



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ESCOLA DE MEDICINA

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MESTRADO

PAULO ANDRÉ BISPO MACHADO JÚNIOR

**ANÁLISE BIOQUÍMICA E HISTOPATOLÓGICA DOS EFEITOS DA MATRIZ DE
MEMBRANA AMNIÓTICA ACELULAR E DAS CÉLULAS-TRONCO NO INFARTO DO
MIOCÁRDIO EM RATOS**

CURITIBA

2020

PAULO ANDRÉ BISPO MACHADO JÚNIOR

**ANÁLISE BIOQUÍMICA E HISTOPATOLÓGICA DOS EFEITOS DA MATRIZ DE
MEMBRANA AMNIÓTICA ACELULAR E DAS CÉLULAS-TRONCO NO INFARTO DO
MIOCÁRDIO EM RATOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho

CURITIBA

2020

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Edilene de Oliveira dos Santos CRB-9/1636

M149a Machado Júnior, Paulo André Bispo
2020 Análise bioquímica e histopatológica dos efeitos da matriz de membrana amniótica acelular e das células-tronco no infarto do miocárdio em ratos / Paulo André Bispo Machado Júnior; orientador, Luiz César Guarita Souza; coorientador, Ricardo Aurino de Pinho. -- 2020
94 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2020.
Inclui bibliografias

1. Ciências da saúde. 2. Insuficiência cardíaca. 3. Infarto do miocárdio. 4. Células-tronco. 5. Âmnio. I. Guarita-Souza, Luiz César. II. Pinho, Ricardo Aurino. III, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título

CDD. 20.ed. – 610



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 **10 dias do mês de dezembro de 2020 às 12:30**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação **“ANÁLISE BIOQUÍMICA E HISTOPATOLÓGICA DOS EFEITOS DA MATRIZ DE MEMBRANA AMNIÓTICA ACELULAR E DAS CÉLULAS-TRONCO NO INFARTO DO MIOCÁRDIO EM RATOS”** apresentado por **Paulo André Bispo Machado Júnior** 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 César Guarita Souza – Presidente	
Prof. Dr. Julio César Francisco (Universidade Positivo)	
Prof. Dr. Santiago Alonso Tobar Leitão (Harvard Medical School/Brigham and Women’s Hospital)	

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

Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza

Conceito: Aprovado

Prof. Dr. Julio César Francisco

Conceito: Aprovado

Prof. Dr. Santiago Alonso Tobar Leitão

Conceito: Aprovado

Parecer Final: Aprovado

Observações da Banca Examinadora:



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



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

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Fátima e Paulo, pelos princípios que me ensinaram e pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Vocês fazem cada conquista valer a pena!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por estar comigo em todos os momentos da minha vida e por me capacitar e me conceder as mais incríveis oportunidades, como a de produzir este trabalho.

Aos meus pais, Fátima e Paulo, sempre tão presentes, por serem minha base de sustentação, por me entenderem nos momentos de ausência e por me apoiarem em cada decisão da minha vida.

À minha namorada, Giovana Paludo Bertinato, pelo carinho, companheirismo e conselhos e incentivos em cada etapa desse estudo.

À equipe da Técnica Operatória da PUCPR, especialmente ao Misael Gomes Barbosa, e aos membros do Laboratório de Patologia da PUCPR, Seigo Nagashima, Caroline Buzzata Vaz de Paula e professora Lúcia de Noronha, pela imprescindível ajuda durante a produção e leitura das lâminas histológicas.

Ao professor Júlio César Francisco e à professora Rossana Baggio Simeoni, pela confiança em mim depositada e pela indispensável ajuda no desenvolvimento do projeto, além dos valiosos conselhos de vida. Muito obrigado!

À Jane Fabia Domenica, por me incentivar a persuadir esse sonho desde o início, e à Paula Maíra Portela do Nascimento, pela paciência, gentileza e disposição a me auxiliar frente aos processos burocráticos do mestrado.

Ao meu amigo/irmão Luiz Augusto Fabrício de Melo Garbers, por me apoiar em cada etapa deste estudo, me incentivar durante os momentos de luta, pelos valiosos conselhos de vida e pelo exemplo de ética e caráter.

À minha estimável amiga Alice Correa Lunedo, pelo companheirismo durante a graduação e produção desse trabalho, pelo exemplo de integridade, pelo carinho e pelos valiosos conselhos. Muito obrigado.

Aos colegas Murilo Sgarbossa Tonial e Luiz Felipe Marquese, pelo importante auxílio e dedicação durante a produção do presente trabalho. Muito obrigado!

À Prof. Dra. Cristina Pellegrino Baena, pessoa fundamental no meu crescimento e desenvolvimento pessoal e profissional durante a graduação, por ser um referencial de caráter, fonte de valiosos conselhos e por me conceder a primeira oportunidade de participar da pesquisa científica. Obrigado por me acolher, professora!

Ao professor Ricardo Aurino de Pinho, por me acolher em seu grupo de pesquisa, pela atenção, orientação e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho, além dos valiosos conselhos que levarei para a vida. Obrigado, professor!

Ao professor Gustavo Gavazzoni Blume, uma referência de caráter, pelo apoio e ajuda durante a condução deste trabalho, pelas inúmeras oportunidades, pelos valiosos conselhos e por sempre acreditar em meu potencial. Muito obrigado!

Agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza, por confiar em mim e permitir a realização deste grande sonho, pelos ensinamentos e orientações durante os momentos de incerteza, puxões de orelha nos momentos de euforia, pelos estimados conselhos de vida pessoal e profissional e pelo auxílio durante toda a condução deste trabalho. Muito obrigado, professor!

Por fim, agradeço à Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pelo auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho, por estimular a pesquisa científica e por me conceder a oportunidade de realizar o mestrado ainda durante a graduação.

EPÍGRAFE

“Nada, absolutamente nada resiste ao trabalho.”

Euryclides de Jesus Zerbini

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALRs	Absent in melanoma-like receptors
ATP	Adenosina trifosfato
BFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
CARD	Caspase activation and recruitment domain
CLRs	C-type lectin receptors
CT	Células-tronco
DAMPs	Moléculas associadas ao dano tecidual
DCFH	Diclorodihidrofluoresceína
DCV	Doenças cardiovasculares
EGF	Fator de crescimento epidermal
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	US food and drug administration
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HMGB1	High-mobility group box-1
HSPs	Heat shock proteins
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC	Insuficiência cardíaca
INTERMACS	Interagency registry for mechanically assisted circulatory support

IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
LRR	Domínio c-terminal rico em repetições de leucinas
MA	Membrana amniótica
MO	Medula óssea
NATCH	Domínio central de oligomerização
NLRs	Nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors
NLRP3	Nod-like-receptor pyrin domain containing 3
PAMPs	Partículas associadas a patógenos
PYD	Pyrin domain
RLRs	Retinoic acid inducible gene-1 like receptors
RRPs	Receptores de reconhecimento padrão
SGLT2	Sodium-glucose cotransporter 2
TGF- β	Fator de crescimento transformante β
TLRs	Toll-like receptors
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UNOS	United network for organ sharing

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Complexo Inflamassoma NLRP3.....	17
Figura 02: Processo de ativação do Inflamassoma NLRP3	31
Figura 03: Resultados da análise ecocardiográfica	58
Figura 04: Resultados da análise das repercussões inflamatórias	59
Figura 05: Resultados da análise de estresse oxidativo	60
Figura 06: Resultados da análise da atividade do complexo NLRP3	60
Figura 07: Lâminas da análise histopatológica	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Estudos avaliando a inibição da interleucina 1 β após o infarto ou IC.....	29
Tabela 02: Principais estudos avaliando a inibição do complexo NLRP3 após o infarto do miocárdio	33
Tabela 03: Principais características das células-tronco	45

MATERIAL SUPLEMENTAR

Anexo 1 – Parecer do CEUA (Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais)

