

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

LAERCIO UEMURA

**MATRIZES AMNIÓTICAS DESCELULARIZADAS RECOBERTAS COM
NANOPARTÍCULAS DE
15 Δ 12,14 PROSTAGLANDINA J2 (15D-PGJ2) MELHORAM A FUNÇÃO
VENTRICULAR EM MODELO ANIMAL COM DISFUNÇÃO VENTRICULAR PÓS-
INFARTO**

**CURITIBA
2017**

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

LAERCIO UEMURA

**MATRIZES AMNIÓTICAS DESCELULARIZADAS RECOBERTAS COM
NANOPARTÍCULAS DE
15 Δ 12,14 PROSTAGLANDINA J2 (15D-PGJ2) MELHORAM A FUNÇÃO
VENTRICULAR EM MODELO ANIMAL COM DISFUNÇÃO VENTRICULAR PÓS-
INFARTO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná como requisito para obtenção ao título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita Souza

Coorientador: Prof. Dr. Júlio Cesar Francisco

CURITIBA

2017

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

Uemura, Laercio

U22m

2017

Matrizes amnióticas descelularizadas recobertas com nanopartículas de 15, 12, 14 prostaglandina J2 (15D-PGJ2) melhoram a função ventricular pós-infarto/ Laercio Uemura ; orientador: Luiz Cesar Guarita Souza. – 2017.

69 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2017

Bibliografia: f. 58-69

1. Coração - cirurgia. 2. Infarto do miocárdio. 3. Função ventricular.
4. Nanopartículas. I Souza, Luiz Cesar Guarita. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
III. Título.

CDD 20. ed. – 616.1237



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**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 quatorze dias do mês de dezembro de 2017 às 10hs e 00min., realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação **“Matrizes Amnióticas Descelularizadas recobertas com nanopartículas de 15 Δ12,14 Prostaglandina J2 (15d-PGJ2) melhora a função ventricular em modelo animal com disfunção ventricular pós infarto”** apresentado por **Laercio Uemura** para obtenção do título de mestre; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita de Souza– Presidente (PUCPR)	
Prof. Dr. José Rocha Faria Neto – (PUCPR)	
Profa. Dra. Vivian Ferreira do Amaral (UFPR)	

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

Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita de Souza Conceito: APROVADO
Prof. Dr. José Rocha Faria Neto Conceito: APROVADO
Profa. Dra. Vivian Ferreira do Amaral Conceito: APROVADO

Parecer Final: APROVADO

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita de Souza
Presidente da Banca Examinadora

Prof.ª Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

AGRADECIMENTOS

A Deus. À minha esposa Elizabete, companheira de todos os momentos, sempre apoiando e incentivando, sem o seu carinho e amor não teria conseguido realizar este sonho.

Aos meus filhos, Paulo Viniscius e Thaís, por compreenderem os momentos que deixamos de desfrutar em algumas ocasiões.

Aos meus pais, Itaru e Norma, que nos deixaram no meio desta caminhada, que estejam orgulhosos deste filho; onde estiverem, sempre estarão presentes em meu coração.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, que permitiu a realização deste programa de mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita Souza, por me aceitar como aluno no seu grupo de estudos, por entender as dificuldades que enfrentei durante este projeto. Pela amizade, apoio, incentivo e orientações sempre construtivas. Aprendi muito como aluno, a você é grande a admiração pela pessoa e o profissional que representa.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Júlio Cesar Francisco, sempre disponível para discutirmos pontos que eram importantes na evolução do projeto, muito obrigado.

Ao Professor Dr. José Eduardo Siqueira, coordenador do curso de medicina da PUC Londrina, sempre mestre, amigo e grande incentivador da minha carreira acadêmica.

À professora Dra. Karen Barros Parron Fernandes, pelo incentivo nesta caminhada.

Ao Professor Dr. Roberto Flávio Pecoits Filho, pelo apoio e orientação.

À secretária do Programa de pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde da PUC Sra. Jane Fábica Domênica, pela grande ajuda nesta caminhada.

RESUMO

Introdução: O arcabouço de membrana amniótica humana descelularizada (MAHD) possui fatores de crescimento que estimulam estruturas de regeneração tecidual. A 15d-PGJ2 é um agonista de PPAR Gama com atividade anti-inflamatória. O objetivo deste estudo é comparar a eficácia da MAHD revestida com 15d-PGJ2 na melhora da função ventricular, em um modelo de rato com disfunção ventricular pós-infarto.

Métodos: O infarto do miocárdio foi induzido em 24 ratos por oclusão da coronária esquerda. Após uma semana, os animais foram submetidos a ecocardiografia para avaliação da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDFVE) e volume sistólico final do ventrículo esquerdo (VSFVE). Os animais com fração de ejeção inferior a 40% foram incluídos no estudo e foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: controle (n = 8), MAHD (n = 8) e MAHD + 15d-PGJ2 (n = 8). No grupo MAHD foi implantada apenas a membrana e, no MAHD + 15d-PGJ2, foi implantada a membrana + 15d-PGJ2, na área infartada. A avaliação ecocardiográfica foi realizada após 1 mês. Para análise histológica, o tecido cardíaco foi corado com Masson, Sirius Red, o anticorpo contra CD31 e conexin 43.

Resultados: Não houve diferenças significativas na FEVE basal, VDFVE e VSFVE em todos os grupos. Após 1 mês, a fração de ejeção diminuiu no grupo controle e aumentou no grupo MAHD e no grupo MAHD + 15d-PGJ2 em comparação com o grupo controle. O VDFVE e VSFVE nos grupos MAHD e MAHD + 15d-PGJ2 diminuíram em comparação com o grupo controle, com efeito ventricular anti-remodelamento. A avaliação da histopatológica identificou a redução do tamanho do infarto e da quantidade de colágeno tipo 1 nos grupos MAHD e MAHD + 15d-PGJ2. Novos vasos sanguíneos e cardiomiócitos foram identificados por anticorpos contra CD31 e conexin 43, na área infartada.

Conclusão: A MAHD + 15d-PGJ2 proporcionou um aumento na fração de ejeção e impediu a dilatação ventricular neste modelo animal de disfunção ventricular pós-infarto.

Palavras-chave: PPAR- γ . 15d-PGJ2. Coração. Infarto do miocárdio. Anti-inflamatório.

ABSTRACT

Background: Acellular human amniotic membrane scaffold (AHAS) has on your growth factors that stimulate tissue regeneration structures. The 15d-PGJ2 is an agonist of PPAR γ featuring anti-inflammatory. The objective of this study is to compare the efficacy of AHAS loaded with 15d-PGJ2 in improving ventricular function in a rat model of post-infarct ventricular dysfunction.

Methods: Myocardial infarction was induced in 24 rats by left coronary occlusion. After a week, the animals were subjected to echocardiography for evaluation of left ventricle ejection fraction (LVEF), left ventricle end diastolic volume (LVED) and left ventricle end systolic volume (LVES). Animals with ejection fraction lower than 40% were included in the study and were randomized into three groups: control (n=8), AHAS (n=8) and AHAS + 15d-PGJ2 (n=8). In the AHAS group was implanted the membrane only and in the AHAS + 15d-PGJ2 was implanted de membrane +15d-PGJ2 on myocardial infarction. Echocardiographic evaluation was performed after 1 month. For histological analysis, heart tissue was stained with Masson's, Sirius Red, the the antibody against CD31, connexin 43.

Results: There were no significant differences in the baseline LVEF, LVED, and LVES in all groups. After 1 month, ejection fraction decreased in the control group and increase AHAS group and in AHAS +15d-PGJ2 group in comparison to control group. The LVED and LVES in AHAS and AHAS + 15d-PGJ2 groups decreased compared to the control group, featuring a ventricular anti-remodeling effect. Histopathology the infarcted area identified the reduction of infarct size and collagen type 1 in the AHAS and AHAS + 15d-PGJ2 groups. New blood vessels and cardiomyocytes have been identified in an infarcted area by CD31 and connexin 43.

Conclusion: AHAS + 15d-PGJ2 provided an increase in the ejection fraction and prevented ventricular dilation in this post-infarction ventricular dysfunction model.

Keywords: PPAR- γ . 15d-PGJ2. Heart. Myocardial infarction. Anti-inflammatory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão intraoperatória do coração do rato por esternotomia.....	53
Figura 2. Efeito da 15d-PGJ2 na viabilidade das células mesenquimais.....	53
Figura 3. Imagens microscópicas de MAHD e MAHD com nanopartículas.....	54
Figura 4. Análise ecocardiográfica entre os grupos.....	54
Figura 5. Cortes de coração fixados com Tricromio de Masson.....	55
Figura 6. Imagens de cortes de coração fixadas com Sirius red.....	56
Figura 7. Cortes de coração com coloração com anticorpo CD 31 e Connexin 43.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

a-SMA	Alfa actina de músculo liso
AIT	Acidente Isquêmico Transitório
AVCI	Acidente Vascular Cerebral Isquêmico
BRA	Bloqueador do Receptor da Angiotensina
ECM	Matriz extra celular
FE	Fração de ejeção
FEVE	Fração de ejeção de ventrículo esquerdo
FN	Fator Nuclear
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IAMCSST	Infarto agudo do miocárdio com supra desnivelamento do segmento ST
IC	Insuficiência cardíaca
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IM	Infarto do miocárdio
Keap 1	Kelch like ech associated protein 1
LCZ 696	Sacubitril-Valsartana
MA	Membrana Amniótica
MAHD	Membrana amniótica humana descelularizada
NF	Fator nuclear
PPARGama	Agonistas dos receptores ativados por Proliferadores de Peroxissoma Gama
TGF-b	Fator transformador de crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
VE	Ventrículo esquerdo
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
VSFVE	Volume sistólico final de ventrículo esquerdo
VDFVE	Volume diastólico final de ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 JUSTIFICATIVA.....	14
3 OBJETIVOS.....	15
3.1 GERAL	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	15
4 REVISÃO DA LITERATURA	16
4.1 AS CÉLULAS-TRONCO.....	17
4.2 A MEMBRANA AMNIÓTICA	19
4.2.1 Estrutura básica e composição	20
4.2.2 Propriedades da Membrana	22
4.3 MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA DESCELULARIZADA (MAHD)	24
4.4 ESTUDOS ATUAIS COM A MEMBRANA AMNIÓTICA	25
5. 15-DEOXY-Δ12,14-PROSTAGLANDINA J2 (15D-PGJ2)	32
5.1 15-D-PGJ2 E REMODELAMENTO CARDÍACO	32
5.2 ESTUDOS CLÍNICOS COM AGONISTAS DO PPAR GAMA	35
5.2.1 Iris Trial (<i>Pioglitazone after Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack</i>)	35
5.2.2 Estudo Proactive (<i>Prospective Pioglitazone Clinical Trial in Macrovascular Events</i>)	35
5.2.3 Record Trial (<i>Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes</i>)	36
5.2.4 Dream Trial (<i>Diabetes Reduction Assessment with Ramipril and rosiglitazone Medication</i>)	36
5.2.5 Act Now (<i>Actos Now for the Prevention of Diabetes</i>)	36
5.2.6 Adopt (<i>A Diabetes Outcome Progression Trial</i>)	37
6 ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO.....	38
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

A doença isquêmica do coração é a principal causa de mortalidade no mundo, apesar da evolução no tratamento do infarto agudo do miocárdio, a mortalidade ainda tem aumentado (ROTH et al, 2015).

Dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS, 2015) revelaram que o infarto agudo do miocárdio (IAM) foi a principal causa de morte por doença cardíaca no Brasil, tendo sido observado aumento de 48% entre 1996 e 2011. Se essa tendência persistir, a previsão é de que o IAM se torne a principal causa isolada de morte em 2020. No Brasil, as doenças cardiovasculares representaram 10% das internações e mais de um terço dos óbitos (DATASUS, 2015).

Há uma evolução no tratamento do infarto agudo do miocárdio; a terapia farmacológica e as técnicas cirúrgicas mais avançadas, porém, ainda temos vários desafios, como o tempo de resposta ao tratamento que leva em consideração o início dos sintomas até a terapêutica de reperfusão instituída (química ou mecânica). Segundo o Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE), 21% dos pacientes com infarto agudo do miocárdio com supra desnivelamento do segmento ST (IAMCSST) foram inelegíveis para reperfusão em decorrência do início dos sintomas há mais de 12 horas (EAGLE et al, 2002).

Os pacientes que não recebem terapia de reperfusão têm maior morbimortalidade e uma das complicações é a disfunção cardíaca causada pelo remodelamento ventricular (WHITE, VHEW, 2008).

A disfunção ventricular implica em evolução para o quadro de insuficiência cardíaca (IC), com a manifestação clínica variável de acordo com o comprometimento ventricular.

A insuficiência cardíaca acomete de 1 a 2% da população, no Brasil, são entre 2.075.669 e 4.151.338 pacientes (BOCCHI et al, 2009). No mundo, há uma prevalência de 22 milhões de pacientes com insuficiência cardíaca, com 2 milhões de casos novos por ano (WORLD HEALTH STATISTICS, 2005).

A doença isquêmica é a principal causa de insuficiência cardíaca no Brasil, responsável por 30,3%, seguida pela causa hipertensiva (20,4%), dilatada idiopática (14,6%), valvar (12,4%), chagas (10,8%) (ALBUQUERQUE et al, 2015).

A IC é uma das principais causas de internações no Brasil, perdendo somente para o Câncer e a Pneumonia na população maior de 60 anos. Essa IC apresenta uma taxa de mortalidade intra-hospitalar de 12,6% no nosso país (ALBUQUERQUE et al, 2015).

No tratamento médico e cirúrgico, temos alguns estudos clássicos, iniciando com o estudo CONSENSUS (*Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study*) em 1987 (THE CONSENSUS TRIAL STUDY GROUP, 2015) e o SOLVD - tratamento (*Effect of Enalapril on Survival in Patients with Reduced Left Ventricular Ejection Fractions and Congestive Heart Failure*) em 1991 (THE SOLVD INVESTIGATORS, 1991), mostrando que Enalapril diminuía a mortalidade em pacientes com IC.

Também em 1991, o estudo V-HeFT II (*A Comparison of Enalapril with Hydralazine–Isosorbide Dinitrate in the Treatment of Chronic Congestive Heart Failure*) apresentou benefícios na utilização de Hidralazina e Nitrato combinados com Enalapril (COHN et al, 1991).

O estudo US Carvedilol HF (*The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure*), em 1996, apresentou dados com o uso de Carvedilol reduzindo mortalidade e internações por IC em pacientes usando Digital, diurético e inibidor da enzima de conversão (PACKER et al 1996).

Em 1999, o estudo RALES (*Randomized Aldactone Evaluation Study*) apresentou dados da Espironolactona associada à terapia padrão, reduzindo a morbidade e mortalidade em pacientes com IC severa (PITT, 1999).

O estudo Val-HeFT (*Valsartan Heart Failure Trial Investigators*) em 2001, concluiu que um Bloqueador do Receptor da Angiotensina II (BRA), reduziu significativamente a morbidade e mortalidade e melhorou os sinais clínicos e sintomas em pacientes com IC (COHN; TOGNONI, 2001).

Ainda em 2001, o estudo REMATCH (*Randomized Evaluation of Mechanical Assistance for the Treatment of Congestive Heart Failure*) concluiu que o uso de um dispositivo de assistência ventricular esquerda em pacientes com insuficiência cardíaca avançada resultou em um benefício na sobrevida e melhora na qualidade de vida (ROSE et al, 2001).

Em 2004, o estudo COMPANION (*Comparison of Medical Therapy, Pacing, and Defibrillation in Heart Failure [COMPANION] Investigators*), demonstrou que, em pacientes com IC avançada e QRS alargado, a terapia de ressincronização cardíaca

diminuiu o risco de morte por qualquer causa ou primeira hospitalização e, quando combinado com um desfibrilador implantável, reduziu de modo significativo a mortalidade (BRISTOW et al, 2004).

O estudo SCD-HeFT (*Sudden Cardiac Death in Heart Failure Trial*), em 2005, demonstrou que, em pacientes com FE menor que 35%, a amiodarona não apresentou efeito em relação à sobrevida, enquanto Desfibrilador Implantável reduziu a mortalidade global em 23% (BARDY et al, 2005).

Em 2014, foi publicado o estudo PARADIGM (*Angiotensin–Neprilysin Inhibition versus Enalapril in Heart Failure*) que evidenciou a superioridade do LCZ 696 (Sacubitril-Valsartana) em relação ao Enalapril na redução de mortalidade e hospitalização por IC (MCMURRAY et al, 2014).

No coração infartado, há uma ativação de cascata inflamatória, estimulando uma série de respostas celulares que promovem reparos, mas também podem estender as áreas de injúrias e causar um remodelamento negativo do ventrículo (SAXENA, 2016). Os tratamentos médicos convencionais alcançaram seus limites práticos como visto acima e não são capazes de regenerar o tecido cardíaco danificado e restaurar a função cardíaca (AWADA; HWANG; WANG, 2016).

Para tratarmos estes pacientes, várias pesquisas estão sendo realizadas, seja na área da revascularização miocárdica, como na regeneração miocárdica, seja por terapia genética, terapia celular e utilização de substâncias que atuem no processo inflamatório e regenerativo do miocárdio pós-infarto (LOSARDO, DIMMELER, 2004).

Vários trabalhos com terapia celular envolvendo células derivadas da medula óssea, células-tronco cardíacas, células mesenquimais, células progenitoras e mioblastos esqueléticos tem apresentado resultados sugerindo uma melhora da função ventricular (ASSMUS, 2002; WOLLERT et al, 2008; JANSSENS et al, 2006; SCHACHINGER et al, 2006; HUIKURI et al, 2008; TENDERA et al, 2009; HARE et al, 2009; MEYER et al 2009; BEITNES et al 2009; HIRSCH et al, 2001; RONCALLI et al, 2011; ASSMUS et al, 2006).

