up of population-based medical registry data. *Ann Intern Med*. 2011 Sep 20; 155(6):361-7.
40. Niccoli G, Burzotta F, Galiuto L, et al. Myocardial no-reflow in humans. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54:281-292.
41. Siervuli TF, Silva AS, Silva AC. et al. Infarto do miocárdio: alterações morfológicas e breve abordagem da influência do exercício físico / Myocardial infarction: Morphological changes and brief approach to the influence of exercise. *Rev. bras. cardiol*. 27(5): 349-355.
42. Matsubara BB, Zornoff LA. Matriz colágena intersticial e sua relação com a expansão miocárdica no infarto agudo. *Arq Bras Cardiol*. 1995; 64(6):559-63.
43. Zornoff LA, Paiva SA, Duarte DR, et al. Remodelação Ventricular Pós-Infarto do Miocárdio: Conceitos e Implicações Clínicas, Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction: Concepts and Clinical Implications. Artigo de Revisão • *Arq. Bras. Cardiol*. 92 (2) • Fev 2009.
44. Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, et al. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: Pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 122(4): 699-705.
45. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:569-82.
46. Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. História natural da remodelação miocárdica: da agressão aos sintomas. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2000; 1:8-16.
47. Zornoff LAM, Spadaro J. Remodelação ventricular após infarto agudo do miocárdio: conceitos, fisiopatologia e abordagem terapêutica. *Arq Bras Cardiol* 1997; 68: 453-60.
48. Mann DL, Zipes DP, Libby P, Bonow RO. Braunwald's heart disease: a text book of cardiovascular medicine. 10th ed. Philadelphia: Elsevier; 2015.
49. Shirey EK, Proudfit WL, Hawk WA. Primary myocardial disease clinical finding, angiographic and biopsy diagnosis. *Am Heart J* 1980;99: 198-207.
50. Falcão CA, Paulitsch FS, Bocchi EA et al. Aspectos básicos da terapia celular em cardiologia. In: FALCÃO, C.A. et al. (Ed.). *Conduas em Cardiologia*. Rio de Janeiro: Medbook, 2008. p. 489-504.

51. Murphy SP, Ibrahim NE, Januzzi Jr JL. Heart failure with reduced ejection fraction. *JAMA*. 2020; 324(5):488-504.
52. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2013; 62:e147–e239.
53. Comitê Coordenador da Diretriz de Insuficiência Cardíaca; Rohde LEP, Montera MW, Bocchi EA, et al. Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica e Aguda. *Arq Bras Cardiol*. 2018 Sep;111(3):436-539.
54. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2017 ACC/AHA/HFSA focused update of the 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America. *Circulation*. 2017; 136(6):e137-e161.
55. Bennett JA, Riegel B, Bittner V, et al. Validity and reliability of the NYHA classes for measuring research outcomes in patients with cardiac disease. *Heart Lung*. 2002; 31(4):262-70.
56. Oliveira GM, Brant LC, Polanczyk CA, et al.; Estatística Cardiovascular – Brasil 2021. *Arq Bras Cardiol*. 2022; 118 (1):115-373.
57. Silveira IH, Oliveira BFA, Cortes TR, et al. The Effect of Ambient Temperature on Cardiovascular Mortality in 27 Brazilian Cities. *Sci Total Environ*. 2019; 691:996-1004.
58. Brasil. Ministério da Saúde. Hospital Information System of the Unified Health System (SIH/SUS) [Internet]. Brasília: Ministry of Health of Brazil [cited 2022 may 16]. Available From: <http://tabnet.datasus.gov.br/>.
59. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics–2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014; 129:e28-e292.
60. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS et al. Stroke Statistics, S. (2015). Heart disease and stroke statistics-2015 update: a report from the 88 American Heart Association. *Circulation*, 131(4), e29-322.
61. Shah NS, Molsberry R, Rana JS, et al. Heterogeneous trends in burden of heart disease mortality by subtypes in the United States, 1999-2018: observational analysis of vital statistics. *BMJ*. 2020; 370:m2688.
62. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. American Heart Association Statistics Committee; Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2016; 133:e38–e360.

63. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, et al. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2017 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2017;135(10):e146-e603.
64. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, et al. American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2018; 137:e67-e492.
65. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, et al. American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2019 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2019; 139:e56-e528.
66. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, et al. Heart disease and stroke statistics-2020 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2020; 141:e139-e596.
67. Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, et al. Heart disease and stroke statistics-2021 update: a report from the American Heart Association external icon. *Circulation*. 2021;143:e254-e743.
68. Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, et al. Heart disease and stroke statistics-2022 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2022; 145:e153-e639.
69. Cook C, Cole G, Asaria P, et al. The annual global economic burden of heart failure. *Int J Cardiol*. 2014;171(3):368-76.
70. Soares FL, Junqueira MB, Silva DG, et al. Perfil epidemiológico das internações por Insuficiência Cardíaca no Brasil entre 2019 e 2023. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences* Volume 6, Issue 4 (2024), Page 887-896.
71. Del Trigo M, Rodés-Cabau J. Transcatheter Structural Heart Interventions for the Treatment of Chronic Heart Failure. *Circ Cardiovasc Interv*. 2015; 8(7):e001943.
72. Marcondes-Braga GM, Moura AZ, Issa VS, et al. Emerging Topics Update of the Brazilian Heart Failure Guideline - 2021. *Arq Bras Cardiol*. 2021; 116(6):1174-212.
73. Heidenreich PA, Albert NM, Allen LA, et al. Forecasting the Impact of Heart Failure in the United States: a Policy Statement from the American Heart Association. *Circ Heart Fail*. 2013; 6(3):606-19.
74. Cestari RF, Garces TS, Sousa JB, et al. Spatial Distribution of Mortality for Heart Failure in Brazil, 1996 - 2017. *Arq Bras Cardiol*. 2022; 118 (1):41-51.
75. Heiat A, Gross CP, Krumholz HM. Representation of the elderly, women, and minorities in heart failure clinical trials. *Arch Intern Med* 2002; 162:1682-1688.

76. Gerber Y, Weston SA, Redfield MM, et al. A contemporary appraisal of the heart failure epidemic in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *JAMA Intern Med* 2015;175:996-1004.
77. Tsao CW, Lyass A, Enserro D, et al. Temporal trends in the incidence of and mortality associated with heart failure with preserved and reduced ejection fraction. *JACC Heart Fail* 2018; 6:678-685.
78. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur J Heart Fail* 2016; 18:891–975.
79. Berliner D, Haßselmann A, Bauersachs J. The treatment of heart failure with reduced ejection fraction. *Dtsch Arztebl Int* 2020; 117:376–386.
80. Komajda M, Böhm M, Borer JS, et al. Incremental benefit of drug therapies for chronic heart failure with reduced ejection fraction: a network meta-analysis. *Eur J Heart Fail* 2018; 20:1315–1322.
81. Miller L, Birks E, Guglin M, et al. Use of Ventricular Assist Devices and Heart Transplantation for Advanced Heart Failure. *Circ. Res.* 2019, 124, 1658-1678.
82. Yusen RD, Edwards LB, Dipchand AI, et al. The registry of the International Society for heart and lung transplantation: Thirty-third adult lung and heart-lung transplant Report-2016; focus theme: primary diagnostic indications for transplant. *J Heart Lung Transplant* 2016; 35:1170-84.
83. Butler J, Zannad F, Filippatos G, et al. Totality of evidence in trials of sodium–glucose co-transporter-2 inhibitors in the patients with heart failure with reduced ejection fraction: implications for clinical practice. *Eur Heart J* 2020; 41:3398–3401.
84. Bassi NS, Ziaieian B, Yancy CW, et al. Association of optimal implementation of sodium–glucose cotransporter 2 inhibitor therapy with outcome for patients with heart failure. *JAMA Cardiol* 2020; 5:1–5.
85. Guarita-Souza LC, Carvalho KAT, REBELATTO C, et al. A comparação entre o transplante de células-tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*, v. 20, n. 3, p. 270-8, 2005.
86. Gaffney MM, Hynes SO, Barry F, et al. Cardiovascular gene therapy: current status and therapeutic potential. *Br J Pharmacol.* 2007;152(2):175-88.
87. Scimia MC, Gumpert AM, Koch WJ. Cardiovascular gene therapy for myocardial infarction. *Expert Opin Biol Ther.* 2014;14(2):183-95.
88. Guarita-Souza LC, Carvalho RG, Pouzet B, et al. O transplante de células mioblásticas esqueléticas e de células cardíacas no infarto do miocárdio. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2002; 17(4):293-384.