Anexo 2 – Editorial publicado no *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*

Anexo 3 – Gráficos resumo

RESUMO

Introdução: O infarto agudo do miocárdio (IAM) permanece como principal causa de morte cardiovascular no mundo, e recentemente o complexo Inflamassoma NLRP3 foi apontado como um importante modulador da resposta inflamatória após o IAM. Estudos prévios já demonstraram que terapias celulares envolvendo células-tronco (CT) e membrana amniótica humana (MAH) foram capazes de modular a resposta inflamatória após o IAM, mas os mecanismos exatos de atuação e a possível interação com o complexo NLRP3 ainda não é elucidada. **Objetivos:** avaliar os efeitos bioquímicos e histopatológicos do uso das células-tronco mononucleares da medula óssea e da membrana amniótica humana sobre o complexo NLRP3 após o IAM em ratos **Materiais e Métodos:** 50 ratos foram submetidos ao infarto do miocárdio através de oclusão da artéria coronária esquerda. Após 07 dias, os animais foram submetidos à análise ecocardiográfica, e aqueles com fração de ejeção < 50% foram incluídos no estudo e randomizados em três grupos: controle (n=10), CT (n=11) e membrana-amniótica (n=8). As CT e a MAH foram injetadas e implantadas, respectivamente, na parede anterior do coração sete dias após o infarto. No trigésimo dia após o infarto, os animais foram novamente submetidos à ecocardiografia, com posterior eutanásia. Os parâmetros de estresse oxidativo foram avaliados através do sistema DCFH e glutationa, a atividade inflamatória foi analisada através de imunohistoquímica para TNF-alfa e NF-kB, e a atividade do complexo NLRP3 determinada através da atividade de NALP3, Interleucina-1 β , ASC e Caspase-1. Valores de $p < 0,05$ denotaram significância estatística. **Resultados:** Os grupos foram considerados homogêneos em relação aos dados ecocardiográficos do sétimo dia (fração de ejeção, volume sistólico final e volume diastólico final). Após 30 dias, observou-se melhora significativa na fração de ejeção e redução do remodelamento ventricular nos grupos células-tronco e membrana amniótica, sem alterações significativas no grupo controle. Não se observou diferença significativa entre os grupos ao avaliar estado redox intracelular e os níveis do marcador pró-inflamatório NF-kB estavam significativamente reduzidos no grupo controle. Não houve diferença nos níveis de TNF-alfa e NF-kB nos grupos células-tronco e membrana amniótica, e a atividade do complexo NLRP3 não foi reduzida com o uso terapêutico de células-tronco ou membrana amniótica, em comparação ao grupo controle. **Conclusões:** Apesar da melhora na função cardíaca global, terapias celulares com células-tronco ou membrana amniótica não foram capazes de suprimir a atividade do complexo NLRP3 em uma análise após 30 dias do infarto do miocárdio.

Palavras-Chave: Insuficiência cardíaca; Células-Tronco; Membrana Amniótica; Inflamassoma NLRP3;

ABSTRACT

Background: Acute myocardial infarction (AMI) remains as the leading cause of cardiovascular death worldwide and, recently, the NLRP3 Inflammasome had been pointed as the key regulator of the inflammatory response after AMI. Previous experimental studies had demonstrated that cell-based therapies with stem cells and human amniotic membrane can modulate the inflammation after an ischemic injury in the heart; however, the exact mechanisms underlying this association is still not clear. This study aimed to evaluate the possible relationship between the bone-marrow mononuclear stem cells (BMMC), the acellular human amniotic membrane (AHAM) and the NLRP3 complex after myocardial infarction in rats. **Methods:** A total of 50 rats were submitted to myocardial ischemia through the ligation of the left coronary artery. After seven days, an echocardiographic evaluation was performed, and animals with ejection fraction < 50% were included and randomized into three groups: control (n=10), BMMC (n=11), and AHAM (n=8). The stem cells and the amniotic membrane were injected and implanted, respectively, on the anterior surface of the heart seven days after coronary occlusion. On the 30th day, the animals were again submitted to echocardiographic evaluations, followed by euthanasia and surgical excision of the heart for biochemical and histological analyzes. P values < 0,05 denoted statistical significance. **Results:** The groups were homogenous during the echocardiographic baseline analysis. After 30 days, both BMMC and AHAM groups had significant improvements in ejection fraction and showed decreased ventricular remodeling, and no significant changes were observed in the control group. Oxidative stress analysis was similar between the three groups, and the inflammatory parameters and the NLRP3 inflammasome activity were not decreased with the therapeutic use of both BMMC and AHAM, in comparison to the control group. **Conclusion:** Despite the improvements observed in global cardiac function, cell-therapy with BMMC AHAM was not able to suppress the NLRP3 inflammasome activity after 30 days of myocardial infarction.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. REVISÃO DE LITERATURA	21
4.1 INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO	21
4.1.1 Epidemiologia	21
4.1.2 Fisiopatologia do IAM	21
4.1.3 A resposta inflamatória após o IAM	22
4.1.3.1 Fator de necrose tumoral alfa	23
4.1.3.2 Interleucina 6	25
4.1.3.3 Interleucina 1	25
4.2 O COMPLEXO INFLAMASSOMA NLRP3	28
4.2.1 Receptores de reconhecimento do sistema imune	28
4.2.2 Ativação do inflamassoma NLRP3	30
4.2.3 Estudos envolvendo o complexo NLRP3	32
4.3 HISTÓRIA NATURAL DO IAM	33
4.4 INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	34
4.4.1 Medidas gerais e tratamentos farmacológicos	34
4.4.2 Revascularização do miocárdio	35
4.4.3 Dispositivos de assistência ventricular	35
4.4.4 Transplante cardíaco	36
4.5 USO DE BIOMATERIAIS E TERAPIAS CELULARES	37
4.6 MEMBRANA AMNIÓTICA	37
4.6.1 Estrutura básica e composição	37
4.6.2 Propriedades biológicas da MA	38
4.6.3 Métodos de preparação da MA	40
4.6.4 Estudos com a MA	41
4.7 CÉLULAS-TRONCO	43

4.7.1 Células-tronco embrionárias	43
4.7.2 Células-tronco pluripotentes induzidas	43
4.7.3 Células-tronco adultas	44
4.7.4 Uso clínico e terapêutico das células-tronco	45
5. ARTIGO.....	51
6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
8. MATERIAL SUPLEMENTAR	92

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte global, sendo o infarto agudo do miocárdio (IAM) seu principal representante, responsável por aproximadamente 16 milhões de mortes no mundo em 2015 (1). Do ponto de vista da fisiopatologia, o evento isquêmico agudo ocorre devido à fissura ou ruptura de placa aterosclerótica, com conseqüente formação de trombo, que ao se deslocar pela luz do vaso pode desencadear um processo de obstrução do lúmen arterial.

Após a obstrução, ocorre queda do aporte sanguíneo aos cardiomiócitos, gerando um estado de hipoperfusão capaz de desregular os mecanismos fisiológicos das células cardíacas (2,3). A queda dos níveis de oxigênio faz com que um metabolismo anaeróbico seja exercido pelos cardiomiócitos, diminuindo a produção de Adenosina trifosfato (ATP) pelas mitocôndrias, com conseqüente acúmulo de substâncias tóxicas no meio intracelular, a exemplo de ácido láctico e radicais livres (4,5). Além disso, há liberação e exposição de moléculas e proteínas intracelulares para o meio extracelular, gerando uma reação imunológica e ativando uma resposta inflamatória no organismo (7,8,9).

A resposta inflamatória é essencial para que a homeostasia do organismo ocorra de forma adequada. No microambiente isquêmico após a obstrução coronariana, objetiva-se com a resposta imune o reparo da região acometida pela hipóxia através da reabsorção de debris celulares e posterior produção de matriz de colágeno cicatricial, em um processo que deve ser finamente regulado pelos agentes da resposta imunológica (7,8). Os principais agentes envolvidos nesse processo são as células pró-inflamatórias, como neutrófilos e monócitos, citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Interleucina-1, Interleucina-6, plaquetas e sistema complemento (8,9).