Os estudos apresentam uma melhora da função ventricular de forma significativa, porém, moderadamente e sem significados clínicos na morbimortalidade. A dose de células, via de administração e a composição celular ainda necessitam de estudos maiores (FISCHER et al, 2015).

A via de liberação das células e alta taxa de mortalidade das células implantadas, provavelmente secundária à reação inflamatória que ocorre no infarto,

mantém a procura de soluções para estas dificuldades. A possibilidade de disponibilizar as células através de arcabouços é uma das alternativas em estudo.

A membrana amniótica humana descelularizada (MAHD) é utilizada em várias áreas, especialmente na oftalmologia, dermatologia e odontologia, seja na forma isolada ou como arcabouço para proliferação celular e entrega de células no sítio desejado. Trabalhos apresentam bons resultados na utilização da membrana na substituição do pericárdio (FRANCISCO et al, 2016) e na atenuação do remodelamento cardíaco pós-infarto (ROY et al, 2016).

A utilização de substâncias que atuam no processo inflamatório que é desencadeado no período pós-infarto, seja na reperfusão ou no remodelamento cardíaco é uma área de grande volume de pesquisas. A ação de agonistas dos receptores ativados por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR-Gama) é uma das possibilidades de terapêutica no controle do remodelamento cardíaco pós-infarto do miocárdio (IM).

2 JUSTIFICATIVA

Apesar da evolução no tratamento do infarto agudo do miocárdio, muitos pacientes não são elegíveis para terapia de reperfusão e evoluem com disfunção ventricular e, conseqüentemente, um remodelamento ventricular.

O tratamento da causa do remodelamento cardíaco, processo inflamatório envolvido, respostas celulares que tentam reparar o dano miocárdio não são completamente moduladas.

Estudos com medicação e/ou procedimentos cirúrgicos atingiram o seu potencial no tratamento da IC, alternativas que possam atuar na regeneração das células miocárdicas lesadas e restaurar a função cardíaca estão em pesquisa.

A terapia celular tem a capacidade de promover a angiogênese, porém, alternativas são necessárias para atuarmos de forma mais efetiva no processo inflamatório e nas repostas celulares.

Terapias mais adequadas para reduzir o fardo ainda não resolvido do remodelamento cardíaco, que resultam no aumento da morbidade e mortalidade, tornam-se necessárias. Nesse sentido, estratégias adicionais para a regeneração do miocárdio e os mecanismos fisiopatológicos da cicatrização das lesões do infarto são exigidas para se evitar a dilatação e disfunção ventricular.

Novas abordagens terapêuticas estão no horizonte, incluindo a terapia de células progenitoras elaboradas, modulação de miRNA e interferência com a resposta inflamatória e fibrótica (FRACCAROLLO; GALUPPO; BAUERSACHS, 2012).

A presente pesquisa testará a hipótese de que o implante de membrana amniótica humana descelularizada isolada ou revestida por nanopartículas de 15d-PGJ2 possa regular as respostas inflamatórias e celulares no pós-infarto do miocárdio, resultando na melhora da função de ventrículo esquerdo.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar se a membrana amniótica humana descelularizada isolada ou revestida por nanopartículas de 15d-PGJ2 atuam no remodelamento cardíaco de ratos submetidos a infarto agudo do miocárdio, com disfunção ventricular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Avaliar se a 15d-PGJ2 altera a viabilidade das células tronco mesenquimais.
2. Avaliar a compatibilidade das nanopartículas de 15d-PGJ2 com a matriz aminótica descelularizada.
3. Comparar os índices de função e remodelamento cardíaco nos grupos em estudo: Fração de ejeção de ventrículo esquerdo (FEVE); Volume sistólico final de ventrículo esquerdo (VSFVE); Volume diastólico final de ventrículo esquerdo (VDFVE).
4. Análise histológica e imuno-histoquímica da deposição de colágeno e tamanho do infarto e remodelamento cardíaco nos grupos estudados.

4 REVISÃO DA LITERATURA

Após o infarto agudo do miocárdio nos pacientes que são submetidos à terapia de reperfusão (trombólise e/ou angioplastia primária), algumas alterações são denominadas injúrias de reperfusão. Os pacientes que não são submetidos a esta terapia evoluem com alteração miocárdica e sofrem uma cascata de processos inflamatórios e celulares que são denominados de remodelamento cardíaco.

A cicatrização do miocárdio infartado divide-se em fase inflamatória, fase proliferativa e a fase de maturação. Na primeira fase, as células inflamatórias migram para a área infartada e tem um efeito benéfico na angiogênese e fagocitose de células mortas e seus debris, porém, também podem ter um efeito deletério como dano celular, extensão do infarto e dilatação do ventrículo (FRANGOIANNIS, 2006).

Há presença de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF)- α , IL-6 e IL-11 que estão elevadas na zona de infarto (SAPAROV et al 2013). A supressão da sinalização inflamatória e a resolução do infiltrado inflamatório dependem da infiltração de subgrupos de leucócitos inibitórios na área infartada como subpopulações de monócitos e células T reguladoras (LIBBY; NAHRENDORF; SWIRSKI, 2013; WEIRATHER et al, 2014).

Os cardiomiócitos sobreviventes da zona fronteira do infarto também podem limitar o processo inflamatório com a secreção de mediadores com propriedades anti-inflamatórias (FRANGOIANNIS, 2015). À medida que a sinalização pró-inflamatória é suprimida, há uma diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, que são as células que predominam na segunda fase da cicatrização do infarto e que expressam alfa-actina de músculo liso (α -SMA) que participam do processo de remodelamento, produzindo colágeno e outras proteínas que formam a matriz e substituem os cardiomiócitos mortos (PORTER; TURNER, 2009).

Os cardiomiócitos, não somente das áreas infartadas, mas também de outras regiões do miocárdio, sofrem um processo de apoptose durante todo o processo de infarto, definido pelo aumento da ativação das caspases, um dos mecanismos desta ocorrência (CHENG et al 1996; BLACK et al, 1998). Os miofibroblastos secretam proteínas estruturais e matricelulares (como colágenos) preservando a integridade e geometria do ventrículo (SHINDE; FRANGOIANNIS, 2014). O sistema renina – angiotensina – aldosterona, o fator transformador de crescimento (TGF- β), o fator de

crescimento derivado de plaquetas e as proteases derivadas de mastócitos, triptase e quimase desempenham um papel importante na ativação dos fibroblastos nesta fase do infarto (SHINDE; FRANGOGIANNIS, 2014; DOBACZEWSKI, M. et al, 2010; COHN; COLUCCI, 2006; SCHNEE; HSUEH, 2000).

Na fase de maturação, a atividade proliferativa dos fibroblastos é suprimida e a deposição de novas proteínas da matriz é inibida. Durante a fase inflamatória e proliferativa da cicatrização do infarto, a proteína 10 interferon gama indutível, uma quimase antifibrótica, é regulada positivamente na área infartada e inibe a migração fibroblástica, evitando uma resposta fibrótica hiperativa (BUJAK et al, 2009).

Aproximadamente 85% do colágeno miocárdico é do tipo I (resistência à deformação) e 11% é colágeno do tipo II (mais distensíveis) e o seu entrelaçamento ajuda a determinar a conformidade ventricular. Porém, quando há isquemia, o perfil do colágeno muda nas diferentes fases do infarto. No início do processo, o colágeno é degradado na área infartada e, posteriormente, em outras áreas, há produção anômala de colágeno, orientação e entrelaçamento alterados que levam a fibrose e remodelamento patológico (JUGDUTT, 2003).

A ativação das células intersticiais persiste na zona fronteira do infarto e na remodelação de segmentos miocárdicos não infartados, refletindo as alterações regionais da mecânica cardíaca devido à perda de miocárdio contrátil e aos efeitos da sobrecarga de pressão e volume no miocárdio não infartado (SAXENA, 2016).

4.1 AS CÉLULAS-TRONCO

O estudo BOOST (*Bone marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration trial*), publicado em 2004, randomizou 60 pacientes para receber terapia com células de medula óssea autólogas *versus* terapia médica convencional após intervenção coronariana percutânea para o tratamento de IAMCSST, e apresentou uma melhora da fração de ejeção do ventrículo esquerdo. A melhora da FEVE no grupo terapia celular foi nos primeiros 6 meses e desapareceu aos 18 meses, exceto naqueles que tinham maior área de infarto (>60%) e FEVE inferior a 50% no momento da terapia celular (WOLLERT et al, 2004).

Posteriormente em 2006, o estudo REPAIR-AMI (*Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction*), randomizou mais de 200 pacientes para receber placebo ou células progenitoras autólogas de

medula óssea. Houve um aumento significativo da FEVE no grupo terapia celular *versus* grupo controle, com redução da incidência de eventos cardiovasculares adversos maiores e manutenção da melhora da FEVE no seguimento de 2 anos (SCHÄCHINGER et al, 2006).

Porém, vários outros estudos subsequentes com células de medula óssea, como o estudo REGENT (*Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction Trial*) (26) revelaram que, em pacientes com IAM e fração de ejeção (FE) reduzida, o tratamento com células tronco de medula óssea não levou a uma melhora significativa da FE ou volumes de VE.

Janssens et al. (2006) demonstrou que a transferência intracoronariana de células autólogas de medula óssea não aumentou a recuperação da função global de VE após IM.

Lunde et al. (2006) não encontraram efeitos da injeção intracoronariana de células autólogas mononucleares de medula óssea na função ventricular (53).

No HEBE trial (*Bone marrow cell therapy after acute myocardial infarction*) a infusão intracoronariana de células mononucleares de medula óssea ou sangue periférico após IAM não melhorou a função miocárdica sistólica regional ou global (HIRSCH et al, 2011).

Assim, o estudo LateTIME randomized trial (*A Phase II, Randomized, Controlled, Double-Blind Pilot Trial Evaluating the Safety and Effect of Administration of Bone Marrow Mononuclear Cells Two to Three Weeks Following Acute Myocardial Infarction*) (TRAVERSE et al, 2011), bem como o TECAM Trial (*Trial of Hematopoietic Stem Cells in Acute Myocardial Infarction*) (SAN ROMAN et al, 2015) não demonstraram melhora da função ventricular pós-IAM.

Chen et al (2004) encontraram uma melhora significativa na FEVE após injeção intracoronariana de células mesenquimais autólogas em pacientes pós IAM.

No estudo APOLLO (*A Randomized Clinical Trial of AdiPOse-derived Stem cells in the Treatment of Patients With ST-elevation myOcardial Infarction*) Houtgraaf et al (2012) randomizaram 14 pacientes com IAM anterior para receber infusão intracoronariana de células mesenquimais derivadas de tecido adiposo *versus* placebo e mostraram a segurança e uma tendência para pequena redução no tamanho do infarto.

Outros estudos também demonstraram melhora na sintomatologia e fração de ejeção em pacientes que receberam células-tronco mesenquimais quando comparados com o grupo controle (HARE et al, 2008). Em suma, concluiu-se que as células-tronco mesenquimais evitam a disfunção ventricular pós-infarto por apresentarem neoangiogênese (GUARITA-SOUZA et al, 2006).

Para avaliar a segurança e capacidade regenerativa das células-tronco mesenquimais, vários estudos vem sendo realizados e sugerem que elas tem o potencial para se diferenciar em várias linhagens mesodermas e mieloides (60). Como também possuem efeitos parácrinos como descrito pela primeira vez por Liang et al (LIANG et al 2013).

No entanto, os estudos realizados com células mesenquimais têm um tamanho de amostra pequeno, e as conclusões definitivas sobre a eficácia desta população celular ainda não podem ser feitas.

O processo de regeneração dos cardiomiócitos, especificamente, pode ser comprometido por alguns fatores, como pela entrega inadequada das células-tronco mesenquimais no miocárdio, causando uma alta taxa de mortalidade delas e pelo intenso processo inflamatório pós IAM (SINGH; SINGH; SEN, 2016).

Em 2012, no estudo CADUCEUS (*Cardiosphere-Derived Autologous Stem Cells to Reverse Ventricular Dysfunction*), Makkar et al (2012) descreveram os efeitos terapêuticos das cardiosphere-derived cells, no tratamento pós IAM. Houve uma redução significativa no tamanho do infarto, aumento da viabilidade e melhora na contração segmentar após o tratamento com as células tronco autólogas derivadas da esfera cardíaca (MALLIARAS et al 2014).

4.2 A MEMBRANA AMNIÓTICA

Davis, em 1910, usou pela primeira vez a membrana fetal como substituto de pele para tratamento de feridas abertas (NAUGHTON, 2002), porém, sem os meios práticos de separação, esterilização e armazenamento, o uso da membrana foi muito limitado.

Em 1913, Sabella e Stern descreveram o uso de membranas em queimaduras e em superfícies de pele ulceradas (SABELLA, 1913). De Rotth, em 1940, fez uma reparação plástica em defeitos conjuntivais com membrana fetal (DE

ROTH, 1940). Em 1946, Sorsby e Symons utilizaram membrana amniótica em queimaduras cáusticas com bons resultados (SORSBY, 1946).

Em 1965, Dino et al. (1965) demonstrou pela primeira vez que a membrana amniótica poderia ser separada, esterilizada e utilizada posteriormente de forma segura, iniciando uma série de pesquisas para avaliar o potencial regenerativo da membrana.

Posteriormente, a membrana amniótica foi utilizada como curativo de úlceras crônicas da perna e como curativo biológico para queimaduras e feridas cutâneas, na reconstrução cirúrgica da vagina artificial, cirurgias abdominais e na prevenção de adesão tecidual em cirurgias da cabeça, abdome, pelve, vagina e laringe (SILINI et al, 2015).

Pode se considerar os anos 1990 o início da história moderna do uso da membrana amniótica na oftalmologia (DUA et al, 2004). Tseng e colaboradores, em 1997, utilizaram a membrana amniótica na reconstrução da superfície conjuntival (TSENG; PRABHASAWAT; LEE, 1997).

Shimazaki et al no mesmo ano, utilizaram-na para reconstrução da superfície ocular em pacientes com queimadura química e termal (SHIMAZAKI; YANG; TSUBOTA, 1997).

Atualmente, várias patologias oculares estão sendo tratadas com a membrana amniótica, como, por exemplo, defeitos epiteliais da córnea, úlceras da córnea, glaucoma, pterígio, estrabismo, ceratopatia bolhosa entre outras (LIU et al, 2010).

Uma pesquisa no site do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos revelou que, em 2015, existiam 95 ensaios clínicos relevantes relacionados com células derivadas da placenta ou membrana amniótica nas áreas de oftalmologia, dermatologia, odontologia, ortopedia, cirurgia, lesões de coluna vertebral e outras, como no acidente vascular cerebral, encefalopatia hipóxica, hipertensão pulmonar, fibrose pulmonar idiopática, doença de Crohn, artrite reumatoide e à disfunção erétil (SILINI et al, 2015).

4.2.1 Estrutura básica e composição

A membrana fetal possui 2 camadas: o córion, que é vascularizado e está em contato com a parede uterina; e a membrana amniótica (MA) que não é

vascularizada e está em contato com o líquido amniótico, envolve o feto e é altamente flexível.

Na espécie humana, a MA surge sete a oito dias após a concepção (DUA, H. S; AZUARA-BLANCO, 1999). Apresenta dois tipos de células com diferentes origens embriológicas: as células epiteliais amnióticas, derivadas da ectoderme embrionária, e as células mesenquimais amnióticas, derivadas da mesoderme embrionária. Do ponto de vista ultraestrutural, ela é fina (espessura de 0,02 – 0,05 mm), resistente, transparente, não vascularizada e composta por 3 camadas principais: o epitélio, a membrana basal e o estroma.

4.2.1.1 O Epitélio

É uma camada única de células cuboidais, metabolicamente ativas que estão em contato direto com o líquido amniótico. Do epitélio são isoladas e armazenadas as células tronco mesenquimais. As células epiteliais secretam colágeno tipo III e IV e glicoproteínas não colágenas (lamininas, fibronectinas) dentro da membrana basal que servem como ligantes de adesão, transmitindo sinais e interagindo na superfície celular (CHOPRA; THOMAS, 2013). Estas células epiteliais e mesenquimais amnióticas humanas expressam pluripotência e são potentes reservatórios de células estaminais.

4.2.1.2 Membrana basal

É muito similar à membrana basal encontrada em outras partes do corpo. Composta por colágeno do tipo IV, V e VII, laminina 1 e 5 e fibronectina (FUKUDA, 1999), o tecido amniótico cujas sub-cadeias contém colágeno IV com laminina é eficaz em facilitar a adesão de células epiteliais.

4.2.1.3 Estroma

É dividido em 3 camadas distintas: a camada interna compacta, que está em contato com a membrana basal e contribui para a resistência à tração; camada intermediária composta por uma rede de fibroblastos; e a camada esponjosa (MALHOTRA; JAIN, 2014). O estroma da MA contém fatores mitogênicos, fatores

anti-angiogênicos, proteínas anti-inflamatórias e inibidores de protease naturais e propriedades anti-cicatrizantes (KURPAKUS; STOCK; JONES, 1992).

4.2.2 Propriedades da Membrana

4.2.2.1 Propriedades biológicas

4.2.2.2 Anti-inflamatórias

As células tronco mesenquimais na MA diminuem a secreção de citocinas pró-inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e Interferon (IFN) e aumentam a produção de citocinas anti-inflamatórias, interleucina 10 e interleucina 4 (MISHRA; SINGH, 2014). A MA suprime a expressão de potentes citocinas pró-inflamatórias, interleucina 1 α e interleucina 1 β (SOLOMON, 2001).