89. Segers VF, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*. 2008; 451(7181):937-42.
90. Formiga FR, Tamayo E, Simon-Yarza T, et al. Angiogenic therapy for cardiac repair based on protein delivery systems. *Heart Fail Rev*. 2012;17(3):449-73.
91. Roura S, Gálvez-Montón C, Mirabel C, et al. Mesenchymal stem cells for cardiac repair: are the actors ready for the clinical scenario? *Stem Cell Res Ther*. 2017; 8:238.
92. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 1997; 88 (3):287-98.
93. Lemischka IR. Stem cell biology: a view toward the future. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1044:132-8.
94. Weissman IL (2004) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100: 157-168.
95. Horie M, Ito A, Kawabe Y, Kamihira M (2011) A Genetically Engineered STO Feeder System Expressing E-Cadherin and Leukemia Inhibitory Factor for Mouse Pluripotent Stem Cell Culture. *J Bioprocess Biotechniq* S3: 001.
96. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279-4295.
97. Singh V, Sinha RJ, Sankhwar SN, et al. (2010) Squamous Cell Carcinoma of the Kidney – Rarity Redefi ned: Case Series with Review of Literature. *J Cancer Sci Ther* 2: 082-085.
98. Blanpain C, Horsley V, Fuchs E (2007) Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell* 128: 445-458.
99. Biswas A, Hutchins R (2007) Embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 16: 213-222.
100. O'Donoghue K, Fisk NM (2004) Fetal stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 18: 853-875.
101. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, et al. (2004) Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103: 1669-1675.
102. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, et al. (2001) Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3: 778-784.
103. O'Donoghue, K., Fisk, N.M., 2004. Fetal stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 18, 853–875.

104. O'Donoghue, K., Chan, J., 2006. Human fetal mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 1, 371–386.
105. Ljung K, Gronlund A, Felldin U, et al. 2019 Mar 1. Human fetal cardiac mesenchymal stromal cells differentiate in vivo into endothelial cells and contribute to vasculogenesis in immunocompetent mice. *Stem Cells Dev.* 28 (5), 310–318.
106. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, et al. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 342: 626–633, 2000.
107. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001;410(6829):701-5.
108. Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Rebelatto C, et al. Cell transplantation: differential effects of myoblasts and mesenchymal stem cells. *Int J Cardiol.* 2006; 111(3):423-9.
109. Ziegler M, Wang X, Lim B, et al. Platelet-targeted delivery of peripheral blood mononuclear cells to the ischemic heart restores cardiac function after ischemia-reperfusion injury. *Theranostics*, 7:3192-3206.
110. Piegas L, Timerman A, Feitosa G, et al. V Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia Sobre Tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio com Supradesnível do Segmento ST. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2015; 105(2), 1-121.
111. Machado-Junior AB, et al. Cell-Based Therapies for Myocardial Regeneration in Heart Failure: 20 Years of Debate. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*, 2020; v. 35, n. 4.
112. Malouf NN, Coleman WB, Girsham JW, et al. Adult derived stem cells from the liver become myocytes in the heart in vivo. *Am J Pathol*, 2001;158:1929-1935.
113. Mueller P, Lemcke H, David R. Stem cell therapy in heart diseases–cell types, mechanisms and improvement strategies. *Cell. Physiol. Biochem.* 2018, 48, 2607-2655.
114. Dixit P, Katare R. Challenges in identifying the best source of stem cells for cardiac regeneration therapy. *Stem Cell Res Ther*, v. 6, n. 1, p. 1, 2015.
115. Rikhtegar R, Pezeshkian M, Dolati S, et al. Mahdipour M., Nouri M., Jodati A.R., Yousefi M. Stem cells as therapy for heart disease: iPSCs, ESCs, CSCs, and skeletal myoblasts. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 109, p. 304-313, 2019.
116. Trelford JD, Trelford-Sauder M. The amnion in surgery, past and present. *Am J Obstet Gynecol.* 1979 Aug 1;134(7):833-45.
117. Davis JS (1910) Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med. J.*15: 307.
118. Yuso FN, Hilmy N; Chapter 4: Historical Development of Amnion. *Human Amniotic Membrane*, 2017 pp. 73-86.