Em casos de morte celular extensa, devido ao infarto transmural ou à ausência de reperfusão da área de isquemia, a resposta inflamatória torna-se exacerbada, podendo deteriorar a capacidade contrátil do coração através de alterações elétricas, bioquímicas e estruturais na arquitetura ventricular (10). Diversos estudos têm indicado que graus elevados de marcadores pró-inflamatórios após o infarto do miocárdio estão diretamente relacionados com a perda de função cardíaca e remodelamento ventricular

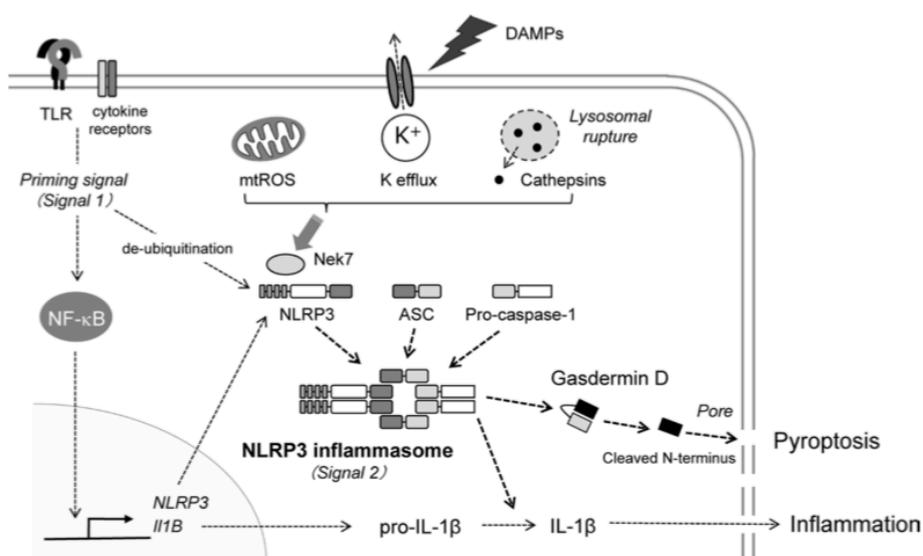
patológico, levando à disfunção ventricular e evolução para insuficiência cardíaca (8,9,11).

Um importante regulador desse mecanismo inflamatório no organismo é o complexo Inflamassoma NLRP3, amplamente reconhecido por sua ação pró-inflamatória em patologias neurodegenerativas e metabólicas como gota, diabetes tipo 2 e Doença de Alzheimer (12,13). Recentemente, esse complexo passou a ser estudado no contexto das doenças cardiovasculares, especialmente em processos aterogênicos, síndromes coronarianas e acidente vascular encefálico, devido ao seu possível envolvimento na fisiopatologia dessas doenças (14,15).

O inflamassoma é um complexo multiproteico e intracelular, sendo o subtipo mais estudado o NLRP3. Dois mecanismos complementares são necessários para que ocorra sua ativação: o primeiro está relacionado à translocação do fator de transcrição NF-kB para o núcleo celular, estimulando a expressão gênica de Pro-Interleucina-1 β , Pro-Interleucina-18 e NLRP3 (16). O segundo mecanismo ocorre em resposta a partículas associadas a patógenos (PAMPs) e moléculas associadas ao dano tecidual (DAMPs), substancialmente elevadas em períodos de estresse e/ou lesões teciduais. Outras substâncias também podem ser responsáveis por sua ativação, como os cristais de urato, lipopolissacarídeos, ATP, proteínas nucleares, espécies reativas de oxigênio (EROs) e o efluxo de potássio celular (17,18).

Após sua ativação, uma cascata enzimática intracelular é desencadeada, culminando na ativação da enzima caspase-1 e posterior clivagem das Pro-Interleucina-1 β e Pro-Interleucina 18, que em suas formas ativas são consideradas como os agentes responsáveis pela resposta efetora do complexo (18,19). Além disso, a ativação da caspase-1 também causa a morte celular através da formação de poros (piroptose), por meio da estimulação de gasdermina-D (Figura 01).

Figura 01: Complexo Inflamassoma NLRP3



Fonte: Takahashi, 2018.

Estudos recentes têm demonstrado que a atividade do complexo NLRP3 está associada com a perda de função cardíaca e remodelamento cardíaco patológico após a isquemia miocárdica (17,20,21). Por esse motivo, o bloqueio de suas enzimas e interleucinas tornou-se um alvo terapêutico após o infarto do miocárdio (22,23). Diversos *trials* já avaliaram os possíveis benefícios do bloqueio direto da IL-1β com o uso de anticorpos específicos no processo de remodelamento cardíaco em pacientes após o evento isquêmico; outros agentes como o *Dapansutrile*, Colchicina, MCC950 e Muscona também têm sido testados em modelos animais com o mesmo objetivo (24–29).

Apesar de promissores, esses agentes ainda não estão disponíveis para uso terapêutico após uma lesão isquêmica no coração (14). Em sua maioria, possuem um elevado custo de aquisição e ainda não existem estudos que avaliem a eficácia e o risco-benefício acerca dos possíveis efeitos colaterais que essas terapias imunossupressoras possam acarretar após um longo período de tempo. Dessa forma, a busca por um agente efetivo em preservar a função cardíaca de forma global e impedir o processo de dilatação ventricular através da inibição da resposta inflamatória após o infarto do miocárdio ainda é uma meta a ser atingida (8,30).

Diversos biomateriais e terapias celulares tem sido estudados nesse contexto, buscando uma integração célula-matriz que proporcione a melhora da função cardíaca global, seja através de uma ação imunomodulatória, capaz de reduzir a resposta

inflamatória e promover angiogênese, ou através de uma estrutura tridimensional que possibilite a adesão, proliferação e diferenciação celular (31,32). Os agentes mais estudados são as células-tronco, provenientes da medula óssea, tecido adiposo e células fetais e, mais recentemente, *scaffolds* tridimensionais como o tecido intestinal submucoso e a membrana amniótica humana (33–35).

As células-tronco possuem potencial terapêutico para diversas doenças, devido a sua capacidade de proliferação e diferenciação em variadas linhagens celulares (36–38). Recentemente, uma possível modulação anti-inflamatória foi proposta com seu uso terapêutico, mediada por mecanismos autócrinos e parácrinos no microambiente celular (35,39). Por esse motivo, seu uso tem sido explorado no tratamento de doenças autoimunes, neurodegenerativas, traumáticas e inflamatórias. No contexto do infarto do miocárdio, o uso das células-tronco já demonstrou capacidade de melhora na função cardíaca, redução da área do infarto e estimulação da angiogênese (40–42).

Em relação a membrana amniótica humana (MA), seu uso como biomaterial tem sido investigado devido a suas características intrínsecas de biocompatibilidade, não causando reações imunológicas no hospedeiro, e por seu potencial de regeneração tecidual (43,44). Alguns autores atribuem seu mecanismo de ação ao seu suporte tridimensional, que atrai e estimula a sobrevivência de células vizinhas, além de ser uma fonte de células-tronco em sua forma nativa (45). A grande atratividade para seu uso terapêutico decorre do fato de ser facilmente obtida e processada, não gerando custos significativos para sua aquisição. Atualmente, a MA é utilizada na cicatrização de queimaduras na pele, úlceras de decúbito e tratamento de afecções da superfície ocular. Em modelos de infarto, a MA já foi capaz de diminuir o remodelamento patológico e melhorar a função cardíaca, atuando através da formação de novos vasos sanguíneos e diminuição da resposta inflamatória (34,46,46).