Inibidores naturais das metaloproteases foram encontrados na MA, sendo que as metaloproteases são liberadas pela infiltração de células polimorfonucleares e macrófagos (HAO et al, 2000). Shimmura et al (2001) demonstraram que células inflamatórias ficam presas e sofrem apoptose na matriz da MA, sugerindo que alguns efeitos anti-inflamatórios e antifibróticos da MA se devem à regulação da apoptose.

A MA também reduz o recrutamento de várias células inflamatórias, como as células CD3, células T CD4 e células CD11b para o local lesionado reduzindo assim a inflamação. Também várias células imunes como células T, células dendríticas e células B são ativamente suprimidas evitando o remodelamento patológico e a fibrose excessiva (WEISS et al, 2008).

4.2.2.3 Imuno modulatória

As células epiteliais e mesenquimais da MA tem uma expressão limitada de HLA classe Ia (HLA – A, B, C, DR) e antígenos de classe Ib (HLA – E, G). No entanto, os enxertos criopreservados ou descelularizados não conduzem a rejeição imunológica (AKLE et al, 1981). Esta característica permite que a MA seja utilizada sem qualquer tratamento imunossupressivo.

4.2.2.4 Antimicrobiana e antiviral

A MA adere-se firmemente às lesões através de ligações de fibrina e elastina que selam a ferida e evitam a contaminação, funcionando como uma barreira biológica (MISHRA; SINGH, 2014). Em feridas limpas, a propriedade hemostática das fibras de colágeno da membrana basal da MA previnem a formação de hematomas, reduzindo a colonização bacteriana e o risco de infecção. A formação de filamentos de fibrina durante a cicatrização de feridas, bem como resulta na sua adesão aos colágenos da MA, levando ao aprisionamento bacteriano e ao estímulo da migração de fagócitos. Há evidências de que a MA reduz a proliferação bacteriana mesmo em feridas contaminadas (BARADARAN-RAFII; ARJMAND; JAVADI, 2007). Na MA há cistatina E, que é um análogo do inibidor da proteinase de cisteína e tem várias propriedades antivirais (NI et al, 1997).

4.2.2.5 Propriedades Pró e Anti-Antiangiogênicas

A membrana intacta produz fatores antiangiogênicos, como trombospondina-1, endostatina, inibidores teciduais de metaloproteases (TIMP-1,2,3 e 4) (SHINDE; FRANGOIANNIS, 2014). A MA intacta também tem uma grande quantidade de proteínas ECM (Laminina-1, laminina-5, fibronectina), que estão envolvidas na supressão da neovascularização da córnea (FUKUDA et al, 1999).

Por outro lado, os estudos demonstram que a MA desidratada contém um grande número de fatores de crescimento pró-angiogênicos, como a angiogenina, angiopoetina-2, fator de crescimento endotelial, fator de crescimento derivado de insulina e endotelial vascular (LOPEZ-VALLADARES et al 2010). Esta propriedade angiogênica ajuda no desenvolvimento de enxertos vasculares que são úteis na revascularização de tecidos isquêmicos, úlceras crônicas, reparação de ossos e cartilagens. Além disso, a MA promoveu *in vitro* a migração quimiotática de células endoteliais humanas, sugerindo que estes fatores acima citados são capazes de recrutar células endoteliais para promover a revascularização da ferida (KIM et al 1999).

4.2.2.6 Propriedade Mecânica da MA

A MA possui, aproximadamente, 20% da espessura da membrana fetal, porém, domina as respostas mecânicas da bi-camada (OXLUND et al, 1990). O colágeno fornece a rigidez e a elastina a elasticidade da MA, características importantes no papel de arcabouço, pois a rigidez aumenta a estabilidade do arcabouço e evita o deslocamento que leva à cicatrização ininterrupta e à viabilidade.

O arcabouço deve ter elasticidade suficiente para manter os esforços de cisalhamento do tecido circundante (KIM et al 1999). A MA tem uma propriedade de integridade mecânica descrita como viscoelasticidade, que é uma resposta mecânica inerentemente dependente do tempo.

Embora a MA do pré-termo tem maior integridade mecânica que a MA do a termo, a rigidez do a termo é mais razoável para a maioria dos protocolos de engenharia de tecidos (WILSHAW et al, 2006).

4.3 MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA DESCELULARIZADA (MAHD)

A membrana amniótica descelularizada mantém os maiores componentes estruturais da MA humana, que são o colágeno e a elastina, retirando os componentes celulares e não deixando resíduos de DNA no tecido. A presença de colágeno IV, fibronectina e laminina observadas na membrana basal após a descelularização confirmam que a membrana basal permanece intacta após o processo. Esta característica é importante, pois a matriz extracelular contém componentes essenciais para a fixação, proliferação celular e para o remodelamento do tecido.

A descelularização não tem efeito sobre a resistência, nem sobre a extensibilidade do tecido e contribui para eliminar a rejeição imunológica. A MA descelularizada é biocompatível e não tem efeitos adversos na proliferação ou morfologia celular sendo, portanto, uma matriz de grande potencial como sistema de entrega de células (RIAU et al, 2010). Também é biodegradável, bioreabsorvível e pode ser bem incorporada ao tecido biológico, aumentando, por exemplo, a espessura do pericárdio, como demonstrado por Francisco et al. (2016).

A descelularização não só elimina a imunogenicidade da MA, mas também expõe as proteínas da matriz extracelular que eventualmente melhoram suas propriedades biológicas (RIAU et al, 2010).

Diferentemente da MA fresca, a MA descelularizada não induz a liberação de substâncias inflamatórias, predominantemente IL 6 a partir de fibroblastos cardíacos humanos. Portanto, não induz uma resposta imune celular visível, nem *in vitro*, nem *in vivo*, indicando que, predominantemente, os componentes da matriz extracelular da membrana exercem efeitos benéficos sobre o coração infartado, enquanto a resposta imune celular às células amnióticas epiteliais é prejudicial (LIU et al, 2010).

A MA descelularizada foi utilizada em vários estudos como veículo para diferentes tipos de células como, por exemplo, as células estaminais da córnea, liberando-as diretamente no sítio do defeito corneano (TSENG; PRABHASAWAT; LEE, 1997).

Wilshaw, em 2008, demonstrou a capacidade da MA descelularizada na adesão, proliferação e viabilidade dos queratócitos humanos e fibroblastos por um período de 4 semanas. Esta capacidade de levar células autólogas ou alogênicas até um determinado sítio torna a MA descelularizada um arcabouço capaz de auxiliar no tratamento de várias patologias como úlceras de pés diabéticos, defeitos de córnea, queimaduras de pele (WILSHAW et al, 2008).

4.4 ESTUDOS ATUAIS COM A MEMBRANA AMNIÓTICA

Leor et al (2000) descreveram a tríade da engenharia de tecidos — integração de células tronco, fatores de crescimento e sistema de entrega baseado em biomateriais.

Fukuhara et al (2005) estudaram um arcabouço de ácido poliglicólico impregnado com células de medula óssea, mostrando que o implante melhora a função cardíaca induzindo a angiogênese, provavelmente pelas células de medula óssea. O arcabouço de ácido poliglicólico foi útil como “sistema de entrega de células”.

Wilshaw et al (2006) demonstraram que o processo de descelularização removeu com sucesso os componentes celulares da MA a fresco e também não detectou DNA residual no tecido. Os principais componentes estruturais da MAH (colágeno e elastina) também estavam preservados e a presença de colágeno do

tipo IV estava localizado principalmente na membrana basal e parecia estar intacto, assim como outros componentes da membrana basal como a laminina e fibronectina.

Através de microscopia eletrônica não foi observada perda da integridade das fibras de colágeno com padrão de bandas semelhantes ao das fibras de colágeno da MAH a fresco. Demonstrando ser biocompatível e não ter efeitos adversos na proliferação ou morfologia celular (WILSHAW et al, 20006).

Miyahara et al (2006) demonstraram que, ao contrário de uma folha de células de fibroblasto, as células tronco mesenquimais em monocamadas reverteram o afinamento da parede na área da cicatriz e melhoraram a função cardíaca em ratos com infarto do miocárdio.

Ventura et al (2007) demonstraram que o transplante de células derivadas da membrana fetal da placenta para corações isquêmicos de ratos, resultou em uma redução no tamanho da cicatriz cardíaca. Também houve uma melhora na função contrátil cardíaca com menor redução da espessura da parede do ventrículo esquerdo, quando avaliada 28 dias após tratamento celular.

Simpson et al (2007) avaliaram o tecido de engenharia a partir de uma matriz de colágeno tipo I da cauda de ratos, contendo ou não células tronco mesenquimais humanas. Os enxertos foram fixados com selante de fibrina nos corações de ratos que tiveram infarto induzido. O grupo que recebeu o enxerto com células apresentou uma redução do diâmetro da cavidade ventricular esquerda na sístole e aumento da espessura de parede anterior do ventrículo esquerdo. Este efeito não foi observado no grupo que recebeu enxerto sem células tronco mesenquimais humanas.

Kim et al (2009) demonstraram que a MAHD associada com células tronco mesenquimais desempenham um papel efetivo na cicatrização de defeitos cutâneos de coelhos.

Kesting et al (2009) utilizaram a MAH criopreservada para reparação de tecidos moles em ratos, demonstrando a sua capacidade em reduzir a aderência intra-abdominal após fechamento da parede abdominal, quando comparado com malha de polipropileno.

Cargnoni et al (2009) utilizaram MAH na superfície isquêmica miocárdica induzida em ratos e mostraram efeitos protetores contra alterações induzidas pela isquemia na função contrátil e dimensões cardíacas.

No grupo MAH, os parâmetros funcionais e medidas morfológicas do ventrículo esquerdo pelo ecocardiograma, tanto na avaliação sistólica como diastólica, foram preservados em grau significativamente maior quando comparado ao grupo de ratos que não receberam MAH. Porém, estes efeitos foram observados somente até o ecocardiograma realizado com 60 dias pós IM, na avaliação com 90 dias não se observou diferenças entre o grupo MAH e grupo não tratado, com exceção da espessura da parede do ventrículo esquerdo, que permaneceu significativamente maior no grupo MAH.

Como não foram encontradas células humanas no tecido cardíaco do rato com 3 meses após o implante da MAH, sugere-se que o enxerto de células amnióticas estava ausente ou muito baixo. Portanto, os efeitos descritos provavelmente sejam pela liberação de fatores solúveis pelas células da membrana amniótica (CARGNONI et al, 2009).

Prado et al (2010) demonstraram a utilização da MAH criopreservada como suporte da proliferação de condrócitos humanos retirados de cabeça de fêmur de doadores, como terapia celular para reparar cartilagem de osteoartrite humana. A associação da MAH e condrócitos humanos cultivados produziram uma superfície mais regular, preenchendo fissuras e cavidades da cartilagem com osteoartrite.

Serpooshan et al (2013) apresentaram dados sobre a utilização de patch de colágeno tipo I compactado em camundongos infartados, apresentando melhora significativa da função cardíaca na quarta semana após o IM, avaliada por ecocardiograma. Também foi observado neo-angiogênese, diminuição de fibrose e dilatação do ventrículo esquerdo.

Brennan et al (2014) utilizaram membranas descelularizadas e esterilizadas, as colocaram em forma plana e semearam miofibroblastos humanos e células musculares lisas de aorta de rato Wistar Kyoto. Elas foram cultivadas como folhas planas por 7 dias e depois laminadas de 6 a 7 vezes em torno de um mandril de silicone de 3 mm de diâmetro; suturas estéreis foram enroladas em todo o comprimento do tecido para manter a estrutura sem desmantelamento da camadas nos primeiros dias.

Os vasos foram colocados em frascos e cobertos com 15 ml do meio D5671 Eagle modificado por Dulbecco (Sigma, Sta. Louis, MO) – MAHD e miofibroblastos humanos e D5671 de Eagle modificado por Dulbecco (Sigma, Sta. Louis, MO) – MAHD e células musculares lisas de aorta de ratos e complementado com 50 µg/ml

de L-ascorbato de sódio durante 1,2 ou 3 semanas para permitir a produção de colágeno entre as camadas.

Eles demonstraram que a MAHD fornece uma superfície biocompatível para adesão e proliferação de 2 tipos celulares de parede vascular, miofibroblastos humanos e células musculares lisas de aorta de ratos e estas lâminas de membrana plana podem ser enroladas em uma geometria tubular com células distribuídas uniformemente por toda a parede vascular.

Na presença de ascorbato de sódio, estas lâminas de membrana enroladas em construções tubulares apresentam valor de módulo de elasticidade semelhante ao dos vasos nativos. Mostrando que a MAHD é um material de arcabouço rentável e econômico para aplicações vasculares (BRENNAN; ARRIZABALAGA; NOLLERT, 2013).

Riegler et al (2014) realizaram estudo com lâminas de tecido cardíaco de coração de ratos adultos e lâminas de coração de cães neonatos (1 dia de vida) e implantou em ratos com infarto induzido. Relatam que os enxertos foram reperfundidos 3 dias após o transplante.

Avaliando a composição do enxerto após 4 semanas em lâminas de coração adulto, foi encontrado um pequeno número de cardiomiócitos, em contraste com as lâminas de coração de neonatos que mantiveram uma quantidade substancial de cardiomiócitos quando transplantados em coração infartado. Assim, estes cardiomiócitos parecem ser mais resistentes à isquemia.

Houve uma menor dilatação do VE e fração de ejeção maior no grupo que recebeu lâminas de tecido cardíaco em comparação ao grupo que recebeu lâminas de músculo esquelético (RIEGLER et al, 2014).

Malhotra et al (2014) descreveram a utilização da membrana amniótica nas patologias oftalmológicas. Nos distúrbios da superfície da córnea sem e com deficiência de células tronco de limbo, reconstrução de superfície conjuntival (pterígio, remoção de lesões maiores que não o pterígio), glaucoma, tratamento de perfurações de esclerótica, entre outras.

Gholipourmalekabadi et al (2015) testaram a capacidade de proteção da membrana amniótica a fresco e descelularizada em queimaduras contra bactérias resistentes a antibióticos que foram isoladas em pacientes queimados. Tanto a MAH a fresco como a MAHD não são capazes de proteger completamente as queimaduras contra bactérias resistentes, apesar de mostrarem uma forte atividade

bacteriana contra bactérias consideradas padrão, algumas cepas de *E. coli*, *S. aureus*, e *P. aeruginosa*.

Yuan et al (2015) avaliaram um arcabouço tridimensional de MAHD combinado com células semelhantes a hepatócitos, derivadas de células tronco de tecido adiposo humano, desenvolvendo um enxerto de tecido hepático que permitiria o enxerto de hepatócitos no fígado. A MAHD tem a capacidade de manter o fenótipo funcional das células do tipo hepatócito derivadas de células-tronco de tecido adiposo humano. Os enxertos de hepatócitos de MAHD funcionais integrados com o fígado diminuem a lesão hepática aguda induzida em camundongos.

Gholipourmalekabadi et al (2016) demonstraram a excelente biocompatibilidade e propriedades de adesão, utilizando a MAHD semeada com células tronco derivadas de tecido adiposo. Demonstraram o potencial da MAHD como sistema de entrega de células-tronco de tecido adiposo em aplicações da engenharia de tecidos.

Francisco et al (2016) demonstraram que a MAHD incorporada por nanopartículas de 15d-PGJ2 é um biomaterial com biocompatibilidade aceitável, para liberação local de anti-inflamatório e provavelmente outros medicamentos.

Roy et al (2016) compararam MAHD com MA não modificada. A MA com indução de células de transição epitelial para mesenquimal e grupo controle de ratos que não receberam MA, na região do infarto induzido. Como esperado, no grupo que não recebeu MA, houve uma diminuição da fração de ejeção, medida por cateter de pressão/condutância no vigésimo oitavo dia pós IM. A pressão sistólica e diastólica final e volume de ventrículo esquerdo estavam aumentados quando comparados com os demais grupos.

Parâmetros mais sensíveis, como dP/dt máximo e dP/dt mínimo, apresentaram melhora significativa no grupo MAHD, mas não no grupo MA não modificado ou MA com indução de células de transição epitelial para mesenquimal. Concluíram que, embora o tamanho do infarto permaneça inalterado, a MAHD ligada à superfície do ventrículo esquerdo infartado agudamente ajuda a prevenir processos de remodelamento cardíaco pós-infarto, melhorando a função sistólica e diastólica. A MA com ou sem indução de células de transição epiteliais para mesenquimais provocou uma resposta imune local que impediu uma melhora relevante na função cardíaca (ROY et al, 2016).

Francisco et al (2016) utilizaram a MAHD como substituto de pericárdio em ratos. Após retirada de pericárdio de ratos, foi realizado implante de MAHD e, no grupo controle, o pericárdio retirado foi ressuturado. Após 4 semanas, o grupo MAHD tinha uma maior espessura no tecido implantado, isso sugere uma proteção cardíaca pela membrana.

Também foi observado que células hospedeiras organizadas com fibras e capilares de tecidos foram identificadas no revestimento superficial do enxerto de MAHD, indicando que sua camada externa tornou-se bem integrada com os tecidos hospedeiros (FRANCISCO et al, 2016).

Figueiredo (2017) demonstra que a replicação *in vitro* de células epiteliais límbicas, usando o sistema de cultivo, ocorre a uma taxa mais rápida em MAHD em comparação a MAH a fresco. E que a utilização da MAHD com irradiação gama aumenta a segurança da sua utilização sem a perda de suas propriedades.