119. Kim EY, Lee K-B, Kim MK. The potential of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane and amniotic fluid for neuronal regenerative therapy. *BMB Rep.* 2014; 47 (3):135.
120. Kogan S, Sood A, Granick MS. Amniotic Membrane Adjuncts and Clinical Applications in Wound Healing: A Review of the Literature. *Wounds Compend. Clin. Res. Pract.* 2018, 30, 168–173.
121. Chehelcheraghi F, Eimani H, Homayoonsadraie S, et al. Effects of Acellular Amniotic Membrane Matrix and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Improving Random Skin Flap Survival in Rats. *Iran Red Crescent Med. J.* **2016**, 18, e25588.
122. Henry JD, Delrosario L, Fang J, et al. (2020). Development of injectable amniotic membrane matrix for post myocardial infarction tissue repair. *Adv. Healthcare Mater.* 9, 1900544.
123. Cargnoni A, Di Marcello M, Campagnol M, et al. Amniotic membrane patching promotes ischemic rat heart repair. *Cell Transplant.* 2009; 18 (10):1147-59.
124. Roy R, Haase T, Ma N, et al. Decellularized amniotic membrane attenuates postinfarct left ventricular remodeling. *J Surg Res.* 2016 Feb; 200(2):409-19.
125. Blume GG, Machado-Junior PAB, Simeoni RB, et al. Bone-Marrow Stem Cells and Acellular Human Amniotic Membrane in a Rat Model of Heart Failure. *Life* 2021, 11,958.
126. García-Muñoz E, Vives J. Towards the standardization of methods of tissue processing for the isolation of mesenchymal stromal cells for clinical use *Cytotechnology*, 2021; 73:513-522.
127. Heil, JR.; Bordoni, B. Embryology, Umbilical Cord. *Stat Pearls*, April 21, 2022.
128. Oliver-Vila I, Coca MI, Grau-Vorster M, et al. Evaluation of a cell-banking strategy for the production of clinical grade mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly. *Cytotherapy* 2016, 18, 25-35.
129. Laroye C, Gauthier M, Antonot H, et al. Mesenchymal stem/stromal cell production compliant with good manufacturing practice: comparison between bone marrow, the gold standard adult source, and Wharton's jelly, an extraembryonic source. *J Clin Med.* 2019; 8:2207.
130. Lim J, Razi ZRM, Law JX, et al. Mesenchymal stromal cells from the maternal segment of human umbilical cord is ideal for bone regeneration in allogenic setting. *Tissue Eng Regen Med* 2018; 15:75–87.
131. Bankowski E, Sobolewski K, Romanowicz L, et al. Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly and their alterations in EPH-gestosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; 66:109e17.

132. Jaworski S, Sobolewski K, Ban E. Wharton's jelly as a reservoir of peptide growth factors. 2005. p. 747e52.
133. SAFARI, F. et al. Human umbilical cord-derived scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 107, n. 8, p. 1793-1802, 2019.
134. Martensen, R. Thomas Wharton's Adenographia (review). *Bull. Hist. Med.* 1998, 72, 762-763.
135. García-Fernández C, López-Fernández A, Borrós S et al. Strategies for large-scale expansion of clinical-grade human multipotent mesenchymal stromal cells. *Biochem. Eng. J.* 2020, 159, 107601.
136. Nekanti U, Rao VB, Bahirvani AG, et al. Long-term expansion and pluripotent marker array analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2010; 19:117-30. 35.
137. Fong CY, Chak LL, Biswas A, et al. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev Rep.* 2011; 7:1-6.
138. Gao LR, Zhang NK, Ding QA, et al. Common expression of stemness molecular markers and early cardiac transcription factors in Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells and hESCs. *Cell Transplant.* 2013; 22:1883-900.
139. Nartprayut K, U-Pratya Y, Kheolamai P, et al. Cardiomyocyte differentiation perinatally-derived mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep.* 2013; 7:1465-9.
140. Lupu M, Khalil M, Andrei E, et al. Integration properties of Wharton's jelly-derived novel mesenchymal stem cells into ventricular slices of murine hearts. *Cell Physiol Biochem.* 2011; 28:63-76.
141. Zhang W, Liu XC, Yang L, et al. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells promote myocardial regeneration and cardiac repair after miniswine acute myocardial infarction. *Coronary Artery Dis.* 2013; 24:549-58.
142. Lopez Y, Lutjemeier B, Seshareddy K, et al. Wharton's jelly or bone marrow mesenchymal stromal cells improve cardiac function following myocardial infarction for more than 32 weeks in a rat model: a preliminary report. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2013; 8:46-59.
143. Sobolewski K, Malkowski A, Bankowski E, et al. Wharton's jelly as a reservoir of peptide growth factors. *Placenta.* 2005; 26:747-52.
144. Zhao Y, Sun X, Cao W, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells relieve acute myocardial ischemic injury. *Stem Cells Int* 2015:2015.