Apesar das evidências sugerindo benefícios funcionais com o uso terapêutico das células-tronco e da MA após o IAM, ainda não há um consenso acerca dos mecanismos exatos pelos quais esses agentes interagem com as células cardíacas residentes, especialmente em relação à possível atenuação da resposta inflamatória após o infarto. Além disso, não há na literatura descrições que abordem a possível interação das células-tronco e da MA com o complexo Inflamassoma NLRP3 após uma isquemia permanente no coração.

2. JUSTIFICATIVA

O processo inflamatório é indispensável para que ocorra a reabilitação da função cardíaca após um evento isquêmico no miocárdio. Entretanto, uma resposta inflamatória exacerbada, causada por uma obstrução prolongada do vaso ou pela extensão do infarto, pode causar efeitos prejudiciais às células cardíacas. Assim, a atenuação da resposta inflamatória após o evento agudo é um alvo terapêutico que objetiva a preservação da função contrátil do miocárdio e redução do processo de dilatação ventricular patológica.

Recentemente, o Inflamassoma NLRP3 foi apontado como um dos principais reguladores dessa resposta inflamatória após o IAM. Por esse motivo, a inibição das proteínas e interleucinas produzidas por esse complexo após o IAM tornou-se um alvo terapêutico com objetivo de preservação da função cardíaca global após uma injúria isquêmica no coração.

As células-tronco mononucleares da medula óssea e a MA já se demonstraram capazes de reduzir a resposta inflamatória em modelos experimentais de infarto, mas ainda não há na literatura uma descrição precisa desse mecanismo de atenuação. Assim, esse estudo testou a hipótese de que as células-tronco mononucleares da medula óssea e a MA preservariam a função cardíaca e impediriam o remodelamento cardíaco patológico através da diminuição da resposta inflamatória após um evento isquêmico no coração, especificamente por meio da inibição do complexo Inflamassoma NLRP3 em um modelo de infarto do miocárdio em ratos.

3. OBJETIVOS

3.1 - GERAL

Realizar a análise das repercussões inflamatórias, oxidativas e histopatológicas dos efeitos do implante da membrana amniótica acelular e das células-tronco mononucleares em um modelo de infarto do miocárdio em ratos.

3.2 – ESPECÍFICOS

- Realizar a análise *in situ* de TNF- α e NF- κ B, como parâmetros de atividade inflamatória.
- Avaliar a oxidação da diclorodihidrofluoresceína (DCFH) e sistema glutathiona, como parâmetros de equilíbrio redox.
- Avaliar a via do complexo inflamassoma NLRP3 através dos níveis das proteínas NLRP3, ASC, Caspase-1 e Interleucina-1 β .

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Infarto Agudo do Miocárdio (IAM)

4.1.1 Epidemiologia

As doenças do aparelho circulatório são responsáveis por aproximadamente 18 milhões de óbitos por ano, equivalendo a cerca de 31% de todas as mortes globais (47). No Brasil, os últimos dados do Ministério da Saúde estimam que cerca de 358.882 brasileiros foram a óbito em decorrência das doenças cardiovasculares em 2017, levando a óbito um brasileiro a cada 90 segundos (48). Há destaque para o infarto agudo do miocárdio (IAM), responsável por aproximadamente 45% desses óbitos, com estimativas de custos de saúde acima dos \$750 bilhões globalmente em 2035 (49).

4.1.2 Fisiopatologia do IAM

A causa mais comum de IAM é a aterotrombose, ou seja, ruptura de uma placa de ateroma com formação de trombo sobrejacente (3). Esse trombo pode ser parcialmente oclusivo (trombo branco, rico em plaquetas), ou totalmente oclusivo (trombo vermelho, rico em fibrina). O fator determinante para a formação de um ou outro tipo de trombo é o grau de inflamação na placa aterosclerótica, que pode resultar em infarto transmural ou subendocárdico (50). Em uma minoria dos casos, a oclusão coronariana aguda é secundária a outros processos patológicos que não a aterotrombose, como o espasmo coronariano, uso de cocaína, dissecação coronariana, síndromes trombofílicas e vasculites.

Após a oclusão coronariana, ocorre queda do aporte sanguíneo para a região subjacente à obstrução, diminuindo a concentração de oxigênio (O_2) celular e desencadeando um processo de hipóxia (2). Devido ao estado de hipóxia, os cardiomiócitos entram em processo de respiração anaeróbia com consequente redução dos níveis energéticos da célula, acumulando lactato e gerando falência das bombas de processo ativo como a $1NA/K^+/ATPase$, causando um acúmulo de sódio intracelular e efluxo de potássio devido ao gradiente osmótico com o meio extracelular (6,53). Como consequência, ocorre um distúrbio de condução da membrana plasmática e instituição de edema celular, em uma primeira fase que ainda é reversível, pois as membranas celulares estão intactas (2,52,53).

Além do influxo de sódio, ocorre liberação de cálcio intracelular pelo retículo sarcoplasmático, potencializando a ativação de enzimas proteases (54). Essas enzimas, através da lise de fosfolípídeos membranáceos, liberam para o citoplasma ácidos graxos livres e radicais livres provenientes do citoplasma mitocondrial, em especial as espécies reativas de oxigênio (EROs). Os radicais livres são importantes moléculas para o metabolismo fisiológico da célula, mas quando seus níveis se elevam a ponto de superar os mecanismos anti-oxidantes celulares, como ocorre no estado de hipóxia após o infarto do miocárdio, sua presença pode gerar peroxidação de lipídeos, oxidação de proteínas e danos irreversíveis ao DNA celular (55). Ainda, ocorre despolimerização do citoesqueleto celular tardiamente, alterando a permeabilidade das membranas celulares, causando sua ruptura e tornando a morte celular irreversível (5,6,56).

4.1.3 A resposta inflamatória após o infarto do miocárdio

A morte dos cardiomiócitos libera para o meio extracelular moléculas e proteínas do interior celular que, quando exteriorizadas, são capazes de ativar o sistema complemento e tornam-se substratos para a formação de complexos antigênicos (9). Essas moléculas liberadas subsequente à morte celular são genericamente denominadas de moléculas associadas a dano tecidual (DAMPs) (57). As principais DAMPs são os ácidos nucleicos, proteínas intracelulares como HMGB1 (*High-mobility group B1*), HSPs (*heat shock proteins*), DNA mitocondrial e RNA mensageiro (58,59). Essas moléculas são reconhecidas por receptores de reconhecimento padrão (RRPs), presentes na superfície de células como monócitos e macrófagos, sendo capazes de ativar a resposta celular e humoral no organismo (60).

A resposta imunológica pode ser efetuada através de dois mecanismos complementares: por meio da ação de células pró-inflamatórias, como os neutrófilos e monócitos (7), ativados pelo sistema complemento, e através das citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , Interleucinas da família 1 (IL-1) e Interleucina 6 (IL-6) (61,62). Outros agentes como o fator de transcrição NF- κ B e as EROs também estão envolvidos neste processo.

Após o infarto do miocárdio, a resposta inflamatória pode ser dividida em três fases: inflamatória, proliferativa e de maturação (63,64). A fase inflamatória é caracterizada pela síntese de citocinas da família CCL e CXCL, induzidas pelo NF- κ B e

sistema complemento em resposta à injúria miocárdica. As citocinas CCL e CXCL são responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos para a área do infarto, que por sua vez recrutam os monócitos para o microambiente isquêmico, com objetivo primário de remoção dos cardiomiócitos mortos (65). Os monócitos são também responsáveis pela produção de IL-1 β e TNF- α , que auxiliam no recrutamento de macrófagos, que realizarão a limpeza dos debris celulares e extracelulares da região (9,66).