Song (2017) utilizou a MA descelularizada para reparar defeitos cutâneos profundos em ratos. A MA descelularizada acelerou e fortaleceu o processo de cura, aumentando o nível de expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que tem um papel importante na fase de proliferação para promover regeneração da pele, por neovascularização. Aliviou também a inflamação das feridas nos primeiros dias de pós-operatório, pela diminuição dos níveis de fator de crescimento e transformação beta-1 (TGF- β 1).

Castellanos et al (2017) na mesma linha de Song, relata que MA induz várias vias de sinalização envolvidas na migração e/ou na proliferação celular, pela sua atuação no TGF- β 1, promovendo a epitelização de feridas crônicas pela redução de inflamação e fibrose.

Mohan et al (2017) fazem uma revisão da aplicabilidade da MA como aloenxerto para tratar queimaduras na pele, úlceras abertas e não cicatrizantes, feridas cirúrgicas, infectadas e traumáticas. Tratamento alternativo para tratar feridas de cavidade oral, como língua, mucosa oral, palato, na reconstrução de cavidade oral, bexiga e vagina, timpanoplastia, artroplastia, como também na cicatrização mais rápida de lesões por herpes vírus simples e por herpes zoster, lesões por síndrome de Stevens-Johnson e fasceíte necrosante cervical.

A MA também foi testada na reconstrução da anquilose da articulação têmporo-mandibular e é utilizada como transportadora para liberação local de vários fármacos como, por exemplo, antibióticos e antivirais.

Mohan ainda comenta sobre as membranas amnióticas de terceira geração, como, por exemplo, aloenxertos desidratados, processados como autoadesivos, eliminando a necessidade de suturas, em cirurgias odontológicas e oftalmológicas (MOHAN; BAJAJ; GUNDAPPA, 2017).

Shakouri-Motlagh et al relataram que a membrana fetal descelularizada é promissora como superfícies para replicar e promover a maturação de células-tronco de diferentes fontes como arcabouços 2D/3D para melhorar a regeneração e como partículas de entrega de células/fármacos.

As tentativas de solubilização das membranas fetais permitirão a produção de superfícies mais uniformes para o crescimento celular e também permitirão a produção de biomateriais com propriedades mecânicas sob medida, tais como hidrogéis injetáveis. Além disso, as membranas fetais solubilizadas podem ser usadas para métodos de fabricação mais complexos, como bioprintagem (SHAKOURI-MOTLAGH et al, 2017).

Felice et al fazem uma reflexão sobre as dificuldades de encontrar a célula ideal e um arcabouço no tratamento das alterações cardíacas, citando complexidade do tecido cardíaco. A reprodução dessa complexidade exigiria a formação de vasos sanguíneos, a conexão das terminações nervosas, a participação de células do sistema imunológico, fibroblastos, células enterocromafins e cardiomiócitos do sistema de condução (FELICE et al, 2014).

Os principais biomateriais naturais utilizados no infarto são derivados de colágeno, alginato, fibrina, que são utilizados para entrega de células na região do infarto.

O quitosan é um polissacarídeo derivado de exoesqueletos de animais como crustáceos, moluscos e insetos que tem termoreversibilidade e serve para a entrega de células na área infartada.

O ácido hialurônico melhora a neovascularização em tecidos isquêmicos, os biomateriais sintéticos como Poly(glicolídeo) e poly(lactida), hidrogéis a base de PEG – Poli (N-isopropilacrilamida) e os materiais biosintéticos híbridos agem como biomateriais ativos (fatores de crescimento e peptídeos agregadores) (KAM et al, 2011).

5. 15-DEOXY- Δ 12,14-PROSTAGLANDINA J2 (15D-PGJ2)

A prostaglandina D2 sofre reações de desidratação para produzir as prostaglandinas da série J2, incluindo PGJ2, Δ 12-PGJ2 e a 15d-PGJ2.

A 15d-PGJ2 controla a expressão gênica através da interação com fatores de transcrição, principalmente proliferador de peroxisoma ativado gama (PPAR Gama) (FORMAN et al, 1995), também a proteína Kelch-like ech associated protein associada 1 (Keap1) e fator nuclear (NF) – κ B . Também tem como alvo outras proteínas, como a Ras (RENEDO et al, 2007) e Tiorredoxina (SHIBATA et al, 2003) para regular as respostas celulares independentemente das mudanças de expressão gênica.

5.115-D-PGJ2 E REMODELAMENTO CARDÍACO

No remodelamento cardíaco, como já citado anteriormente, a infiltração de neutrófilos e macrófagos mais o acúmulo de ROS dentro da área isquêmica pode levar à necrose tecidual (LEFER; GRANGER, 2000).

Agonistas do PPAR gama inibem a expressão de TNF-alfa a nível de transcrição pelo antagonismo a NF- κ B e AP-1 atividade, podendo prevenir o desenvolvimento de insuficiência cardíaca pois o TNF-alfa tem efeito inotrópico negativo nos cardiomiócitos (SMEETS et al, 2007).

A sua ação no processo inflamatório (diminuindo as citocinas e quimiocinas inflamatórias) reduz a extensão e melhora a função ventricular após a isquemia de reperfusão (SHIOMI et al, 2002).

Uma série de estudos confirmaram que o IM é acompanhado de apoptose dos miócitos e a 15d-PGJ2 atenuou os efeitos anti-apoptóticos da endotelina-1 em cardiomiócitos primários de ratos (EHARA; HASEGAWA; ONO, 2004).

Várias citocinas inflamatórias derivadas de células sanguíneas circulantes ou síntese local são indutoras da maquinaria apoptótica em cardiomiócitos. Entre estas, IL-1, IL-6 , IL-17 e TNF α , que são os mediadores mais potentes da apoptose dos cardiomiócitos e do remodelamento cardíaco (KOYANI et al, 2014).

Células endoteliais produzem 15d-PGJ2 em resposta ao fluxo sanguíneo e a 15d-PGJ2 inibe a apoptose das células endoteliais (TABATA et al, 2000). Ela é produzida por células endoteliais e mantém a homeostase vascular funcionando

como um fator anti-aterogênico, ou seja, inibindo a ativação e promovendo a diferenciação em macrófagos. Inibem a expressão de moléculas de adesão prevenindo apoptose e inibindo a proliferação e migração de células endoteliais, induzindo a diferenciação de células musculares lisas vasculares (MIWA et al, 2000).

Em estudo realizado com um agonista de PPAR gama, a Rosiglitazona demonstrou uma redução da expressão de produtos finais da glicação e do fator de crescimento de tecido conjuntivo que estão implicados na fibrose miocárdica do paciente diabético. Apresentando uma melhora no índice ecocardiográfico que avalia a disfunção diastólica de ventrículo esquerdo. Também houve uma redução no volume de colágeno avaliado pela coloração vermelha picrosirius, quando comparados ratos que foram tratados com agonista de PPAR gama *versus* os que foram tratados com solução salina (IHM et al, 2010). 15d-PGJ2, além de potente agonista de PPAR gama, também ativa PPAR alfa (o que não acontece com as glitazonas).

Wayman et al, em modelo animal (ratos), mostraram que doses baixas de 15d-PGJ2 (0,3mg/kg IV) levaram a uma redução de 85% no tamanho do infarto causado por isquemia e reperfusão regionais. A 15d-PGJ2 atenuou a elevação da troponina em 70% em ratos que tiveram a artéria descendente anterior ocluída por 25 minutos (WAYMAN et al, 2002).

Lygate et al em 2002 demonstraram que ratos que receberam o agonista de PPAR gama, rosiglitazona, entre 6 horas e 8 semanas após o IM tiveram a função de VE parcialmente preservada, mas o tratamento não impediu a dilatação ou hipertrofia de VE (LYGATE et al, 2003).

Porém, os ratos que receberam a rosiglitazona 3 dias antes até 1 ou 2 semanas após o IM, tiveram uma diminuição do tamanho do IM, apoptose e estresse oxidativo, com melhora da função cardíaca e da sobrevida, efeito este mediado provavelmente pela adiponectina (TAO et al, 2010).

Telmisartana, um bloqueador do receptor tipo I da angiotensina, é um agonista parcial do PPAR gama e quando administrado em ratos com IM, demonstrou uma melhora no remodelamento cardíaco (MAEJIMA et al, 2011).

A rosiglitazona tem efeito cardioprotetor em ratos diabéticos e não diabéticos, limitando o dano cardíaco após lesão de isquemia/reperfusão, inibindo a fosforilação da fosfatase Jun NH2 de quinase terminal (KHANDOUDI et al, 2002). Também

reduz a atividade da mieloperoxidase induzida por hipercolesterolemia, resultando em uma diminuição do tamanho do infarto (LIU et al, 2009).

Outras tiazolidinedionas como a ciglitazona e a pioglitazone também reduzem o dano no miocárdio e o tamanho do infarto (ZINGARELLI et al, 2007; YASUDA et al, 2009).

A expressão da proteína PPAR gama é principalmente em miócitos cardíacos e fibroblastos na área infartada, três semanas após o IM, sugerindo o importante papel do PPAR gama na fibrose cardíaca (FLIEGNER et al, 2008).

Os estudos sugerem que o mecanismo subjacente das várias drogas que atuam na resposta inflamatória no remodelamento cardíaco no IM são variados, porém, não há dúvidas do papel crítico que o PPAR gama desempenha na fibrose do miocárdio (HUANG-JUN et al, 2016). A 15d-PGJ2 protege contra câncer, inflamação e hipertensão, doenças do cérebro, intestino, coração e pulmões (CHARLES et al, 2011).

Clay et al, em um estudo sobre a 15d-PGJ2 atuando em células cancerígenas via PPAR, sugerem que algumas ações dependem do grau de ativação de PPAR, e que as prostaglandinas do grupo J são agonistas muito mais potentes do que as tiazolinedionas (CLAY et al, 2000).

A ativação do PPAR gama possui efeitos biológicos, não apenas em diabetes, aterosclerose, hipertensão, entre outras funções, inclui benefícios na intervenção cirúrgica cardiovascular. Reduzindo a sinalização de angiotensina II, TGF- β , apoptose, diminuindo inflamação e proliferação de células musculares lisas dos vasos (IVANOVA et al, 2015).

Estudos em animais demonstraram que a atividade de PPAR gama atenua reestenose pós-angioplastia coronariana (LIM et al, 2006).

A atividade da PPAR gama inibe a diferenciação de células progenitoras em osteoblastos e reduz o estresse oxidativo e inflamação que podem ter um papel importante na patogênese da calcificação valvar aórtica (MILLER et al, 2008).

PPAR gama, como um regulador potente do metabolismo de ácidos graxos insaturados e inibidor da inflamação, desempenha um papel importante na proteção do músculo cardíaco durante a isquemia/reperfusão e as tiazolidinedionas tiveram efeitos benéficos em modelos animais. Por outro lado, a exclusão condicional de PPAR gama nos cardiomiócitos aumentou significativamente o dano do miocárdio através da inflamação (HOBSON et al, 2014).

Os agonistas de PPAR gama influenciam várias vias metabólicas e de sinalização para reduzir a apoptose de cardiomiócitos durante a isquemia/reperfusão. Eles podem ser considerados como agentes terapêuticos potenciais para reduzir o dano miocárdico causado por condições agudas como infarto do miocárdio e intervenções cirúrgicas (IVANOVA et al, 2015).

Estudo em ratos demonstraram que a ativação de PPAR gama por dieta essencial com ácidos graxos n-3, resultou em ativação de FN- κ B suprimida e secreção reduzida de proteína quimioatática de monócitos-1 e proteína -10 interferon induzida e diminuição da expressão de receptor de quimiocina-2. Estes efeitos são benéficos contra a vasculopatia de aloenxerto cardíaco e, portanto, na rejeição crônica de transplantes cardíacos (MILLER et al, 2008).

5.2 ESTUDOS CLÍNICOS COM AGONISTAS DO PPAR GAMA

5.2.1 Iris Trial (*Pioglitazone after Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack*)

Estudo randomizado para avaliar eficácia da pioglitazona em pacientes sem história de insuficiência cardíaca (IC), que são resistentes a insulina e não diabéticos, com história recente de ataque isquêmico transitório (AIT) ou acidente vascular encefálico isquêmico (AVCI).

O grupo que recebeu pioglitazona teve taxas reduzidas de IM, AVC e morte (KERNAN et al, 2016).

5.2.2 Estudo Proactive (*Prospective Pioglitazone Clinical Trial in Macrovascular Events*)

Esse estudo comparou a pioglitazona com placebo em pacientes diabéticos tipo 2 com hemoglobina glicada (HbA1c) superior a 6,5%, na redução da incidência de complicações macrovasculares, seguimento médio de 34,5 meses.

Uma análise de subgrupo a pioglitazona reduziu a ocorrência de IM em 28%, em pacientes com história prévia de IM, porém, aumentou a incidência de edema (ERDMANN et al, 2007).

5.2.3 Record Trial (*Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes*)

Essa avaliação testou a rosiglitazona como terapia complementar em diabéticos tipo 2 não controlados com metformina/sulfanilureia. Seguimento de 5,5 anos.

Os resultados não mostraram diferença significativa entre o grupo metformina/sulfanilureia e o grupo rosiglitazona em termos de IM, AVC ou morte cardiovascular. Porém, o grupo rosiglitazona apresentou uma maior frequência de insuficiência cardíaca (HOME et al, 2009).

5.2.4 Dream Trial (*Diabetes Reduction Assessment with Ramipril and rosiglitazone Medication*)

A pesquisa avaliou se 8 mg de rosiglitazona e/ou ramipril em pacientes com tolerância a glicose alterada ou glicemia de jejum alterada, sem história de doença cardiovascular. Seguimento de 3 anos.

O grupo rosiglitazona apresentou uma redução significativa no desenvolvimento de novos casos de diabetes, com um aumento do desenvolvimento de IC quando comparado aos pacientes que receberam ramipril. Porém, pelo curto período de seguimento, conclusões sobre os efeitos cardiovasculares da rosiglitazona não puderam ser avaliados (GERSTEIN et al, 2006).

5.2.5 Act Now (*Actos Now for the Prevention of Diabetes*)

Os responsáveis por essa pesquisa avaliaram o efeito da pioglitazone na prevenção de novos casos de diabetes em pacientes com tolerância a glicose alterada, num seguimento de 2,2 anos.

A pioglitazona reduziu o risco de diabetes, aumentou os níveis de colesterol HDL e reduziu enzimas hepáticas, mas apresentaram edema e ganho de peso (DEFRONZO et al, 2011).

5.2.6 Adopt (A Diabetes Outcome Progression Trial)

Pacientes com diabetes tipo 2 recém diagnosticados para avaliar a manutenção do controle glicêmico comparando três medicamentos, rosiglitazona, metformina e gliburida por um seguimento de 5 anos.

Ademais, houve falha da monoterapia com níveis glicêmicos de jejum superiores a 100 mg/dl, após 6 semanas de tratamento, foi observada em menor número no grupo que fez uso de Rosiglitazona, porém, foi associado ao aumento de peso e edema (KAHN et al, 2006).

A meta-análise de ensaios controlados com a pioglitazona mostram uma redução no risco de IM, AVC ou morte em paciente com diabetes tipo 2 (LINCO, 2007).

A meta-análise com a rosiglitazona apresenta uma associação com risco aumentado de IM, embora a mortalidade ainda seja baixa (NISSEN; WOLSKI, 2010).

A Rosiglitazona, mas não a pioglitazona, induziu hipertrofia miocárdica por uma via não PPAR gama mediada (DUAN et al, 2005).

A Pioglitazona suprime a ativação de NF-kB e a expressão de células vasculares de adesão molecular - 1 (VCAM-1) por uma via PPAR alfa dependente. Pode induzir angiogênese, modulando a mobilização e função das células progenitoras endoteliais (ORASANU et al, 2008; WERNER et al, 2007).

6 ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

Laercio Uemura², Julio César Francisco ^{1,3}, Rossana Baggio Simeoni², Ricardo Correa Cunha³, Jose Rocha Faria-Neto², Bassam Felipe Mogharbel⁴, Marcelo Henrique Napimoga⁵, Leonardo Fernandes Fraceto⁶, Katherine Athayde T Carvalho⁴, Luiz Felipe Pinho Moreira¹ and Luiz Cesar Guarita-Souza².

1 Laboratory of Cardiovascular Surgery and Pathophysiology of Circulation, Heart Institute (Incor), Department of Cardiopneumology, Sao Paulo University Medical School, Sao Paulo, Brazil.

2 Experimental Laboratory of Institute of Biological and Health Sciences of Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR), Rua Imaculada Conceição 1155, 80215-901 Curitiba, PR, Brazil.

3 Graduate Program in Biomedical Engineering of Universidade Tecnológica Federal do Paraná, – Curitiba – Paraná – Brasil, Av. Sete de Setembro, 3165, Curitiba, PR, Brazil.

4 Cell Therapy and Biotechnology in Regenerative Medicine Research Group, Pelé Pequeno Príncipe Institute, Avenida Silva Jardim 1632, 80250-200 Curitiba, PR, Brazil

5 Laboratory of Immunology and Molecular Biology, São Leopoldo Mandic Institute and Researcher Center, Campinas, Brazil.

6 Department of Environmental Engineering, São Paulo State University (UNESP), Sorocaba, Brazil.

Total Word Count: 4634

ACELLULAR HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE SCAFFOLD WITH 15D-PGJ2
NANOPARTICLES INCREASE A CARDIAC FUNCTION FROM IN A RAT MODEL
OF POST-INFARCT VENTRICULAR DYSFUNCTION

BACKGROUND

Acellular human amniotic membrane scaffold (AHAS) has on your growth factors that stimulate tissue regeneration structures. The 15d-PGJ2 is an agonist of PPAR γ featuring anti-inflammatory. The objective of this study is to compare the

efficacy of AHAS loaded with 15d-PGJ2 in improving ventricular function in a rat model of post-infarct ventricular dysfunction.