145. Wu KH, Zhou B, Yu CT, et al. Therapeutic potential of human umbilical cord derived stem cells in a rat myocardial infarction model. *Ann Thorac Surg* 2007; 83(4):1491e8.
146. Liu CB, Huang H, Sun P, et al. Human umbilical cord- human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells improve left ventricular function, perfusion, and remodeling in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *Stem Cells Transl Med*. 2016; 5(8):1004-1013.
147. Leor J, Guetta E, Chouraqui P, Guetta V, et al. Human umbilical cord blood cells: a new alternative for myocardial repair? *Cytotherapy*. 2005;7(3):251-7.
148. Rabbani S, Soleimani M, Sahebjam, et al. (2018). Simultaneous delivery of Wharton's jelly mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-1 in acute myocardial infarction. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 17(2), 426–441.
149. Bartolucci J, Verdugo FJ, González PL, et al. Safety and Efficacy of the Intravenous Infusion of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Patients With Heart Failure: A Phase 1/2 Randomized Controlled Trial (RIMECARD Trial [Randomized Clinical Trial of Intravenous Infusion Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Cardiopathy]). *Circ Res*. 2017 Oct 27; 121(10): 1192-1204.
150. Pu L, Meng M, Wu J, et al. Compared to the amniotic membrane, Wharton's jelly may be a more suitable source of mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering and clinical regeneration. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Mar 21;8(1):72.
151. NIMSANOR, Natakarn et al. Overexpression of anti-fibrotic factors ameliorates anti-fibrotic properties of Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells under oxidative damage. *Bioscience trends*, v. 13, n. 5, p. 411-422, 2019.
152. DHASMANA A, SINGH A, RAWAL S. Biomedical grafts for tracheal tissue repairing and regeneration “Tracheal tissue engineering: an overview”. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, v. 14, n. 5, p. 653-672, 2020.
153. Dubus M, Scmazzon L, Chevrier J, et al. Antibacterial and Immuno modulatory Properties of Acellular Wharton’s Jelly Matrix. *Biomedicines*. 2022;10(2).
154. COBEA, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. *Princípios Éticos na experimentação Animal* 1991.
155. Reis FB, Lopes AD, Faloppa F, et al. A importância da qualidade dos estudos para a busca da melhor evidência* The relevance of Trial quality to find the Best evidence. *Revista Brasileira de Ortopedia*, Volume 43, Number 6, 2008, pp. 209-216(8).
156. Cooper CJ, Pfeffer JM, Finn PV, Pfeffer MA. Characteristics of a model of myocardial infarction produced by coronary artery ligation in the rat. *Cardiovasc Pathol*. 1995; 4: 189-94.