A seguir, fibroblastos e células vasculares secretam proteínas como Fator de Crescimento β (TFG- β), Interleucina-10 e Fator de Crescimento Endotelial, em busca da preservação da arquitetura ventricular após a lesão isquêmica, atuando através da degradação da matriz extracelular remanescente e deposição inicial de colágeno cicatricial, caracterizando a fase proliferativa (67,68). Por fim, a morte destas células de reparo marca a maturação do infarto e surgimento cicatricial através da formação e ligação das cadeias de colágeno (fase de maturação) (2). Essa sequência ordenada de eventos é responsável pela preservação da estrutura cardíaca após a injúria miocárdica, prevenindo potenciais complicações da isquemia miocárdica como ruptura de parede ventricular, formação de aneurismas e choque cardiogênico.

O grau de inflamação após o evento agudo pode determinar a extensão da área de infarto e conseqüentemente a possível perda de função cardíaca e remodelamento ventricular, variando de acordo com os níveis das interleucinas pró-inflamatórias na região de infarto. Após o IAM transmural sem reperfusão, a produção dessas citocinas ocorre de forma exacerbada, levando a sustentação do processo inflamatório na área do infarto, estando relacionadas com o processo tardio de perda de função cardíaca e remodelamento cardíaco patológico (13).

4.1.3.1 – Fator de Necrose Tumoral alfa

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória secretada e ativada por macrófagos e linfócitos T, sendo um mediador fundamental na inflamação vascular. Seus receptores estão presentes em células vasculares, musculares e leucócitos ativados como linfócitos T e macrófagos (69). De forma geral, o TNF- α não está presente nos cardiomiócitos, mas após uma lesão no miocárdio sua produção pode ocorrer através de macrófagos na zona de infarto e região peri-infarto (70).

Sua ação após a injúria cardíaca depende do tempo de isquemia cardíaca, que determina a quantidade de sua produção. Baixos níveis de TNF- α estão relacionadas a um efeito protetor no miocárdio, sendo essa ação intermediada através do receptor de TNFR2 (71). Por outro lado, em situações de estresse como no estado de infarto transmural ou de isquemia persistente, há grande liberação dessa citocina, podendo exercer um efeito tóxico sobre os cardiomiócitos através da ativação do TNFR1 (72).

Essa toxicidade ocorre principalmente pela estimulação da secreção de proteínas que induzem à apoptose, como FADD e TRADD, e pelo aumento da infiltração de neutrófilos pelo estímulo da expressão de VCAM-1 e ICAM-1 pelas células endoteliais (73). Além disso, estudos sugeriram que o TNF- α é capaz de desregular a função mitocondrial, levando ao acúmulo de EROs e aumento de cálcio intracelular, contribuindo para a disfunção celular de acordo com o mecanismo descrito anteriormente (74,75). Ainda, o TNF- α facilita a penetração do fator de transcrição NF- κ B para o núcleo das células, podendo regular a expressão gênica de células e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e o próprio TNF- α , através de feedback positivo (76,77).

Bradham et al. demonstrou em 2002 que o TNF- α é capaz de ativar metaloproteinases que realizam a degradação de colágeno da matriz extracelular, contribuindo para o remodelamento cardíaco patológico após o infarto do miocárdio (78). Além disso, outros autores sugerem que o envolvimento do TNF- α na fisiopatologia da IC ocorre devido a alterações no metabolismo intracelular, induzindo receptores beta-adrenérgicos e aumentando a concentração de EROs (79,80).

Em 2000, Ridker et al. demonstrou que os níveis de TNF- α podem servir como preditores de morte e risco de recorrência de eventos cardiovasculares após o infarto do miocárdio (81); Em 2001, Fichtlscherer et al. demonstrou que, em pacientes com Insuficiência Cardíaca (IC), a inibição do TNF- α através de agentes específicos esteve relacionado com melhora da disfunção endotelial (82), e Bozkurt et al. demonstrou melhora no remodelamento cardíaco patológico através dessa inibição (83). Em 2008, Dunlay et al. sugeriu que os níveis de TNF- α poderiam servir como marcador de riscos adversos em pacientes com IC (84), mas ensaios clínicos como o de Mann et al. falharam em demonstrar redução de morte ou hospitalização de pacientes com IC utilizando inibidores de TNF- α (85).

4.1.3.2 – Interleucina 6

A Interleucina-6 (IL-6) é uma citocina produzida principalmente pelo fígado, sendo considerada essencial para a fase aguda da resposta inflamatória. Através de sua atuação, é capaz de promover a ativação e proliferação de linfócitos, diferenciação de células B, recrutamento de leucócitos e regulação na síntese de proteínas de fase aguda como fibrinogênio e albumina (86).

Estudos experimentais demonstraram que as células endoteliais e musculares lisas também são capazes de produzir IL-6 (84,87,88), sendo que sua expressão gênica pode estar relacionada a formação de placas ateroscleróticas, podendo exercer um efeito pró-coagulante e pró-trombótico (86,89).

Há poucos relatos na literatura que avaliaram o papel específico da IL-6 após o infarto do miocárdio, e os resultados atuais permanecem controversos (90). Os estudos de Fredj et al. e Sano et al. demonstraram que os níveis de IL-6 estavam relacionados com o processo de fibrose e hipertrofia ventricular (91,92). Em 2008, Karpiński et al. também demonstrou que os níveis plasmáticos de IL-6 estavam relacionados com o tamanho da área de infarto, além de estarem relacionados com o desenvolvimento de disfunção cardíaca em pacientes após o infarto do miocárdio (93).

Em 2010, Kobara et al. demonstrou em ratos que o uso de um anticorpo contra o receptor de IL-6 foi capaz de reduzir o remodelamento cardíaco (94). Por outro lado, Fuchs et al. observou que a perda genética de IL-6 não alterou o tamanho de infarto, a função ventricular e o processo de dilatação patológica em um modelo de infarto do miocárdio sem reperfusão (95). Apesar da escassez de estudos e dos resultados conflitantes, acredita-se que a IL-6 pode ser um alvo terapêutico para prevenção e preservação da função contrátil do coração após o IAM sem reperfusão (96).

4.1.3.3 – Interleucina 1

A família da Interleucina-1 é composta por 11 citocinas, dentre as quais a mais conhecida é a Interleucina-1 β (IL-1 β). A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por monócitos, macrófagos e células dendríticas, embora possa também ser secretada, em menores quantidades, por linfócitos B e células natural killer. Sua regulação ocorre principalmente pelo complexo Inflamassoma NLRP3 (97).

Os principais mecanismos pelos quais a IL-1 β exerce sua função estão relacionados à estimulação de fatores de crescimento vascular (98), inibição da proliferação de células endoteliais (99) e expressão de moléculas de adesão pelo endotélio, o que pode favorecer o processo de trombose luminal (100,101). Por esse motivo, a atividade biológica da IL-1 β é considerada como o principal modelo de resposta inflamatória no organismo, sendo sua ação reconhecida devido à importância no gatilho para a resposta inflamatória frente a processos infecciosos.

A IL-1 β também possui um importante papel na fisiopatologia da aterosclerose. A velocidade de formação da placa aterosclerótica, sua progressão e possível ruptura estão relacionados ao grau de inflamação presente na placa (97). Estudos prévios já demonstraram que a IL-1 β está associada tanto ao processo de formação da placa de ateroma quanto ao seu processo de ruptura, que usualmente leva à oclusão vascular (102,103). Em 2006, Chamberlain et al. demonstrou que a atividade da IL-1 β esteve relacionada à formação arterial neointimal (109), e Bhaskar et al. observou pela primeira vez que o uso de um anticorpo específico contra a IL-1 β foi capaz de reduzir a progressão da placa aterosclerótica (108).

A IL-1 β desempenha um importante papel na modulação da resposta inflamatória após o infarto do miocárdio, estando diretamente envolvida na patogênese do processo de remodelamento ventricular patológico, havendo diversos mecanismos propostos para justificar sua participação na deterioração da função cardíaca. Em 1999, Liu et al. observou que a IL-1 β gerou redução da resposta de canais de cálcio dependentes ao estímulo beta-adrenérgico nos cardiomiócitos, justificando a perda de função cardíaca (106). Em 2002, Combes et al. sugeriu que a IL-1 β poderia diminuir a expressão de genes fundamentais para a regulação da homeostasia do cálcio, principalmente no retículo sarcoplasmático (107).