Methods: Myocardial infarction was induced in 24 rats by left coronary occlusion. After a week, the animals were subjected to echocardiography for evaluation of left ventricle ejection fraction (LVEF), left ventricle end diastolic volume (LVED) and left ventricle end systolic volume (LVES). Animals with ejection fraction lower than 40% were included in the study and were randomized into three groups: control (n=8), AHAS (n=8) and AHAS + 15d-PGJ2 (n=8). In the AHAS group was implanted the membrane only and in the AHAS + 15d-PGJ2 was implanted de membrane +15d-PGJ2 on myocardial infarction. Echocardiographic evaluation was performed after 1 month. For histological analysis, heart tissue was stained with Masson's, Sirius Red, the the antibody against CD31, connexin 43.

Results: There were no significant differences in the baseline LVEF, LVED, and LVES in all groups. After 1 month, ejection fraction decreased in the control group and increase AHAS group and in AHAS +15d-PGJ2 group in comparison to control group. The LVED and LVES in AHAS and AHAS + 15d-PGJ2 groups decreased compared to the control group, featuring a ventricular anti-remodeling effect. Histopathology the infarcted area identified the reduction of infarct size and collagen type 1 in the AHAS and AHAS + 15d-PGJ2 groups. New blood vessels and cardiomyocytes have been identified in an infarcted area by CD31 and connexin 43.

Conclusion: AHAS + 15d-PGJ2 provided an increase in the ejection fraction and prevented ventricular dilation in this post-infarction ventricular dysfunction model.

Keywords: PPAR- γ , 15d-PGJ2, heart, myocardial infarction, anti-inflammatory

Cardiovascular disease (CVD) remains one of the main causes of deaths worldwide [1]. Cardiac dysfunction has been associated with poor prognosis in patients after acute myocardial infarction (AMI). Therefore, it is of great importance the biomaterials development to stop the mechanisms underlying cardiac dysfunction that involve complicated interactions among cardiomyocytes, inflammatory cells, fibroblasts and to explore new measures that can prevent the progression of the pathological process [3].

Several biomaterials have been used as scaffolds for study in vitro and in vivo, with potential use in tissue engineering [4]. Acellular human membrane scaffold (AHAS) is considered to be an important potential source of scaffolding material owing to its biocompatibility [5, 6].

The 15d-PGJ2 is known as the final dehydration product of PGD2, acted as a natural agonist of peroxisome-proliferator activated receptor (PPAR- γ), is a key regulator of diverse and important physiological processes, such as cardiovascular dysfunction, blood pressure regulation, adipogenesis, and metabolic homeostasis and inflammatory processes [7, 8]. Studies describe that (15d-PGJ2) can repress inflammatory infiltrate in skeletal muscle and repress active macrophages from *T. cruzi*-infected mice and that this repression is partially dependent on PPAR- γ expression [7].

The objective of this study is to compare the efficacy of AHAS loaded with 15d-PGJ2 in improving ventricular function in a rat model of post-infarct ventricular dysfunction.

METHODS

Nanoencapsulation of 15d-PGJ2 in poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanocapsules (15d-PGJ2-NC) was provided from Laboratory of Immunology and Molecular Biology, São Leopoldo Mandic Institute and Research Center.

The 15d-PGJ2-NC were prepared by the nanoprecipitation method, as described by Fessi et al [9]. The organic phase consisted of PLGA polymer (100 mg), acetone (30 ml), 15d-PGJ2 (100 μ g; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), sorbitan monostearate (40 mg), and caprylic/capric acid triglyceride (200 mg). The aqueous phase was composed of polysorbate 80 (60 mg) and deionized water (30 ml). After the dissolution of the components of both phases, the organic phase was gradually added to the aqueous phase, and the suspension was maintained under agitation for 10 min. The solvent (acetone) was removed by evaporation, and the suspension was concentrated to a volume of 10 ml under low pressure, using a rotary evaporator, to obtain a suspension of 15d-PGJ2 with a final concentration of 10 μ g/ml. After evaporation, no traces of acetone were observed in the formulation (data not shown). A control formulation (without 15d-PGJ2) was also prepared, following the methodology described above.

Preparation acellular human amniotic scaffold

The study was approved by the Hospital Pequeno Príncipe Ethical Committee for the use of biological material for research purposes approved under number 0948-11. All materials were used in compliance with ethical guidelines by the Brazilian National Health Council. Fresh human amniotic membrane (HAM) was

obtained after caesarian deliveries. Maternal donors provided informed consent and were serologically negative for HIV, hepatitis B, hepatitis C, and syphilis. Briefly, blood clots were immediately cleaned off the placenta after surgery with phosphate buffered saline (PBS) solution containing 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin. The AHAS was prepared as described by Riau et al., [5]. Part of the human HAM was then deprived of amniotic epithelial cells to obtain AHAS by sodium dodecyl sulphate in PBS, and incubated with shaking rate of 100rpm at 37°C for 24 h. Finally, the prepared AHAS was rewashed 3 times with PBS.

Culture and seeding of mesenchymal cells with 15d-PGJ2 nanoparticle

Mesenchymal cells (MSCs) were isolated through bone marrow aspiration of the posterosuperior iliac crest of Wistar rats [10]. Mesenchymal cells were cultured for 7 days in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Invitrogen) supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum, Invitrogen) and 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin at 37°C with 5% CO₂. The culture medium was changed every 2 days. The mesenchymal cells were seeded on a plastic plate with 15d-PGJ2-NP in a concentration of 10 µg/mL for 24 h in order to incorporate the nanoparticles to the AHAS.

Cell proliferation assay

One aliquot of the culture media containing 1×10⁴ cm² Mesenchymal cells with nanoparticle was cultured on the membrane surface in 6-well plates. The plates were incubated in standard cell culture conditions at 37°C and 5% CO₂ for distinct days. Subsequently, 100µl of 5mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (final concentration, 0.5mg/ml) was added to the wells, and the cells were incubated in CO₂ incubators for 1,3,7 and 10 days. The supernatant was used for analysis by spectrophotometry reader in 595 and 630 nm [11].

SCANNING ELECTRON MICROSCOPE (SEM)

The morphology and structure of the acellular human amniotic scaffold (AHAS) with 15d-PGJ2-NC (AHAS-NC) were examined in a JEOL 1200EX II microscope (Jeol Ltda, Akishima) operating at 80 kV. In order to perform the SEM analysis, the AHAS-NC was fixed on a top coverslip, dried, mounted on a stub for SEM, fixed in 2.5% (v/v) glutaraldehyde (Sigma-Aldrich) in PBS and post-fixed with 1% (v/v) and 0.1 M sodium cacodylate trihydrate (Sigma-Aldrich).

Experimental profile

Myocardial infarction and Echocardiographic analysis

All experiments were performed in the cell therapy laboratory of PUCPR according to the “Guidelines for the Care of Animals” the guiding principles approved by the American Society of Physiology. Wistar rats with weights of from 250 to 300 grams were intraperitoneally anesthetized using 50 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine. The animals were submitted to endotracheal intubation, without exposure of the trachea and to mechanical ventilation at a frequency of 60 cycles/ min and a volume of 2.5 mL (“683” Harvard® Apparatus, Inc., USA). All animals were submitted to left lateral thoracotomy and ligation of the left coronary artery with 7.0 polypropylene thread (Ethicon®, Inc., Somerville, NJ) was achieved inducing infarction of the left ventricle anterolateral wall. The detailed operation procedure was previously described by Guo-Zhong Pan et.al [12]. The mortality rate of the animals submitted to this procedure was 20%.

Seven days after myocardium infarction, the animals were again submitted to anesthesia using 50 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine intraperitoneally and a bidimensional transthoracic echocardiographic evaluation was made [Hewlett Packard Sonos model 5500, with S12sectorial (5-12 MHz) and 15L6 linear (7-15MHz) transducers], allowing an analysis of up to 160 Hz, developed for the ultrasonographic study of small animals. The transducer was placed in the left anterolateral portion of the thorax and the heart was imaged as a bidimensional axial view of the left ventricle with the mitral and aortic valves and the apex in the same image. The digital conversion of the image was obtained by a delimitation of the interventricular septum and the left ventricle posterior wall. Subsequently, the following measurements were taken: final systolic and diastolic surfaces, final diastolic and systolic lengths of the left ventricle and heart rate to calculate the final systolic volumes (LVFSV, mL) and diastolic volumes (LVFDV, mL) and the left ventricle ejection fraction (LVEF %) were calculated using Simpson’s method. All the dimensions were blindly measured three times by the same echocardiologist, after which the mean of each parameter was calculated.

Only animals with left ventricle ejection fractions of less than 40% were included in this study and were randomized into three groups: control, AHAS, and AHAS+15d-PGJ2. (groups consisting of eight animals each).

In the AHAS group was implanted the scaffold only and in the AHAS+15d-PGJ2 group was implanted de scaffold+15d-PGJ2 nanoparticles on myocardial infarction, on the anterolateral wall of the left ventricle (Fig. 01).

Control rats underwent sham operations were carried out by the same method, but without the implantation of the amniotic membrane. All rats received perioperative analgesia after surgery.

A new echocardiographic evaluation was performed after 1-month scaffold implantation.

HISTOLOGICAL ANALYSIS

The hearts were removed and fixed in 10% phosphate-buffered formaldehyde. Specimens were embedded in paraffin blocks, sectioned at 5 μ m-thick slices (four sections per sample), stained with trichrome and examined under a light microscope. These sections were subjected to Masson's trichrome staining. Digital images for epicardial and endocardial circumferences, areas, LV free wall, and infarct size were captured by Zeiss Axiovert S100 TV microscope (Zeiss, Jena, Germany) and Image Tool 2.0 (UTHSCSA, San Antonio, TX, USA). The infarct size in each heart was calculated as the percentage of infarct scar relative to the outer circumference of the LV free wall with collagen Sirius Red-positive. The fixed tissues were sectioned and stained with antibodies mouse primary antibody against CD31 (ab64543, 1:100, Abcam) to facilitate the quantification of vascular density in the border zone, with secondary antibodies of anti-rabbit Rhodamine (31665; 1/ 1:200, Thermo Fisher Scientific) and Connexin 43, the rabbit polyclonal anti-C $\times$ 43 antibody (Zymed Lab. Inc. USA, Lot. No. 30476831) utilized to quantify the connexons was used at dilutions of 1:200 as the primary antibody and goat anti-rabbit IgG (Molecular PROBE, USA, Alexa Fluor 488, Lot. No. 35068A). Finally, sections were incubated with DAPI mounting medium to provide nuclear staining, (5 mL/section, DAPI H-1200, Vectashield). Negative controls were obtained from sections that were stained with secondary antibody only. The number of vessels per high-power field was counted by two blinded observers in five fields per slide; the mean of vessels/field was used for subsequent analysis.

STATISTICAL ANALYSIS

Data are expressed as the mean $\pm$ SD or SEM. Differences were statistically analyzed by ANOVA followed by post hoc Bonferroni's multiple comparison tests. Differences between the two groups were analyzed with using an unpaired t-test. Any P value less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Effects of 15d-PGJ2 on MSCs (in vitro).

To investigate the effects of 15d-PGJ2 induced cell death, MTT assays were applied. The results showed that treatment with 10 μ M 15d-PGJ2 no reduced significantly cell death respectively, compared with untreated 15d-PGJ2 cells (Fig. 02).

Acellular human amniotic scaffold analysis (in vitro).

Images of phase contrast of decellularized human amniotic membrane scaffolds (Fig.3 A). Morphological rearrangement of cell 24h post-incubated with 15d-PGJ2 nanoparticles. (Fig.3B). Electronic scanning microscopy (SEM) examination of the structure of the scaffolds showed that the migration and ingrowth of seeded mesenchymal cells and formation of homogeneous spherical aggregates on cultured after 24 h (Fig. 3C/D).

Echocardiographic analysis

Analysis of the groups separately

With respect to the baseline values, there was no statistical difference in all animals studied, in the parameters of LVEF, LVES, and LVED. In this way, the groups were considered homogeneous.

One month after scaffold implantation, the LVEF presented a significant decrease in the control group (33.13 ± 2.75 to $28.13 \pm 3.8\%$; p-value = 0.0083), increase in AHAS group ($35.38 \pm 2.67\%$ to $38.88 \pm 4.29\%$; p-value = 0.0820) and significant increase in AHAS + 15d-PGJ2 group ($33.5 \pm 5.07\%$ to $38.88 \pm 3.14\%$; p-value = 0.0046).

The LVES over the same time interval gave increases in the control group (0.305 ± 0.178 mL to 0.380 ± 0.182 mL; p= 0.8546). In the AHAS and AHAS + 15d-

PGJ2 groups decrease (0.168 ± 0.039 mL to 0.161 ± 0.052 mL; $p > 0.9999$ and 0.290 ± 0.143 mL to 0.179 ± 0.063 mL; $p = 0.3567$, respectively).

The LVED over the same time interval gave significant increases in the control group (0.350 ± 0.362 mL to 0.569 ± 0.274 mL; $p = 0.0079$), stabilized in AHAS group (0.260 ± 0.058 mL to 0.262 ± 0.074 mL; $p > 0.9999$) and decrease in AHAS +15d-PGJ2 group (0.418 ± 0.19 mL to 0.292 ± 0.094 mL; $p = 0.1857$) (Table 1).

Analysis among groups

After one month from scaffold implantation, statistical differences were identified in respect to the LVEF among the control vs AHAS groups ($p < 0.0001$) and control vs AHAS+15d-PGJ2 groups ($p < 0.0001$). Any difference between the AHAS and AHAS+15d-PGJ2 groups was identified.

In respect to the LVES statistical differences were identified among the control vs AHAS and control vs AHAS+15d-PGJ2 groups ($p = 0.0072$ and $p = 0.0154$, respectively). Any difference between the AHAS and AHAS+15d-PGJ2 groups was identified.

In respect to the LVED, differences were identified among the control vs AHAS and control vs AHAS+15d-PGJ2 groups ($p = 0.0020$ and $p = 0.0056$, respectively). Any difference between the AHAS and AHAS+15d-PGJ2 groups was identified (Figure 04).

Histology

Serial sections of Masson's trichrome-stained sections were analyzed to determine infarct size, denoted as a percentage of the cross section. The infarct size was less in AHAS+15d-PGJ2 (34.04 ± 6.62), than AHAS (46.63 ± 10.42) and control (64.59 ± 2.84) groups respectively; $P < 0.001$). (Figure 05).

Serial sections of Sirius red stained sections were analyzed to determine collagen. The collagen type I (content index) was less in AHAS+15d-PGJ2 ($32.7 \pm 5.3\%$) than compared to AHAS ($98.68 \pm 7.4\%$) and the control groups ($166.8 \pm 11.2\%$) $P < 0.001$. (Figure 06).

CD 31 and Connexin 43

Differences were observed in myocardial antibody CD31(vessels) and Connexin 43 (Gap junction) concentration between groups, but when compared with

control, there was an increase of concentration in AHAS and AHAS + 15d-PGJ2 groups, respectively.(Figure 07).

Discussion

The treatment for the cardiovascular diseases is one of the core targets of new medicine regenerative. Previous experimental studies performed on cardiac ischemia models have so far been aimed at investigating the efficacy of cell therapy on cardiac repair by using different cell types including bone marrow derived cells [26], skeletal myoblasts [27] and fetal cardiomyocytes [28]. However, the results are still conflicting with relation to the type of cell to be used and in which research model, especially when we seek the transmural fibrosis regeneration.

Some studies with skeletal myoblasts suggest recolonization with new muscle fibers however without integration with the native myocardium[16], while bone marrow stem cells feature integration with the native myocardium, but with little ability to regenerate from the myocardial fibrosis[13].

The main goal of scaffold implantation in the infarcted myocardium is the colonization of the fibrotic region with new contractile cells to recover the left ventricle contractile function. It has recently been shown that transplantation of placental fetal membrane delivered cells into ischemic rat hearts results in a reduction in cardiac scar size as well as an improvement in cardiac contractile function with less reduction of left ventricle wall thickness [26, 17].

In present study was used AHAS+15d-PGJ2 cultivated with cells as a biomaterial model because it is a biocompatible material that has been intensively investigated in ophthalmology, dermatology and reconstructive surgery [16]. It has been well known that preserve different intrinsic factors growth promotes differentiation, and prevent apoptosis in the heart [18].

In a model of chronic myocardial infarction with pre-established fibrosis, was demonstrated that AHAS+15d-PGJ2 provide cardioprotection against myocardial infarction by reducing cardiac dysfunction.

The data identified with increasing the ejection fraction in AHAS+15d-PGJ2 group was satisfactory, however, what seemed more interesting was the ventricular anti-remodeling effect. It was also identified by Cargnoni et al 2009[26] and Fang et al 2012[18].

In other studies related to myocardial tissue regeneration, therapy using bone marrow cells, fetal cardiomyocytes and skeletal myoblasts in the same model of transmural myocardial fibrosis, the therapeutic result not reduced the ventricular remodeling [13-15], very different from what was identified in the present study, with a clear preservation of ventricular dilatation.