157. Spadaro J, Hashimoto LM, Franco RSS, Bregagnol EA, Tucci PJF. Efeitos da administração prévia de amiodarona na incidência precoce de fibrilação ventricular durante isquemia miocárdica experimental. *Arq Bras Cardiol.* 1984; 42: 25-9.
158. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fhbein MC, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res.* 1979 Apr; 44 (4):503-12.
159. Goldman S, Raya TE. Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure. *J Card Fail.* 1995; 1: 169-77.
160. Jain M, Liao R, Podesser BK, Ngoy S, Apstein CS, Eberli FR. Influence of gender on the response to hemodynamic overload after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283: H2544-50.
161. Winter SCN, Macedo RM, Francisco JC, et al. Impact of a High-Intensity Training on Ventricular Function in Rats After Acute Myocardial Infarction. *Arq Bras Cardiol.* 2018 Mar 12; (4):373-380.
162. Zornoff LA, Paiva AR, Minicucci MF, et al. Infarto do Miocárdio Experimental em Ratos: Análise do Modelo.; *ArqBrasCardiol* 2009; 93(3) : 434-440.
163. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Manual de utilização de animais/ FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 2008. 54 p.
164. Carvalho AT, Guarita-Souza LC, Hansen P, et al. Cell Transplantation After The Coculture of Skeletal Myoblasts and Mesenchymal Stem Cells in the Regeneration of the Myocardium Scar: An Experimental Study in Rats. *Transplant. Proc.* 2006, 38, 1596-1602.
165. Gao E, Lei YH, Shang X, et al. A Novel and Efficient Model of Coronary Artery Ligation and Myocardial Infarction in the Mouse. *Circ Res.* 2010; 107: 1445-1453.
166. Mahmoud AI, Porrello ER, Kimura W, et al. Surgical models for cardiac regeneration in neonatal mice. *Nat Protoc.* 2014 Feb; 9(2):305-11.
167. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults:an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2015; 16(3):233-70.
168. Cosmo S, Francisco JC, Correa CR, et al. Efeito do exercício associado ao transplante de células-tronco sobre a função ventricular de ratos pós-infarto agudo do miocárdio. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2012; 27(4):542-5.
169. Francisco JC, Correa CR, Cardoso MA, et al. Decellularized Amniotic Membrane Scaffold as a Pericardial Substitute: An In Vivo Study. *Transplant. Proc.* 2016, 48, 2845-2849.

170. Foltz KM, Neto AE, Francisco JC, et al. Decellularized Wharton Jelly Implants Do Not Trigger Collagen and Cartilaginous Tissue Production in Tracheal Injury in Rabbits. *Life (Basel)*. 2022 Jun 23; 12(7):942.
171. Francisco, JC. DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL A PARTIR DE MATRIZ AMNIÓTICA HUMANA. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, p. 43. 2012.
172. Brilla CG, Janicki JS, Weber KT, et al. Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension: role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries. *Circ Res*. 1991; 69: 107-15.
173. Brilla CG, Pick R, Tan LB, et al. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res*. 1990; 67: 1355-64.
174. Doering CW, Jalil JE, Janicki JS, Pick R, Aghili S, Abrahams C, et al. Collagen network remodeling and diastolic stiffness of the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 1988; 22: 686-95.
175. Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR - The histopathologic evolution of myocardial infarction. *Chest* 1978; 73: 843-9.
176. Westman PC, Lipinski MJ, Luger D, et al. Inflammation as a driver of adverse left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(17):2050-60.
177. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990; 81: 1161-72.
178. Komadja M, Cowie MR, Tavazi L, et al. on behalf of the QUALIFY investigators. Physicians guideline adherence is associated with better prognosis in out patients with heart failure and reduced ejection fraction: the QUALIFY international registry. *Eur J Heart Fail*. 2017;19(11):1414-23.
179. Comitê Coordenador da Diretriz de Insuficiência Cardíaca; Rohde EP, Montera MW, Bocchi EA, e cols. Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica e Aguda. *Arq Bras Cardiol*. 2018 Sep;111(3):436-539.
180. Roy R, Haase T, Ma N, et al. Decellularized amniotic membrane attenuates postinfarct left ventricular remodeling. *J Surg Res*. 2016 Feb; 200(2):409-19.
181. Ntege EH, Sunami H, Shimizu Y. Advances in regenerative therapy: A review of the literature and future directions. *Regen Ther*. 2020 Feb 20;14:136-153.
182. Liu CB, Huang H, Sun P, et al.: Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells improve left ventricular function, perfusion, and remodeling in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *Stem Cells Transl Med*. 2016, 5:1004-13.
183. Lim M, Wang W, Liang L, et al.: Intravenous injection of allogeneic umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells reduces the infarct area and

ameliorates cardiac function in a porcine model of acute myocardial infarction. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9:129.

184. Pontes MRN, Leães EP. Remodelamento Ventricular: dos Mecanismos Moleculares e Celulares ao Tratamento. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul - Ano XIII nº 03 Set/Out/Nov/Dez 2004.*

185. Souza LC, Carvalho KA, Rebelatto C, et al. O transplante em conjunto de células mioblásticas esqueléticas e mesenquimais (cocultivadas) na disfunção ventricular pós-infarto do miocárdio. *Arq. Bras Cardiol* 2004; 83(4): 288-293.