Outros estudos sugeriram que a IL-1 β pode atuar aumentando a expressão dos níveis de óxido nítrico sintetase (NOS) pelos cardiomiócitos, levando a uma produção aumentada de óxido nítrico, diminuição da produção de energia celular e consequentemente disfunção de contratilidade cardíaca, através de um ataque direto à superfície mitocondrial (108,109). Além disso, Bujak et al. observou em um modelo animal que a IL-1 β foi capaz de estimular metaloproteinases, com consequente

aumento da degradação de colágeno, contribuindo para o remodelamento cardíaco após uma lesão isquêmica no coração (110).

Em 2013, Van Tassel et al. , em um modelo experimental de infarto, demonstrou que a injeção única ou múltipla de IL-1 β em ratos previamente saudáveis foi capaz de produzir uma disfunção sistólica e diminuição da capacidade sistólica ventricular (111). Em outro estudo, o mesmo autor avaliou no miocárdio os efeitos da IL-1 β circulante, injetando em ratos saudáveis três tipos de plasma: em um grupo, os animais receberam plasma de pacientes com sinais e sintomas de insuficiência cardíaca aguda, no segundo grupo os animais receberam plasma de pacientes com insuficiência cardíaca estável e no terceiro grupo os animais receberam plasma com anticorpo anti-IL-1 β . Os resultados demonstraram deterioração da função cardíaca sistólica e diastólica nos grupos que receberam plasma de pacientes com insuficiência cardíaca, seja ela aguda ou crônica, e os efeitos de depressão miocárdica não foi observado em ratos que receberam o plasma com os anticorpos anti-IL-1 β (112).

Em função de sua importante atuação na resposta inflamatória após o infarto do miocárdio, diversos estudos têm direcionado o bloqueio de sua ação como forma de preservar a função contrátil do coração após uma injúria isquêmica. Alguns agentes já foram desenvolvidos com objetivo de bloquear o receptor ou bloquear diretamente a IL-1 β no contexto das doenças cardiovasculares, sendo os mais estudados até o momento o Anakinra e o Canakinumab (97).

O Anakinra é um bloqueador do receptor de IL-1, que através de um mecanismo de competição é capaz de bloquear os efeitos biológicos da IL-1 β . O *US Food and Drug Administration* (FDA) aprovou seu uso em 2001 para o tratamento da artrite reumatoide (113) e, a partir de então, passou a ser estudado no contexto de diversas doenças autoimunes como febre do mediterrâneo, artrite idiopática juvenil, doença de still e diabetes (114–116). A principal desvantagem de seu uso consiste no aumento do risco de infecções e reação dermatológica em seu sítio de aplicação na pele. Sua administração pode ocorrer com a dose de 100mg subcutânea a cada 24 horas, ou a cada 48 horas em pacientes com disfunção renal (117). Devido à sua aprovação precoce pelo FDA, é atualmente a droga mais utilizada na prática clínica (113).

O Canakinumab é um anticorpo monoclonal anti-IL-1 β , capaz de inativar a IL-1 β circulante e impedir sua ligação aos seus receptores (118). O canakinumab possui

aprovação do FDA para o tratamento de síndromes associadas à criopirina, mas diversos estudos demonstraram sua eficiência no tratamento de doenças inflamatórias como gota, diabetes, artrite reumatoide, uveíte e febre familiar do mediterrâneo (119–121). Sua principal vantagem em relação ao anakinra é em relação ao intervalo de aplicação, que é de 3 meses; apesar disso, também apresenta a infecção como um dos principais efeitos (122). Tanto o anakinra quanto o canakinumab já foram avaliados no contexto das doenças cardiovasculares, especialmente em pacientes após o infarto do miocárdio ou em pacientes com diagnóstico de insuficiência cardíaca (Tabela 01).

4.2 O complexo Inflamassoma NLRP3

4.2.1 Receptores de reconhecimento do sistema imune

As células do sistema imunológico possuem receptores específicos denominados receptores de reconhecimento de padrão (RRP), responsáveis pela monitorização dos espaços intra e extracelulares, sendo capazes de detectar moléculas estruturais de microorganismos, toxinas ou fragmentos de DNA; essas moléculas podem ser genericamente denominadas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou moléculas associadas ao dano tecidual (DAMPs) (123).

Existem basicamente cinco grandes famílias de RRP, que atuam de forma conjunta para reconhecer sinais de estresse produzidos pelas células durante uma infecção ou injúria celular. São eles: *Toll-like receptors* (TLRs), *C-type lectin receptors* (CLRs), *retinoic acid inducible gene-1 like receptors* (RLRs), *absent-in-melanoma-like receptors* (ALRs) e *nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors* (NLRs) (124,125).

Esses receptores podem estar localizados na membrana plasmática ou no citoplasma celular. Quando estiverem presentes na membrana, esses receptores são denominados *Toll Like Receptors*, sendo responsáveis por gerar uma resposta inflamatória por meio da ativação do fator de transcrição NF- κ B e enzimas citoplasmáticas, principalmente relacionadas à via de ativação das enzimas da família MAPk. A ativação dos TLRs culmina principalmente na produção de IL-1, TNF- α , IL-12, IL-6, quimiocinas (CCL2, CCL4 e CXCL10) e proteases como collagenases e elastases (126–128).

Tabela 01: estudos avaliando a inibição da Interleucina-1 β após o infarto ou IC.

ESTUDO	POPULAÇÃO	METODOLOGIA	DESFECHO
VCU-ART Trial I	10 pacientes com infarto do miocárdio prévio (supra de ST), após terapia de reperfusão.	Duplo-cego, randomizado: Anakinra 100mg/dia ou placebo, durante 14 dias.	Melhora de parâmetros ventriculares através da ressonância magnética e ecocardiograma, após 3 meses de acompanhamento.
VCU-ART Trial II	30 pacientes com infarto do miocárdio prévio (supra de ST), após terapia de reperfusão.	Duplo-cego, randomizado: Anakinra 100mg/dia ou placebo, durante 14 dias.	Sem diferença significativa na fração de ejeção e nos volumes sistólico e diastólico finais do ventrículo esquerdo após 3 meses de acompanhamento.
VCU-ART Trial III	99 pacientes com infarto do miocárdio prévio (supra de ST), após terapia de reperfusão	Duplo-cego, randomizado: Anakinra 100mg 1x/dia ou 100mg 2x/dia ou placebo, durante 14 dias.	Diminuição nos níveis de proteína C reativa, diminuição na incidência de insuficiência cardíaca e hospitalização por sintomas de IC aguda após 1 ano de acompanhamento.
MRC-ILA Heart Study	186 pacientes com infarto do miocárdio prévio (sem supra de ST).	Duplo-cego, randomizado: Anakinra 100mg/dia ou placebo, durante 14 dias.	Redução em marcadores inflamatórios, sem diminuição do tamanho do infarto em 30 dias e 3 meses de acompanhamento.
CANTOS trial	10.061 pacientes com infarto do miocárdio prévio e níveis de proteína C reativa > 2mg.	Multicêntrico, duplo-cego, randomizado: Canakinumab (50mg, 150mg ou 300mg) ou placebo, durante 3 meses.	Diminuição em 15% de morte cardíaca, infarto ou AVC e tendência de melhora em todas as causas de mortalidade em pacientes que receberam a dose de 150mg, durante 3,75 anos de acompanhamento.
AIR-HF	7 pacientes com IC sistólica (classe funcional II ou III) e níveis de proteína C reativa > 2mg.	Aberto, não-randomizado: Anakinra 100mg/dia, durante 2 semanas.	Redução nos níveis de proteína C reativa e melhora da capacidade aeróbia após duas semanas de acompanhamento.
ADHF	30 pacientes com IC sistólica descompensada e níveis de proteína C reativa > 5mg.	Duplo-cego, randomizado: Anakinra 100mg (2x/dia por 3 dias + 1x/dia por 11 dias) ou placebo, durante 2 semanas.	Redução nos níveis de proteína C reativa após 72 horas e após 14 dias de acompanhamento, além de tendência de melhora em sintomas congestivos e na fração de ejeção de pacientes que receberam Anakinra.
REDHART	60 pacientes com IC sistólica descompensada e níveis de proteína C reativa > 2mg.	Duplo-cego, randomizado: Anakinra 100mg/dia por 2 semanas ou 100mg/dia por 12 semanas ou placebo, durante duas semanas.	Redução nos níveis de proteína C reativa, melhora na capacidade aeróbia e tendência de melhora em admissões por IC aguda, em pacientes que receberam o tratamento por 12 semanas.
D-HART	12 pacientes com IC de fração de ejeção preservada.	Duplo-cego, randomizado: Anakinra 100mg/dia ou placebo, durante 14 dias, com inversão dos tratamentos após 14 dias.	Redução nos níveis de proteína C reativa e melhora na capacidade aeróbia em pacientes que receberam Anakinra.