This finding can be justified by some considerations: - usually the studies with cell therapy injected cells in the anterior wall of the left ventricle, different of this model because the membrane was deployed on the anterolateral wall of the left ventricle; another justification for interesting anti-remodeling effect, may be related to form of delivery of stem cells, because due to the great loss of cells at the time of the cell implant, the amniotic membrane will eventually settle for more time on the site; and cardioprotective effects in the ischemic heart, probably via paracrine mechanisms.

On the other hand, therapy with bone marrow cells and myoblasts cells in chronic myocardial infarction did not exert the anti-remodeling effect, probably because of the lack of ability of regeneration of cardiac myocytes and only blood vessels by the stem cells by the lack of integration of myoblasts with myocardial tissue native [19].

Interesting data have been identified on histology, as it was observed a decreased size of the infarcted area, a reduction the amount of collagen type I, the presence of new cardiomyocytes and blood vessels in the myocardial fibrosis, the region where the scaffolds with nanoparticles were implanted, in the AHAS+15d-PGJ2 group.

Thus, to better understand the beneficial effects exerted by AHAS+15d-PGJ2, was demonstrated that AHAS is non-toxic for cardiomyocytes and can be incorporated into the heart tissue over the time, what might be characterized by positive connexina 43 identified in the myocardium infarcted. The acellular human membrane scaffold preserves growth factors and other proteins that maintain the alignment of collagen fibers and could release paracrine factors like that promote vascular endothelial differentiation, prevent the apoptosis, which has been shown in other studies [17]. Another important consideration is related that decellularized amniotic membrane has been shown to possess the same elasticity and tensile strength in vitro [20, 21].

Localized support of the dilating left ventricle may inhibit remodeling processes, appears to have the appropriate characteristics to prevent LV dilatation without.

When compared AHAS and AHAS+15d-PGJ2 groups no difference between them was identified in any of the parameters echocardiographic, however, was identified a greater difference of LVEF between their respective values of 1 month when compared to baseline values (3.5% in AHAS and 5.38% in AHAS+15d-PGJ2). These findings suggest that the anti-inflammatory effect of nanoparticles may have contributed to the functional benefit in this group.

It has been reported before that amniotic membrane, are able to release cytokines that have potent anti-inflammatory effects (interleukin-10 and interleukin-6)[22].

The nanoparticles are local reservoirs for the release of anti-inflammatory for the recruitment of host endothelial cells and provide tissue regeneration. This finding may be due to low administered dose of 15d-PGJ2 according to the finding of de Melo et al [23].

In this study the scaffolds adhered well to the heart with electrical conductance of the gap junction, how was it possible to be proven with the markup of connexin 43, and the implanted nanoparticles provide a base for the development of new vessels that connected the underlying myocardium and the construct and reverse remodeling, which has been verified a general recovery of cardiac function after myocardial infarction.

The use of amniotic membrane as a treatment for myocardial fibrosis offers the advantages of being in plentiful supply and applicable immediately without the need for any cell isolation, culture process, which makes it a low-cost approach; in addition, amniotic membrane has good preservability [24] and is immunologically tolerated [25].

The present study reports a novel way to deliver acellular amniotic membrane scaffold carrying nanoparticles loaded with 15d-PGJ2 on preventing myocardial dysfunction.

CONCLUSION

In summary, we evaluated the therapeutic effect of acellular membrane scaffold isolated and carrying nanoparticles of 15d-PGJ2 on infarcted myocardium by

enhancing angiogenesis, reducing myocardial fibrosis, the proliferation of cardiomyocytes and as a result increasing the ejection fraction of the left ventricle with preservation of ventricular dilatation.

STUDY LIMITATION

The fact of having been used a heterologous graft, (human acellular amniotic membrane) can eventually cause some kind of immunologic reaction.

REFERENCES

1. Go, A.S., et al., Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 2014. 129(3): p. e28-e292.
3. Gao, D.F., et al., Rosiglitazone inhibits angiotensin II-induced CTGF expression in vascular smooth muscle cells - role of PPAR-gamma in vascular fibrosis. *Biochem Pharmacol*, 2007. 73(2): p. 185-97.
4. Francisco, J.C., et al., Decellularized Amniotic Membrane Scaffold as a Pericardial Substitute: An In Vivo Study. *Transplant Proc*, 2016. 48(8): p. 2845-2849.
5. Riau, A.K., et al., Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials*, 2010. 31(2): p. 216-25.
6. Gris, O., et al., Amniotic membrane transplantation for ocular surface pathology: long-term results. *Transplant Proc*, 2003. 35(5): p. 2031-5.
7. Rodrigues, W.F., et al., 15d-PGJ(2) modulates acute immune responses to *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2010. 105(2): p. 137-43.
8. Sakamoto, A., et al., Pioglitazone ameliorates systolic and diastolic cardiac dysfunction in rat model of angiotensin II-induced hypertension. *Int J Cardiol*, 2013. 167(2): p. 409-15.
9. Fessi H., F.P., J. P. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita., Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. . *Int. J. Pharm.*, 1989(55): p. R1–R4.
10. Carvalho, K.A., 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(5): p. 1596-602.

11. Oliveira Barud, H.G., et al., Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration. *Carbohydr Polym*, 2015. 128: p. 41-51.
12. Pan, G.Z., et al., The Impact of Different Plasma Glucose Levels on Heart Rate in Experimental Rats With Acute Myocardial Infarction. *Cardiol Res*, 2016. 7(4): p. 146-151.
13. Guarita-Souza, L.C., et al., Functional outcome of bone marrow stem cells: mononuclear versus mesenchymal stem cells after cellular therapy in myocardial scar in Wistar rats. *Transplant Proc*, 2006. 38(6): p. 1953-4.
14. Menasche, P., et al., Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*, 2003. 41(7): p. 1078-83.
15. Scorsin, M., et al., Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000. 119(6): p. 1169-75.
16. Ghostine, S., et al., Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation*, 2002. 106(12 Suppl 1): p. I131-6.
17. Roy, R., et al., Decellularized amniotic membrane attenuates postinfarct left ventricular remodeling. *J Surg Res*, 2016. 200(2): p. 409-19.
18. Fang, C.H., et al., In vivo differentiation of human amniotic epithelial cells into cardiomyocyte-like cells and cell transplantation effect on myocardial infarction in rats: comparison with cord blood and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*, 2012. 21(8): p. 1687-96.
19. Guarita-Souza, L.C., et al., Cell transplantation: differential effects of myoblasts and mesenchymal stem cells. *Int J Cardiol*, 2006. 111(3): p. 423-9.
20. Wilshaw, S.P., et al., Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. *Tissue Eng*, 2006. 12(8): p. 2117-29.
21. Sanluis-Verdes, A., et al., Production of an acellular matrix from amniotic membrane for the synthesis of a human skin equivalent. *Cell Tissue Bank*, 2015. 16(3): p. 411-23.
22. Denison, F.C., et al., Cytokine secretion by human fetal membranes, decidua and placenta at term. *Hum Reprod*, 1998. 13(12): p. 3560-5.

23. de Melo, N.F., et al., 15d-PGJ2-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Physicochemical Characterization and Evaluation of Pharmacological Effects on Inflammation. PLoS One, 2016. 11(8): p. e0161796.
24. Hennerbichler, S., et al., The influence of various storage conditions on cell viability in amniotic membrane. Cell Tissue Bank, 2007. 8(1): p. 1-8.
25. Bailo, M., et al., Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. Transplantation, 2004. 78(10): p. 1439-48.
26. Cargnoni A, Di Marcello M, Campagnol M, Nassuato C, Albertini A, Parolini O. Amniotic membrane patching promotes ischemic rat heart repair. Cell Transplant. 2009;18(10):1147-59.

Table 01. Intra-group comparison of the echocardiography values at the evolution with paired simple, 7 days and 1 month in rat group.

Echocardiographic parameters		n	Control	AHAS	AHAS+15dpgj
LVED (ml)	7	8	0,350±0,362	0,260±0,058	0,418±0,19
	1m	8	0,569±0,274	0,262±0,074	0,292±0,094
			P=0,0079	P>0.9999	P=1857
LVES* (ml)	7	8	0,305±0,178	0,168±0,039	0,290±0,143
	1m	8	0,380±0,182	0,161±0,052	0,179±0,063
			P=0.8546	p>0,9999	P=0,3567
LVEF* (%)	7	8	33,13±2,75	35,38±2,67	33,50±5,07
	1m	8	28,13±3.8	38,88±4,29	38,88±3,14
			P=0,0083	P=0.0820	P=0.0046

Summary data of echocardiographic measurements in each group of animals. Data are expressed as the mean ± standard deviation P<0.001. AHAS (acellular human amniotic membrane scaffold) + 15dpgj group; LVED, left ventricular end-diastolic; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVES, left ventricular end-systolic. ure 01



Figure 01 – Intraoperative view of the mouse heart via sternotomy. The LAD has been ligated with a 7.0 prolene suture, which has also been used to attach the AHAS+ 15dPGJ patch.

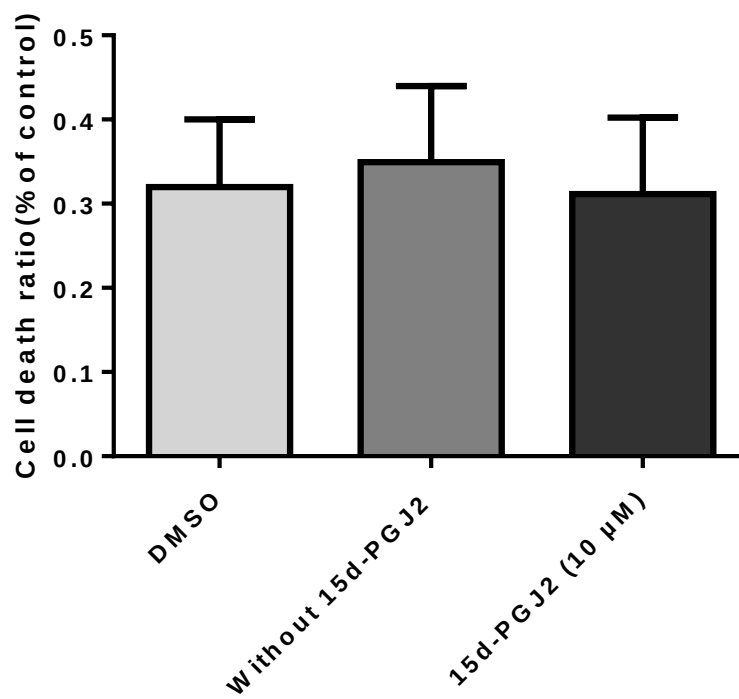


Figure 02 – The effect of 15d-PGJ2 on the viability of mesenchymal cells. Mesenchymal cells were treated with DMSO at a concentration of 10μM of 15d-PGJ2 for 24h and the survival rate was analyzed using an MTT test. $P < 0.05$ compared with the control group.

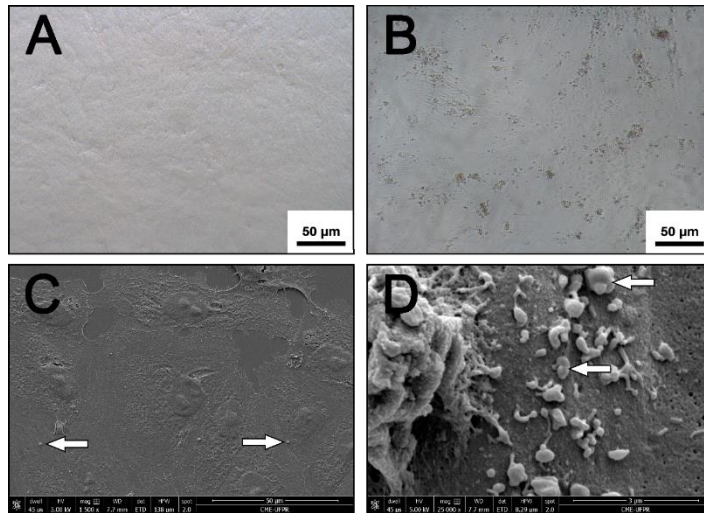
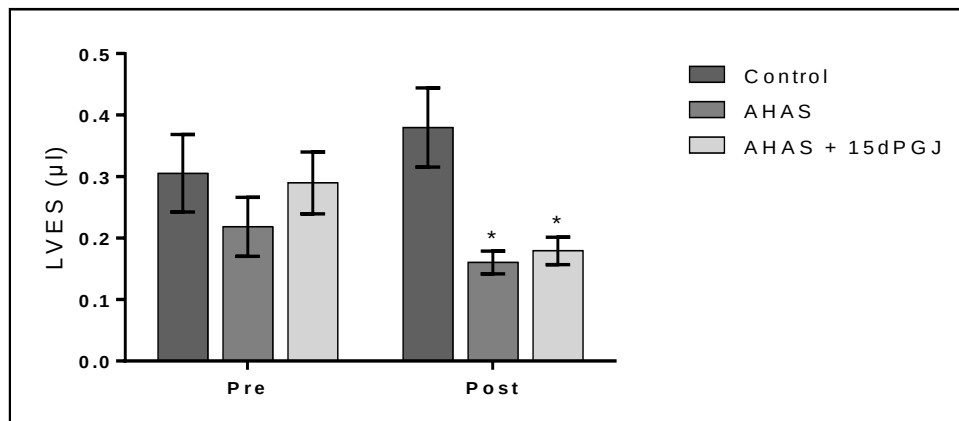
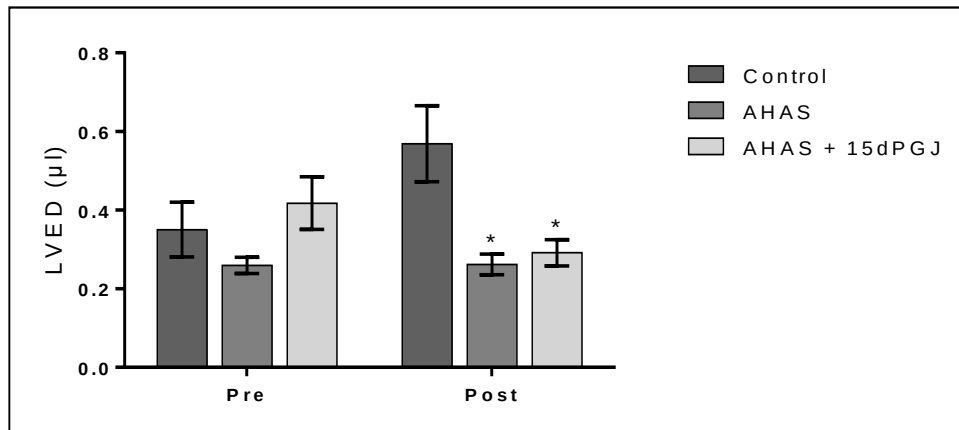


Figure 03 – Phase contrast images of the acellular amniotic membrane(A) and morphological rearrangement of cell 24h post-incubated with 15d-PGJ2 nanoparticles (B). Homogeneous spherical aggregates on acellular amniotic membrane[arrow](SEM)(C)(3500x). Images of mesenchymal stem cells on acellular amniotic membranes cultured after 24 h Cells on amniotic membrane and nanoparticles with cells on membranes[arrow](SEM)(D)(13500x). The bar scale is 50 μm.



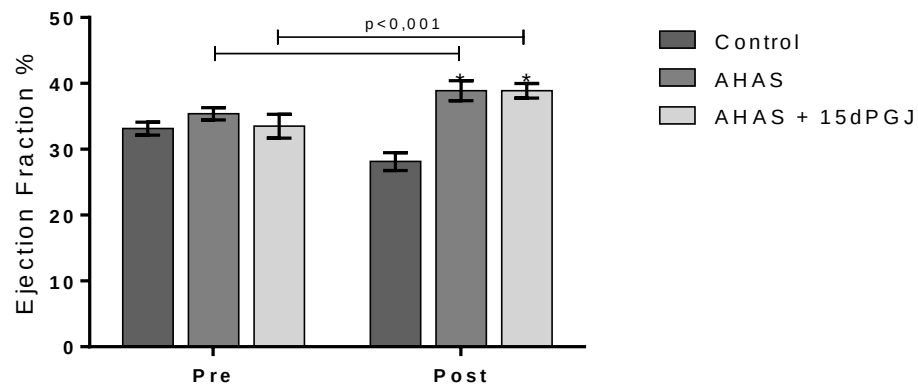


Figure 04 – Analysis among groups

Summary data of echocardiographic measurements among groups in different periods. (baseline vs 1 month).