186. Balbi C, Lodder K, Costa A, et al. Reactivating endogenous mechanisms of cardiac regeneration via paracrine boosting using the human amniotic fluid stem cell secretome. *Int J Cardiol.* 2019 Jul 15;287:87-95.

187. Bilal M, Haseeb A, Sher Khan MA, et al. Intracoronary infusion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: a novel treatment in patients of acute myocardial infarction. *J Pak Med Assoc.* 2015 Dec; 65(12):1369.

188. Bodor DL, Pönisch W, Endres RG, et al. Of cell shapes and motion: the physical basis of animal cell migration. *Dev Cell.* 2020; 52 (5):550-562.

189. Simeoni RB, Mogharbel BF, Francisco JC, et al. Beneficial Roles of Cellulose Patch-Mediated Cell Therapy in Myocardial Infarction: A Preclinical Study. *Cells.* 2021 Feb 17;10 (2):424.

190. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res.* 1985; 57: 84-95.

191. Gao LR, Chen Y, Zhang NK, et al. Intracoronary infusion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction: double-blind, randomized controlled Trial. *BMC Medicine* (2015) 13:162.

192. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, et al. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med.* 2000; 342(9):626-33.

193. Majka M, Sułkowski M, Badyra B, Musiałek P. Concise review: mesenchymal stem cells in cardiovascular regeneration: emerging research directions and clinical applications. *Stem Cells Transl Med* 2017;6:1859–67.

194. Santos ND, Mosqueira D, Sousa LM, et al. Human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells attenuate remodeling after myocardial infarction by proangiogenic, antiapoptotic, and endogenous cell-activation mechanisms. *Stem Cell Res Ther* 2014;5(1):5.

195. Passino C, Barison A, Vergaro G, et al. Markers of fibrosis, inflammation, and remodeling pathways in heart failure. *Clin. Chim. Acta* 2015, 443, 29–38.

196. Tanaka M, Fujiwara H, Onodera T, Wu DJ, Hamashima Y, Kawai C. Quantitative analysis of myocardial fibrosis in normals, hypertensive hearts, and hypertrophic cardiomyopathy. *Br Heart J*. 1986;55(6):575-81.
197. Hare JM, Walford GD, Hruban RH, et al. Ischemic cardiomyopathy: endomyocardial biopsy and ventriculographic evaluation of patients with congestive heart failure, dilated cardiomyopathy and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1992; 20: 1318-25.
198. Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, et al. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation*. 1999; 99: 2750-6.
199. Mukherjee D, Sen S. Alteration of collagen phenotypes in ischemic cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 1991; 88: 1141-6.
200. Sun Y, Weber KT. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res*. 2000 May;46(2):250-6.
201. Lapiere CM, Nusgens B, Pierard GE. Interaction between collagen type I and type III in conditioning bundles organization. *Connect Tissue Res*. 1977; 5:21-29.
202. Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck PL, Kühl U, Schultheiss HP. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation*. 1999 Jun 1;99(21):2750-6.
203. Wang Q, He X, Wang B, et al. Injectable collagen scaffold promotes swine myocardial infarction recovery by long-term local retention of transplanted human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Sci China Life Sci*. 2021 Feb; 64(2):269-281.
204. Li S-H, Sun Z, Guo L, et al. Elastin over expression by cell-based gene therapy preserves matrix and prevents cardiac dilation. *J Cell Mol Med* 2012, 16:2429–2439.
205. Gubert F, da Silva JS, Vasques JF, et al. Mesenchymal Stem Cells Therapies on Fibrotic Heart Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 12;22(14):7447.
206. Wilshaw SP, Kearney J, Fisher J. et al. (2008) Biocompatibility and Potential of Acellular Human Amniotic Membrane to Support the Attachment and Proliferation of Allogeneic Cells. *Tissue Engineering Part A*, 14, 463-472.
207. Bourne, GL. The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. *Am J Obstet Gynecol* 79(6), 1070–1073, 1960.
208. Douglas G, Channon. The pathogenesis of atherosclerosis. *Medicine* Volume 42, Issue 9, September 2014, Pages 480-484
209. Khan MA, Hashim MJ, Mustafa H. et al. Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease: Results from the Global Burden of Disease Study. *Cureus* 2020, 12, e9349.