Fonte: O autor (2020)

Por outro lado, quando os PPRs estiverem presentes no citoplasma celular, serão denominados de NLRs, atuando na segunda linha de defesa para o hospedeiro. Os receptores NLRs são compostos por três estruturas funcionais: um domínio central de oligomerização (NATCH), um domínio C-terminal rico em repetições de leucinas (LRR) e um domínio N-terminal responsável pela transdução de estímulos, com subdomínios CARD (*Caspase activation and recruitment domain*) ou PYD (*pyrin domain*) (129). Esses subdomínios são responsáveis por desencadear respostas imunes específicas, fazendo com que os NLRs sejam ainda subdivididos em outros subtipos, como NLRP1, NLRP3, NAIP e NLRC4 (130). Cada um possui a capacidade de ser ativado especificamente por determinados grupos de PAMPs e/ou DAMPs, e sua ativação leva à formação de complexos proteicos citoplasmáticos denominados inflamassomas. O subtipo de receptores cujo mecanismo funcional é melhor compreendido é o NLRP3 (18,130).

4.2.2 Ativação do inflamassoma NLRP3

Após o sinal de ativação e oligomerização do complexo NLRP3 por uma PAMP e/ou DAMP, ocorre recrutamento e maturação das enzimas caspases, que ao realizarem um processo de autoclivagem, induzem a ativação das IL-1 β e IL-18, liberadas para o meio extracelular através de canais criados na membrana citoplasmática (131).

Entretanto, para que a ação do inflamassoma NLRP3 seja exercida, são necessários dois mecanismos de ativação complementares (17). O primeiro mecanismo está relacionado à estimulação dos TLRs através de PAMPs ou DAMPs, que desencadeiam uma cascata de sinalização intracelular que culmina na ativação e translocação do fator de transcrição NF-kB para o núcleo celular (132). Uma vez presente no núcleo, o NF-kB estimula a transcrição de pró-IL-1 β , pró-IL-18 e regula positivamente a expressão da enzima NLRP3 (16). No contexto das doenças cardiovasculares, esse primeiro sinal é de fundamental importância, pois os componentes necessários para a oligomerização das enzimas e proteínas do complexo NLRP3 não são expressados fisiologicamente pelos cardiomiócitos, sendo necessária essa expressão regulada pelo NF-kB (14).

O segundo mecanismo de ativação do complexo NLRP3 consiste na clivagem dos precursores previamente estimulados pela ação do NF-kB. A presença de DAMPs ou estímulos como aumento na concentração de EROs, ATP extracelular, efluxo de

potássio, cristais de ácido úrico e proteínas nucleares como HMGB1 são capazes de desencadear a ativação e oligomerização intracelular do complexo NLRP3 (140).

Conforme citado anteriormente, os NLRs são constituídos por três regiões funcionais, sendo que no inflamassoma NLRP3 o domínio N-terminal responsável pela transdução de estímulos possui um subdomínio PYD. Por outro lado, a enzima pro-caspase-1 possui um subdomínio CARD e, portanto, para que ocorra a interação entre a proteína NLRP3 e a pro-caspase-1, necessita-se de uma proteína de adaptação (ASC), que possui os domínios PYD e CARD (134,135). Essa proteína adaptadora se liga à NLRP3 através de seu domínio PYD e, no lado oposto, a presença de seu domínio CARD permite o recrutamento da caspase-1, via interação CARD-CARD. Após essa interação e oligomerização do complexo, a caspase-1 realiza um processo de autoclivagem e assim torna-se capaz de ativar as IL-1 β e IL-18. Além disso, a caspase-1 também desencadeia o processo de morte celular mediada pela ativação de gasdermina-D, em um processo denominado piroptose (17,136). O processo de ativação completa do inflamassoma NLRP3 está demonstrado na figura 02.

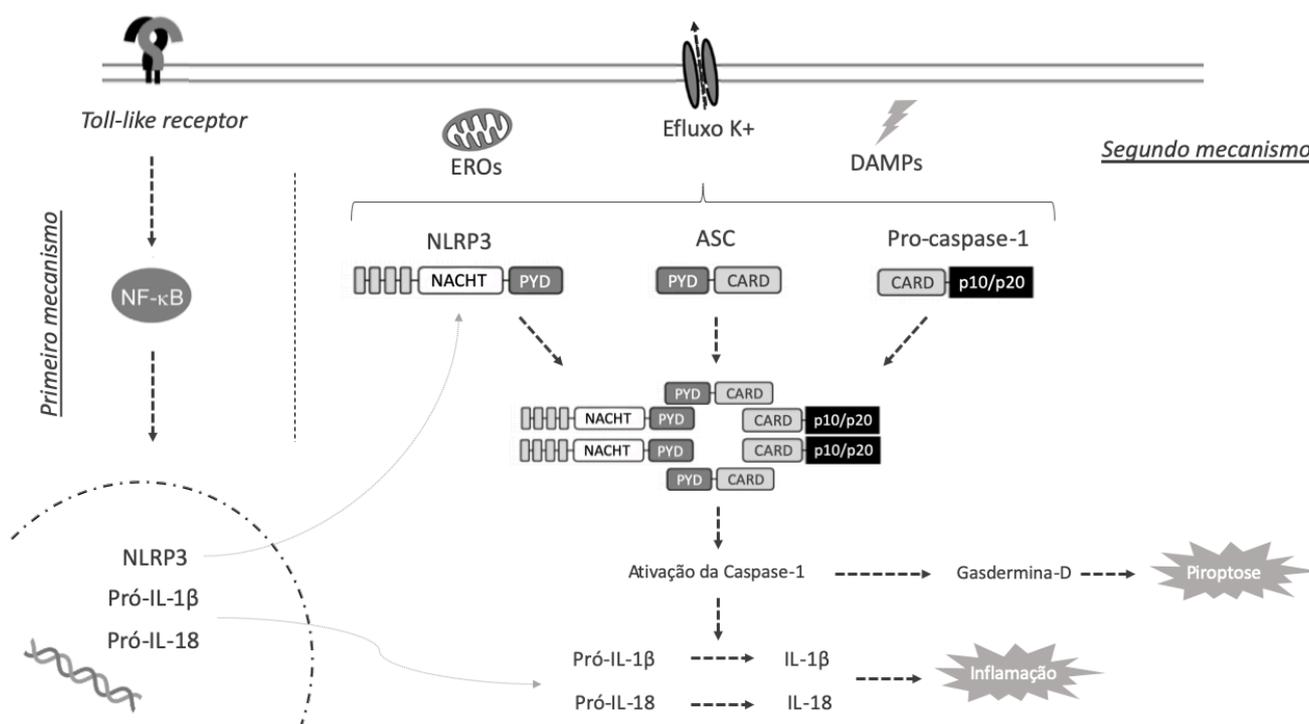


Figura 02. Processo de ativação do Inflamassoma NLRP3. Dois sinais são necessários para a ativação do complexo NLRP3. O primeiro envolve a estimulação dos *Toll-like receptors* e ativação do NF- κ B, que estimula a transcrição de NLRP3, pro-IL-1B e pro-IL-18. O segundo sinal depende do estímulo de DAMPs, efluxo de potássio ou EROs, que estimulam a oligomerização do complexo NLRP3 (modulado via ASC) e ativação da Caspase-1, com posterior liberação de IL-1 β , IL-18 e morte celular por piroptose. Adaptado de Takahashi, 2018.