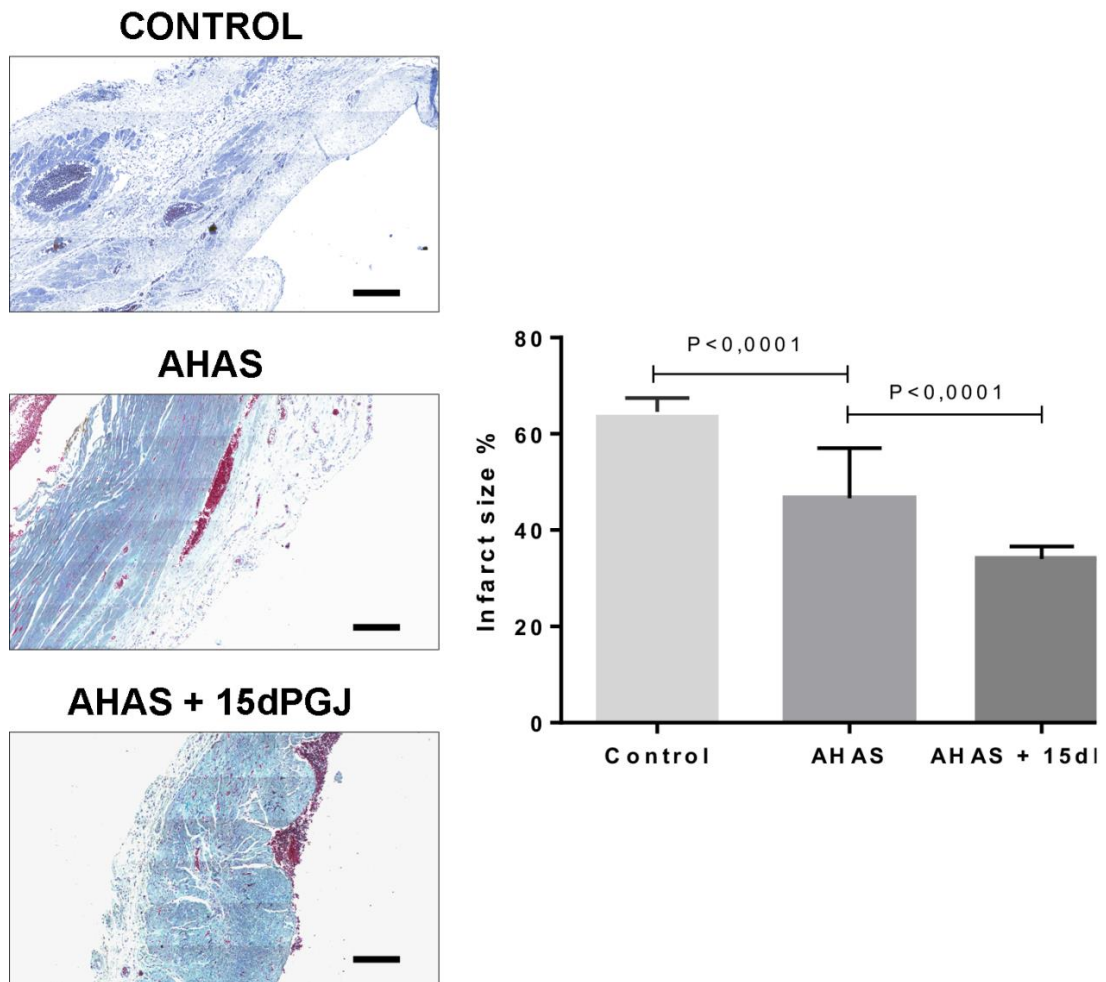


Figure 05 – Representative Masson's trichrome stained heart sections obtained from hearts 1m after surgery. Scar tissue is identified by blue. Quantitative analysis of infarct size.

P < 0.001 when compared to the Control, AHAS and AHAS + 15dpgj groups. Scale bars, 50 μ m.

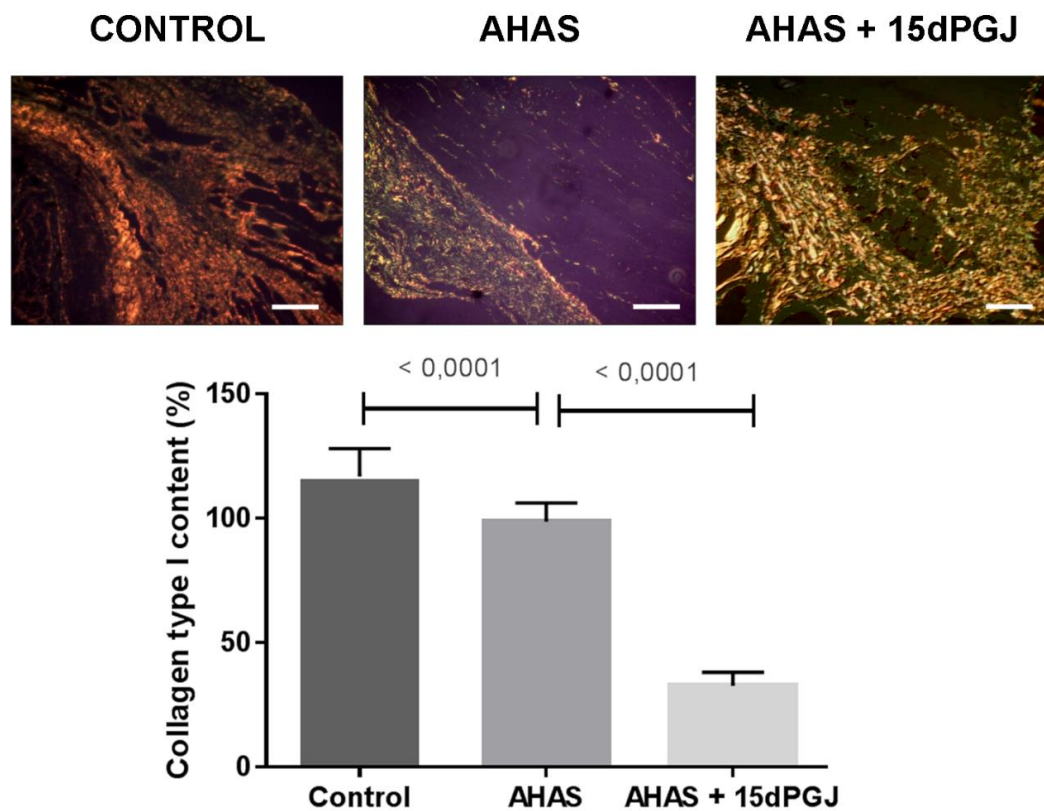


Figure 06 – Images from Sirius red staining were obtained with circularly polarized light. Collagen type I (red fibers) was more predominant in the scar from animals treated with AHAS + 15dPGJ than with collagen type III (green fibers). Scale bars, 50 μ m. $P < 0.001$ when compared to the Control, AHAS and AHAS + 15dpgj groups.

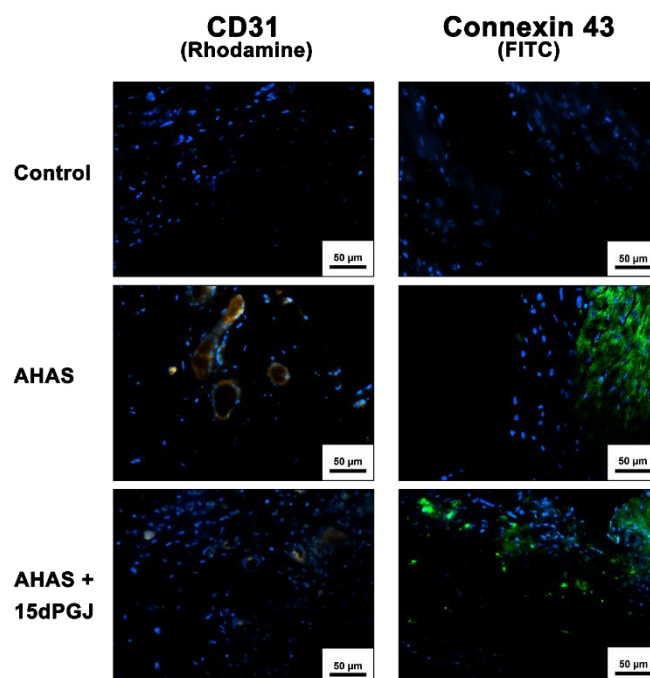


Figure 07 – Control group negative for CD31 and Connexin 43. AHAS and AHAS + 15dPGJ groups positive for CD31 antibody and Connexin 43(expressed gap junction formation and DAPI-stained blue nuclei). The bar scale is 50 μ m.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo confirma o potencial da MAHD como arcabouço para prevenção de disfunção miocárdica, assim como apresenta uma nova maneira de fornecer nanopartículas. Procurou-se confirmar também que a associação destas nanopartículas de 15d-PGJ2 com a MAHD foi capaz de atenuar o remodelamento cardíaco.

Ademais, o efeito terapêutico da membrana amniótica humana descelularizada isolada e transportando nanopartículas de 15d-PGJ2 no miocárdio infartado promoveu angiogênese, proliferação de cardiomiócitos e reduziu fibrose miocárdica. Essa atuação resultou num aumento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo com atenuação no remodelamento cardíaco. Demonstrando ser uma estratégia eficaz para a medicina regenerativa.

Ressalta-se como limitação do estudo que a utilização de um enxerto heterólogo (membrana amniótica humana descelularizada) pode eventualmente causar algum tipo de reação imunológica.

REFERÊNCIAS

- AKLE, C. A. et al. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. **Lancet**, n. 2, p. 1003-1005, 1981.
- ALBUQUERQUE D. C. et al. I Brazilian Registry of Heart Failure - Clinical Aspects, Care Quality and Hospitalization Outcomes. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, n. 104, p. 433-442, 2015.
- ASSMUS B. et al. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. **New England Journal of Medicine**, n. 355, p. 1222-1232, 2006.
- ASSMUS B. et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). **Circulation**, n. 106, p. 3009-3017, 2002.
- AWADA H. K.; HWANG M. P.; WANG Y. Towards comprehensive cardiac repair and regeneration after myocardial infarction: Aspects to consider and proteins to deliver. **Biomaterials** n. 82, p. 94-112, mar. 2016.
- BARADARAN-RAFII, A.; ARJMAND, B.; JAVADI, M. Amniotic membrane transplantation. **Journal of Ophthalmic & Vision Research**, n. 2, p. 58-75, 2007.
- BARDY, Gust H., M. D. et al. Amiodarone or an Implantable Cardioverter-Defibrillator for Congestive Heart Failure. **The New England Journal of Medicine**, n. 352, p. 225-237, jan. 2005.
- BEITNES J. O. et al. Long-term results after intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction: the ASTAMI randomised, controlled study. **Heart**, n. 95, p. 1983-1989, 2009.
- BLACK, S. C. et al. Co-localization of the cysteine protease caspase-3 with apoptotic myocytes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion in the rat. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, n. 30, p. 733-742, 1998.
- BOCCHI E. A. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, n. 93, supl. 1, p. 1-71, 2009.
- BRENNAN, J. A.; ARRIZABALAGA, J. H.; NOLLERT, M. U. Development of a Small Diameter Vascular Graft Using the Human Amniotic Membrane. **Cardiovascular Engineering and Technology**, v. 5, n. 1, p. 96-109, 2013.
- BRISTOW Michael R. M. D. et al. Cardiac-Resynchronization Therapy with or without an Implantable Defibrillator in Advanced Chronic Heart Failure. **The New England Journal of Medicine**, n. 350, p. 2140-2150, maio 2004.
- BUJAK, M.; DOBACZEWSKI, M.; GONZALEZ-QUESADA, C. et al. Induction of the CXC chemokine interferon-gamma-inducible protein 10 regulates the reparative response following myocardial infarction. **Circulation Research**, n. 105, p. 973-83, 2009.

CARGNONI, A. et al. Amniotic membrane patching promotes ischemic rat heart repair. **Cell Transplantation**, v. 18, p. 1147-1159, 2009.

CASTELLANOS, G. et al. Amniotic membrane application for the healing of chronic wounds and ulcers. **Placenta**, v. 59, p.146-153, .2017

CHARLES R. L. et al. Redox regulation of soluble epoxide hydrolase by 15-deoxy- Δ -prostaglandin J2 controls coronary hypoxic vasodilation. **Circulation Research**, v. 108, n. 3, p. 324-334, 2011.

CHEN S. L. et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. **American Journal of Cardiology**, v. 94, n. 1, p. 92-5, 2004.

CHENG, W. et al. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. **Experimental Cell Research**, n. 226, p. 316-327, 1996.

CHOPRA, A.; THOMAS, B. S. Amniotic membrane: A novel material for regeneration and repair. **Journal of Biomimetics, Biomaterials, and Tissue Engineering**, v. 18, n. 1, p. 106-13, 2013.

CLAY C. E. et al. 15-deoxy- δ 12,14PGJ2 induces diverse biological responses via PPAR activation in cancer cells. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, n. 62, p. 23-32, 2000.

COHN, J. M. D. et al. A Comparison of Enalapril with Hydralazine–Isosorbide Dinitrate in the Treatment of Chronic Congestive Heart Failure. **The New England Journal of Medicine**, n. 325, p. 303-310, ago. 1991.

COHN, J. M.D.; TOGNONI, G. M. D. A Randomized Trial of the Angiotensin-Receptor Blocker Valsartan in Chronic Heart Failure. **The New England Journal of Medicine**, n. 345, p. 1667-1675, dez. 2001.

COHN, J. N.; COLUCCI, W. Cardiovascular effects of aldosterone and post-acute myocardial infarction pathophysiology. **American Journal of Cardiology**, n. 97, p. 4F–12F, 2006.

DATASUS. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. Sistema de Informações sobre Mortalidade. **Óbitos por residência por ano do óbito segundo capítulo CID-10**, 2015 [Internet]. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=060701>. Acesso em: 08 dez. 2017.

DE ROTTH A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. **Archives of ophthalmology**, v. 23, n. 522, 1940.

DEFRONZO, R. A. et al. Pioglitazone for diabetes prevention in impaired glucose tolerance. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 12, p. 1104-1115, 2011.

DINO, B.R. et al. The use of fetal membrane homografts in the local management of burns. **Journal of the Philippine Medical Association**, n. 41, p. 890-898, 1965.

DOBACZEWSKI, M., BUJAK, M., LI, N. et al. Smad3 signaling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction. **Circulation Research**, n. 107, p. 418-28, 2010.

DUA, H. S. Azuara-Blanco, A. Amniotic membrane transplantation. **British Journal of Ophthalmology**, v. 83, n. 6, p. 748-52, 1999.

DUA, H. S.; GOMES, J. A.; KING, A. J.; MAHARAJAN, V. S. The amniotic membrane in ophtalmology. **Survey of Ophthalmology**, v. 49, n. 1, p. 51-77, 2004.

DUAN, S. Z. et al. Cardiomyocyte-specific knockout and agonist of peroxisome proliferator-activated receptor- γ both induce cardiac hypertrophy in mice. **Circulation Research**, n. 97, p. 372-379, 2005.

EAGLE K. A. et al. Practice variation and missed opportunities for reperfusion in ST-segment-elevation myocardial infarction: Findings from the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). **Lancet**. n. 359, p. 373-377, 2002.

EHARA, N.; HASEGAWA, K.; ONO, K. Activators of PPAR γ antagonize protection of cardiac myocytes by endothelin-1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 321, p. 345-349, 2004.

ERDMANN, E. et al. Effect of pioglitazone on recurrent myocardial infarction in 2,445 patients with type 2 diabetes and previous myocardial infarction. results from the PROactive (PROactive 05) Study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 49, n. 17, p. 1772–1780, 2007.

FELICE, V. D. et al. Cardiac tissue engineering: a reflection after a decade of hurry. **Frontiers in Physiology**, vol 5, p. 365, 2014.

FIGUEIREDO, G. S. et al. Gamma-irradiated human amniotic membrane decellularised with sodium dodecyl sulfate is a more efficient substrate for the ex vivo expansion of limbal stem cells, **Acta Biomaterialia**, vol 61, p. 124-133, 2017.

FISHER S. A. et al. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 9, Art. No.: CD006536.

FLIEGNER, D. et al. Up-regulation of PPAR γ in myocardial infarction. **European Journal of Heart Failure**, v. 10, n. 1, p. 30-38, 2008.

FORMAN, B. M. et al. 15-Deoxy-delta 12–14- prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. **Cell**, n. 83, p. 803-812, 1995.

FRACCAROLLO D.; GALUPPO P.; BAUERSACHS J. Novel therapeutic approaches to post-infarction remodeling. **Cardiovascular Research**, n. 94, p. 293-303, 2012.

FRANCISCO J. C. et al. Decellularized Amniotic Membrane Scaffold as a Pericardial Substitute: An In Vivo Study. **Transplantation Proceedings**, n. 48, p. 2845-2849, 2016.

FRANCISCO, J. C. et al. Acellular Human Amniotic Membrane Scaffold Loaded with Nanoparticles Containing 15d-PGJ2: A New System Local Anti-Inflammatory Treatment of Eye Diseases. **Journal of Clinical and Experimental Ophthalmology** v. 7, n. 537, 2016.

FRANGOIANNIS N. G. The mechanistic basis of infarct healing, **Antioxidants Redox Signaling**, n. 8, p. 1907-1939, 2006.

FRANGOIANNIS, N. G. The reparative function of cardiomyocytes in the infarcted myocardium. **Cell Metabolism**, n. 21, p. 797-798, 2015.

FUKUDA, K. et al. Differential distribution of sub-chains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea and conjunctiva. **Cornea**, n. 18, p. 73-79, 1999.

FUKUHARA, S. et al. Bone Marrow Cell-Seeded Biodegradable Polymeric Scaffold Enhances Angiogenesis and Improves Function of the Infarcted Heart. **Circulation Journal**, n. 69, p. 850-857, 2005.

GERSTEIN, H. C. et al. Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1096–1105, 2006.

GHOLIPOURMALEKABADI, M. et al. Decellularized human amniotic membrane: Is it really an efficient dressing for protection of burns against antibiotic-resistant bacteria isolated from burn patients?. **Burns November**, v. 41, n. 7, p. 1488-1497, 2015.

GHOLIPOURMALEKABADI, M. et al. Decellularized human amniotic membrane: how viable is it as a delivery system for human adipose tissue-derived stromal cells? **Cell Proliferation**, n. 49, p. 115-121, 2016.

GUARITA-SOUZA, L. C. et al. Cell transplantation: differential effects of myoblasts and mesenchymal stem cells. **International Journal of Cardiology**, n. 111, p. 423-429, 2006.

HAO, Y. et al. Identification of antiangiogenic and anti-inflammatory proteins in human amniotic membrane. **Cornea**, n. 19, p. 348-352, 2000.

HARE J. M. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, n. 54, p. 2277-2286, 2009.