210. Al Samarraie A, Pichette M, Rousseau G. Role of the Gut Microbiome in the Development of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 12;24(6):5420.
211. Remme WJ, Swedberg K. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. *Eur Heart J.* 2001; 22 (17): 1527-60
212. Correia ET, Barbeta LM, Mesquita ET. Chegou a Hora de uma Nova Terapia Padrão para a Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Reduzida? *Arq Bras Cardiol.* 2021; 117(1):149-152
213. Kadner A, Zund G, Maurus C, et al. Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 25: 635-41.
214. Breyman C, Schmidt D, Hoerstrup SP. Umbilical cord cells as a source of cardiovascular tissue engineering. *Stem Cell Rev* 2006; 2: 87-92.
215. Semenov OV, Breyman C. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly and their potential for cardio-vascular tissue engineering. *Open Tissue Eng Regen Med J* 2011; 4: 64-71.
216. Courtman DW, Pereira CA, Kashef V, et al. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction. *J Biomed Mater Res* 1994 Jun; 28(6):655-66.
217. Jorge LF, Francisco JC, Bergonse N, et al. Tracheal repair with acellular human amniotic membrane in a rabbit model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2018, 12, e1525–e1530.
218. Main BJ, Maffulli N, Valk JA, et al. Umbilical cord-derived Wharton's jelly for regenerative medicine applications: A systematic review. *Pharmaceuticals.* 2021; 14(11):1-5.

ANEXOS

ANEXO 1: Aprovação comissão de ética em pesquisa no uso de animais



Nº 1484

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.055324/2022-21

APROVADO/APPROVAL: 18/10/2022– R.O. 09/2022

TÍTULO: Avaliação Funcional e Histológica da Regeneração Cardíaca a partir do Implante da Gelela de Wharton, da Membrana Amniótica e das Células-Tronco Mononucleares no Infarto do Miocárdio com Disfunção Ventricular Esquerda: Estudo Experimental

TITLE: Functional and Histological Evaluation of Cardiac Regeneration from Wharton's Jelly Implant, Amniotic Membrane and Mononuclear Stem Cells in Myocardial Infarction with Left Ventricular Dysfunction: Experimental Study

AUTORES/AUTHORS: Luiz Cesar Guarita Souza; Meila Bastos de Almeida Cardoso; Luize Kremer Gamba; Marcos Antônio Denk;

DEPARTAMENTO/DEPARTAMENT: PPGCS - PUCPR

Profa. Dra. Janaina Menezes Zanoveli
Coordenador(a) da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ANGELA CRISTINA DA FONSECA DE OLIVEIRA, INSTITUCIONAL**, em 25/10/2022, às 11:52, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **JANAINA MENEZES ZANOVELI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 25/10/2022, às 16:52, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida seu informando o código verificador **5009164** e o código CRC **C68BE604**.

APÊNDICE

INFORMAÇÕES DO ANIMAL - PROJETO			
Grupo		Número	
		Peso	
Centro		Data do procedimento	
Cirurgião			
Eventos clínicos ocorridos durante o procedimento:			
Tempo de procedimento		ÓBITO	---- Sim [] ---- Não []
[] Outro evento			
DADOS PÓS OPERATÓRIO ATÉ 30 DIAS			
Eventos clínicos ocorridos Pós procedimentos:			
- Sinais depressão respiratória respiração anormal, respiração ofegante e secreção nasal; edema agudo de pulmão; Sim [] Não [] se sim qual? - Fatores associados à falência da bomba cardíaca como diminuição da circulação periférica, extremidades azuis e frias; Sim [] Não [] se sim qual? - Icterícia e secreções nos olhos e aparência dos pelos; Sim [] Não [] se sim qual?			
ECOCARDIOGRAFIA 7 DIAS			
Dados da ECOCARDIOGRAFIA 7 DIAS		Data do procedimento	
FEVE%		FEVE% (Média)	
VSFVE, ml		VSFVE, ml (Média)	
VDFVE, ml		VDFVE, ml (Média)	
FOLLOW UP ECOCARDIOGRAFIA 30 DIAS			
Data do procedimento			
FEVE%		FEVE% (Média)	
VSFVE, ml		VSFVE, ml (Média)	
VDFVE, ml		VDFVE, ml (Média)	