HARE J. M. et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Escalation Study of Intravenous Adult Human Mesenchymal Stem Cells (Prochymal) After Acute Myocardial Infarction. **JACC: Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 24, p. 2277-2286, 2009.

HIRSCH A. et al. Intracoronary infusion of mononuclear cells from bone marrow or peripheral blood compared with standard therapy in patients after acute myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention: results of the randomized controlled HEBE trial. **European Heart Journal**, n. 32, p. 1736-1747, 2011.

HOBSON, M. J. et al. Conditional deletion of cardiomyocyte peroxisome proliferator-activated receptor gamma enhances myocardial ischemia-reperfusion injury in mice. **Shock**, n. 41 p. 40-7, 2014.

HOME, P. D. et al. Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial. **Lancet**, v. 373, n. 9681, p. 2125–2135, 2009.

HOUTGRAAF J. H. et al. First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. **JACC: Journal of the American College of Cardiology**, v. 59, n. 5, p. 539-40, 2012.

HUANG-JUN Liu et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Is Critical to Cardiac Fibrosis. **Hindawi Publishing Corporation PPAR Research**, v. 2016, 2016.

HUIKURI H. V. et al. Effects of intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells on left ventricular function, arrhythmia risk profile, and restenosis after thrombolytic therapy of acute myocardial infarction. **European Heart Journal**, n. 29, p. 2723-2732, 2008.

IHM S. H. et al. Peroxisome proliferator- activated receptor- γ activation attenuates cardiac fibrosis in type 2 diabetic rats: the effect of rosiglitazone on myocardial expression of receptor for advanced glycation end products and of connective tissue growth factor. **Basic Research in Cardiology**, v. 105, n. 3, p. 399-407, 2010.

IVANOVA, E. A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma in cardiovascular disorders and cardiovascular surgery. **Journal of Cardiology**, v. 66, n. 4, p. 271-8, 2015.

JANSSENS S. et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. **Lancet**, n. 367, p. 113-121, 2006.

JANSSENS, S. et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. **Lancet**, v. 14, n. 367, p. 113-21, 2006.

JUGDUTT, B. I. Ventricular remodeling after infarction and extracellular collagen matrix: when is enough? **Circulation**, n. 108, p. 1395-1403, 2003.

KAHN, S. E. et al. Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 23, p. 2427-2443, 2006.

- KAM, K. R. et al. Biomaterials for cardiac cell transplantation. **Elsevier Ltd**, 2011.
- KERNAN, W. N. et al. Pioglitazone after Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack. **The New England Journal of Medicine**, n. 374, p. 1321-1331, 2016.
- KESTING M. R. et al. A Bioartificial Surgical Patch From Multilayered Human Amniotic Membrane-In Vivo Investigations in a Rat Model. **Journal of Biomedical Materials Research Part B**, n. 90, p. 930–938, 2009.
- KHANDOUDI, N. et al. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor- γ , inhibits the Jun NH 2- terminal kinase/activating protein 1 pathway and protects the heart from ischemia/reperfusion injury. **Diabetes**, v. 51, n. 5, p. 1507-1514, 2002.
- KIM S. et al. Cyclic mechanical strain regulates the development of engineered smooth muscle tissue, **Nature Biotechnology**, n. 17, p. 979-983, 1999.
- KIM, S. S. Effects of human amniotic membrane grafts combined with marrow mesenchymal stem cells on healing of full-thickness skin defects in rabbits. *Cell and Tissue Research*, n. 336, p. 59-66, 2009.
- KOYANI, C. N. et al. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ promotes inflammation and apoptosis in cardiomyocytes via the DP2/MAPK/TNF α axis. **International Journal of Cardiology**, v. 173, n. 3, p. 472-80, 2014.
- KURPAKUS, M. A.; STOCK, E. L.; JONES, J. C. The roles of the basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells. **Developmental Biology**, n. 150, p. 243-255, 1992.
- LEFER, D. J.; GRANGER, D. N. Oxidative stress and cardiac disease, **American Journal of Medicine**, n. 109 p. 315-323, 2000.
- LEOR, J. et al. Cohen, Bioengineered cardiac grafts: a new approach to repair the infarcted myocardium? **Circulation**, 102, p. III56-161, 2000.
- LIANG H. et al. Increased expression of pigment epithelium-derived factor in aged mesenchymal stem cells impairs their therapeutic efficacy for attenuating myocardial infarction injury. **European Heart Journal**, n. 34, p. 1681-90, 2013.
- LIBBY, P.; NAHRENDORF, M.; SWIRSKI F. K. Monocyte heterogeneity in cardiovascular disease. **Seminars in Immunopathology**, n. 35, p. 553-62, 2013.
- LIM, S. et al. PPARgamma gene transfer sustains apoptosis, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation, and reduces neointima formation after balloon injury in rats. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, n. 26, p. 808-13, 2006.
- LINCO, M. Pioglitazone and risk of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized trials. **Journal of the American Medical Association**, v. 298, n. 10, p. 1180-1188, 2007.

LIU, H. R. et al. Rosiglitazone inhibits hypercholesterolaemia induced myeloperoxidase upregulation-a novel mechanism for the cardioprotective effects of PPAR agonists. **Cardiovascular Research**, v. 81, n. 2, p. 344–352, 2009.

LIU, J. et al. Update on amniotic membrane transplantation. **Expert Review of Ophthalmology**, n. 5, p. 645–661, 2010.

LOPEZ-VALLADARES, M. J. et al. Donor age and gestational age influence on growth factor levels in human amniotic membrane, **Acta Ophthalmologica**, n. 88, p. 211–216, 2010.

LOSARDO D. W, DIMMELER S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I: angiogenic Cytokines. **Circulation**, v. 109, n. 21, p. 2487–2491, 2004.

LUNDE K. et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine**, v. 21, n. 355, p. 1199–209, 2006.

LYGATE, C. A. et al. Neubauer, “PPAR γ -activator rosiglitazone does not alter remodeling but increases mortality in rats post-myocardial infarction”. **Cardiovascular Research**, v. 58, n. 3, p. 632–637, 2003.

MAEJIMA, Y. et al. Telmisartan, a unique ARB, improves left ventricular remodeling of infarcted heart by activating PPAR gamma. **Laboratory Investigation**, v. 91, n. 6, p. 932–944, 2011.

MALHOTRA, C.; JAIN, A. K. Human amniotic membrane transplantation: Different modalities of its use in ophthalmology. **World Journal of Transplantation**, v. 4, n. 2, p. 11–121, 2014.

MALLIARAS K. et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (Cardiosphere-Derived autologous stem Cells to reverse ventricular dysfunction). **JACC: Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 2, p. 110–22, 2014.

MCMURRAY, John J. V. et al. Angiotensin–Neprilysin Inhibition versus Enalapril in Heart Failure. **The New England Journal of Medicine**, n. 371, p. 993–1004, set. 2014.

MEYER G. P. et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized- controlled BOOST trial. **European Heart Journal**, n. 30, p. 2978–2984, 2009.

MILLER, J. D. et al. Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans. **JACC: Journal of the American College of Cardiology**, n. 52, p. 843–50, 2008.

MINGUELL J. J.; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal stem cells. **Experimental Biology and Medicine**, n. 226, p. 507–20, 2001.

MISHRA, S.; SINGH S. Human amniotic membrane: Can it be a ray of hope in periodontal regeneration? **Indian Journal of Medical Research**, v. 3, n. 9, p. 118-21, 2014.

MIWA, Y. et al. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) induces G(1) arrest and differentiation marker expression in vascular smooth muscle cells. **Molecular Pharmacology**, v. 58, p. 4, p. 837-44, 2000.

MIYAHARA, Y. et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. **Nature Medicine**, n. 12, p. 459-465, 2006.

MOHAN, R.; BAJAJ, A.; GUNDAPPA, M. Human amnion membrane: Potential applications in oral and periodontal field. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, n. 7, p. 15-21, 2017.

NAUGHTON, G. K. From lab bench to market: critical issues in tissue engineering. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n. 9611, p. 372-385, 2002.

NI J. et al. Cystatin E is a novel human cysteine proteinase inhibitor with structural resemblance to family 2 cystatins. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 272, p. 10853-10858, 1997.

NISSEN S. E.; WOLSKI, K. Rosiglitazone revisited: an updated meta-analysis of risk for myocardial infarction and cardiovascular mortality. **Archives of Internal Medicine**, v. 170, n. 14, p. 1191-1201, 2010.

ORASANU, G. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist pioglitazone represses inflammation in a peroxisome proliferator-activated receptor- α -dependent manner in vitro and in vivo in mice. **JACC: Journal of the American College of Cardiology**, n. 52, p. 869-881, 2008.

OXLUND, H. et al. Biomechanical analysis of human chorioamniotic membranes. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, n. 34, p. 247-255, 1990.

PACKER, M. M. D. et al. The Effect of Carvedilol on Morbidity and Mortality in Patients with Chronic Heart Failure. **The New England Journal of Medicine**, n. 334, p. 1349-1355, maio 1996.

PITT, B. M. D. The Effect of Spironolactone on Morbidity and Mortality in Patients with Severe Heart Failure. **The New England Journal of Medicine**, n. 341, p. 709-717, set. 1999.

PORTER, K. E.; TURNER, N. A. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. **Pharmacology & Therapeutics**, n. 123, p. 255-278, 2009.

PRADO, S. D. et al. Potential use of the human amniotic membrane as a scaffold in human articular cartilage repair. **Cell Tissue Bank**, n. 11, p. 183-195, 2010.

RENEDO, M. et al. Modification and activation of Ras proteins by electrophilic prostanoids with different structure are site-selective. **Biochemistry**, n. 46, p. 6607-6616, 2007.

RIAU, A. K. et al. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. **Biomaterials**, n. 31, p. 216-225, 2010.

RIEGLER, J. et al. Cardiac Tissue Slice Transplantation as a Model to Assess Tissue-Engineered Graft Thickness, Survival, and Function. **Circulation**, v. 130 n. 11, p. 577-586, 2014.

RONCALLI J. et al. Intracoronary autologous mononucleated bone marrow cell infusion for acute myocardial infarction: results of the randomized multicenter BONAMI trial. **European Heart Journal**, n. 32, p. 1748-1757, 2011.

ROSE Eric A. M. D. et al. Long-Term Use of a Left Ventricular Assist Device for End-Stage Heart Failure. **The New England Journal of Medicine**, n. 345, p. 1435-1443, nov. 2001.

ROTH G. et al. Demographic and Epidemiologic Drivers of Global Cardiovascular Mortality. **The New England Journal of Medicine**, n. 372, p. 1333-1341, abr. 2015.

ROY R. et al. Decellularized amniotic membrane attenuates post infarct left ventricular remodeling. **Journal of Surgical Research**, n. 200, p. 409-41, 2016.

SABELLA, N. Use of fetal membranes in skin grafting. **Medication Reconciliation**, n. 83, p. 478-480, 1913.

SAN ROMAN J. A. et al. Comparison of Different Bone Marrow-Derived Stem Cell Approaches in Reperfused STEMI. A Multicenter, Prospective, Randomized, Open-Labeled TECAM Trial. **JACC: Journal of the American College of Cardiology**, v. 65, n. 22, p. 2372-82, 2015.

SAPAROV A. et al. The role of anti oxidation and immunomodulation in post natal multipotent stem cell mediated cardiac repair. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 8, p. 16258-16279, 2013.

SAXENA A. Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: learning from past failures to meet future challenges. **Translational Research**, v. 167, n. 1, p. 152-66, jan. 2016.

SCHÄCHINGER V. et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. **New England Journal of Medicine**, n. 355, p. 1210-1221, 2006.

SCHÄCHINGER, V.; ERBS, S.; ELSÄSSER, A. et al. REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 12, p. 1210-1221, 2006.

SCHNEE, J. M.; HSUEH, W. A. Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. **Cardiovascular Research**, n. 46, p. 264-8, 2000.

SERPOOSHAN V. et al. The Effect of Bioengineered Acellular Collagen Patch on Cardiac Remodeling and Ventricular Function post Myocardial Infarction. **Biomaterials**, v. 34, n. 36, 2013.

SHAKOURI-MOTLAGH, A. et al. The application of decellularized human term fetal membranes in tissue engineering and regenerative medicine (TERM). **Placenta**, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2017.07.002>. Acesso em: 08 dez. 2017.

SHIBATA, T. et al. Thioredoxin as a molecular target of cyclopentenone prostaglandins. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 278, p. 26046-26054, 2003.

SHIMAZAKI J.; YANG H. Y.; TSUBOTA, K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. **Ophthalmology**, n. 104, p. 2068-2076, 1997.

SHIMMURA, S. et al. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. **Cornea**, n. 20, p. 408-413, 2001.

SHINDE, A. V.; FRANGOIANNIS, N. G. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, n. 70C, p. 74-82, 2014.

SHIOMI T. et al. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. **Circulation**, v. 106, n. 24, p. 3126-3112, 2002.

SILINI R. et al. The Long Path of Human Placenta, and its Derivates, in Regenerative Medicine. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, n. 162, 2015.

SIMPSON, D. et al. A tissue engineering approach to progenitor cell delivery results in significant cell engraftment and improved myocardial remodeling. **Stem Cell Basics**, n. 25, p. 2350-2357, 2007.

SINGH A.; SINGH A. B.; SEN D. Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010-2015). **Stem Cell Research & Therapy**, n. 7, p. 82, 2016.

SMEETS, P. J. H. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation: take it to heart. **Acta Physiologica**, v. 191, n. 3, p.171-188, 2007.

SOLOMON, A. et al. Suppression of interleukin 1 alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. **British Journal of Ophthalmology**, n. 85, p. 444-449, 2001.

SONG, M. The repairing of full-thickness skin deficiency and its biological mechanism using decellularized human amniotic membrane as the wound dressing. **Materials Science and Engineering**, n. 77, p. 739-747, 2017.

SORSBY, A. Symons hm. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye: (Burns of the second degree). **British Journal of Ophthalmology**, n. 30, v. 6, p.337-45, 1946.

TABA, Y. et al. Fluid shear stress induces lipocalin-type prostaglandin D2 synthase expression in vascular endothelial cells. **Circulation Research**, n. 86, p. 967-973, 2000.

TAO L. et al., Adiponectin: an indispensable molecule in rosiglitazone cardioprotection following myocardial infarction. **Circulation Research**, v. 106, n. 2, p. 409-417, 2010.

TENDERA M. et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non- selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial. **European Heart Journal**, n. 30, p. 1313-1321, 2009.

THE CONSENSUS TRIAL STUDY GROUP. Effects of Enalapril on Mortality in Severe Congestive Heart Failure. **The New England Journal of Medicine**, n. 316, p. 1429-1435, jun. 2015.

THE SOLVD INVESTIGATORS. Effect of Enalapril on Survival in Patients with Reduced Left Ventricular Ejection Fractions and Congestive Heart Failure. **The New England Journal of Medicine**, n. 325, p. 293-302, ago. 1991.

TRAVERSE J. H. et al. Effect of intracoronary delivery of autologous bone marrow mononuclear cells 2 to 3 weeks following acute myocardial infarction on left ventricular function: the LateTIME randomized trial. **JAMA**, v. 16, n. 306, p. 2110-9, 2011.

TSENG, S. C.; PRABHASAWAT, P.; LEE, S. H. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. **American Journal of Ophthalmology**. n. 124, p. 765-774, 1997.

VENTURA, C. et al. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 282, p. 14243-14252, 2007.

WAYMAN, N. S. et al. Ligands of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR- γ and PPAR- α) reduce myocardial infarct size. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 9, p. 1027-40, 2002.

WEIRATHER, J., HOFMANN, U. D., BEYERSDORF, N. et al. Foxp31 CD41⁺ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. **Circulation Research**, n. 115, p. 55-67, 2014.

WEISS, M. L. et al. Immune response of human umbilical wharton jelly-derived cell. **Stem Cells**, n. 26, p. 2865-74, 2008.

WERNER, C. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist pioglitazone increases number and function of endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease and normal glucose tolerance. **Diabetes**, n. 56, p. 2609-2615, 2007.

WHITE H. D.; VHEW D. P. Acute myocardial infarction. **Lancet**, n. 372, p. 570-584, 2008.

WILSHAW S. P. et al. Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. **Tissue Engineering**, n. 12, p. 2117-2129, 2006.

WILSHAW, S. P. et al. Biocompatibility and potential of acellular human amniotic membrane to support the attachment and proliferation of allogeneic cells. **Tissue Engineering Part A**, v. 14, n. 4, p. 463-72, 2008.

WOLLERT K. C. et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. **Lancet**, n. 364, p. 141-148, 2004.

WORLD HEALTH STATISTICS, World Health Organization, 2005.

YASUDA, S. et al. Antidiabetic drug pioglitazone protects the heart via activation of PPAR- γ receptors, PI3-kinase, Akt, and eNOS pathway in a rabbit model of myocardial infarction. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 296, n. 5, p. H1558–H1565, 2009.

YIN, R. et al. Dietary n-3 fatty acids attenuate cardiac allograft vasculopathy via activating peroxisome proliferator activated receptor- γ . **Pediatric Transplantation**, n. 12, p. 550-6, 2008.

YUAN, J. et al. Transplantation of human adipose stem cell-derived hepatocyte-like cells with restricted localization to liver using acellular amniotic membrane. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 217, 2015.

ZINGARELLI, B. et al. Diverse cardioprotective signaling mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 and ciglitazone, in reperfusion injury: role of nuclear factor- κ B, heat shock factor 1, and Akt. **Shock**, v. 28, n. 5, p. 554-563, 2007.