4.2.3 Estudos envolvendo o complexo NLRP3

Diversos estudos já associaram a atividade do complexo NLRP3 com a patogênese de doenças autoimunes e metabólicas, como diabetes tipo 2, gota, doença de Alzheimer, aterosclerose e doença inflamatória intestinal (137–141). Recentemente, também foi revelado um importante papel do Inflamassoma NLRP3 na modulação da resposta inflamatória no contexto das doenças cardiovasculares (14,135,142).

A primeira sugestão de que o inflamassoma NLRP3 poderia ser um alvo terapêutico após o infarto do miocárdio ocorreu a partir do estudo de Kawaguchi et al. em 2011. Seus resultados sugeriram, inicialmente, que a neutralização da IL-1 β poderia reduzir a injúria após um evento isquêmico (143). A partir de então, outros estudos passaram a avaliar a inibição do complexo NLRP3 ou de suas enzimas e citocinas como um alvo possível terapêutico para o tratamento das doenças cardiovasculares.

Diversos relatos demonstram que o NLRP3 está envolvido diretamente relacionado à fisiopatologia da resposta inflamatória após o infarto agudo do miocárdio, e a atividade exacerbada deste complexo após uma injúria isquêmica está associada com a deterioração da função cardíaca e remodelamento ventricular patológico (132,144,145). Apesar disso, nenhum inibidor específico está disponível para seu uso clínico, o que faz com que novos estudos com potenciais agentes terapêuticos sejam realizados para avaliar uma possível modulação do complexo NLRP3 após o IAM (14). A tabela 02 reúne os principais que avaliaram a inibição farmacológica desse complexo no contexto das doenças cardiovasculares.

Tabela 02: principais estudos avaliando a inibição do complexo NLRP3 após o infarto do miocárdio.

AGENTE	DOSE/MODELO	MECANISMO DE ATUAÇÃO	DESFECHO
16673-34-0	100 mg/kg antes ou 60-180 minutos após reperfusão ou dose diária nos grupos de isquemia permanente.	Inibição da oligomerização do complexo NLRP3	Diminuição do tamanho de infarto nos grupos isquemia-reperfusão, melhora do remodelamento cardíaco e redução da atividade da caspase-1
BAY 11-7082	130 µg/kg entre 10-30 minutos previamente à indução de isquemia em modelo de isquemia-reperfusão	Inibição da NLRP3 ATPase e NF-κB	Redução no tamanho do infarto, preservação da função cardíaca e redução na atividade do complexo NLRP3
COLCHICINA	0,1 mg/kg/dia uma hora após a indução do infarto durante 7 dias em um modelo de isquemia permanente.	Inibição do P ₂ X ₇ , da polimerização da ASC e da liberação de IL-1β	Melhora na função cardíaca e diminuição do remodelamento cardíaco, redução do tamanho do infarto e redução da atividade do complexo NLRP3
INF4E	50µM 20 minutos antes da indução de isquemia em modelo de isquemia-reperfusão	Inibição da NLRP3 ATPase	Redução do tamanho de infarto, melhora da contração cardíaca e redução da atividade do complexo NLRP3
MCC 950	3-6 mg/kg administrado 15 minutos antes da reperfusão, repetido a cada 24 horas durante 5 dias em modelo de isquemia-reperfusão	Inibição da oligomerização do complexo NLRP3	Diminuição da resposta inflamatória local e sistêmica, redução no tamanho do infarto e melhora no remodelamento cardíaco
OLT1177 (DAPANSUTRILE)	6, 60 e 600mg/kg ou após 60, 120 ou 180 minutos após a reperfusão em um modelo de isquemia-reperfusão	Inibição da NLRP3 ATPase (104)	Redução no tamanho do infarto e melhora da função cardíaca
MUSCONA	2mg/kg após o sétimo dia da indução de isquemia durante 3 semanas, em um modelo de isquemia sem reperfusão	Inibição do NF-κB	Diminuição nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, melhora na função cardíaca e diminuição da atividade do complexo NLRP3
LINAGLIPTINA	83mg/kg 1 semana previamente à isquemia em um modelo de isquemia-reperfusão	Inibição do DPP4	Melhora da função cardíaca, redução do tamanho de infarto e diminuição da atividade do complexo NLRP3

Fonte: O autor (2020)

4.3 História natural do IAM

Apesar dos avanços das terapias de revascularização para o tratamento da fase aguda do infarto miocárdio terem melhorado de forma significativa o prognóstico dos pacientes vítimas do IAM, essa doença ainda é causa de grande morbidade e mortalidade após o evento agudo. O tempo desde o início dos sintomas (oclusão da

artéria coronária) até a revascularização do miocárdio, através de terapia de reperfusão química ou mecânica, é primordial para que as consequências do infarto sejam amenizadas a curto e a longo prazo (146). Apesar disso, somente 20% desses pacientes conseguem chegar ao setor de emergência em até 2 horas após o início dos sintomas, sendo que 40-65% dos indivíduos vão a óbito na primeira hora após a oclusão (147,148).

Por esse motivo, e pela incapacidade de as terapias atuais reestabelecerem a contratilidade dos cardiomiócitos, a evolução para a forma crônica da doença, caracterizada pela insuficiência cardíaca (IC), é inevitável em grande parte dos casos (149,150). Dados da *American Heart Association* demonstraram que cerca de 21% dos indivíduos vítimas de infarto e com idade superior a 45 anos desenvolvem IC em um período de 5 anos (151).

4.4 Insuficiência Cardíaca

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica de caráter sistêmico e multifatorial, definida pela incapacidade do coração em bombear o sangue de forma efetiva a suprir as necessidades metabólicas do organismo, sendo considerada a consequência final de quase todas as cardiopatias (152). Sua incidência vem aumentando nas últimas décadas, atingindo cerca de 23 milhões de pessoas no mundo atualmente. Dados da *American Heart Association* estimam a ocorrência de 900.000 novos casos de IC somente nos Estados Unidos por ano (153), com projeções de aumento de incidência em até 46% até 2030, resultando em cerca de 8 milhões de pessoas acometidas (49).

As etiologias de IC diferem de acordo com as regiões do mundo. Qualquer condição capaz de alterar a estrutura ou a função ventricular pode ser causa de IC, sendo as principais: doença arterial coronariana, hipertensão arterial sistêmica, miocardiopatias (principalmente relacionadas a drogas quimioterápicas), doenças valvares e doença de Chagas (152,154).

4.4.1 Medidas gerais e tratamentos farmacológicos

A dieta é fundamental para o controle da IC. Pacientes portadores de sintomas congestivos devem ter a dieta restrita de sal, recomendando-se uma ingestão de 4-6 gramas de sal ou 2-3 gramas de sódio por dia (152). Além disso, o controle de possíveis

fatores descompensantes como infecções de via aéreas, obesidade e tabagismo também é importante para o adequado controle da doença (164).

O tratamento farmacológico é outro importante pilar no tratamento de IC. Algumas classes de drogas são capazes de aumentar a sobrevida desses pacientes, como inibidores da enzima conversora de angiotensina, betabloqueadores, antagonistas da aldosterona, associação de hidralazina+nitrato e bloqueadores do receptor de angiotensina II (152,158–160). Essas drogas são responsáveis pelo controle neuro-hormonal sobre o miocárdio e otimização da hemodinâmica cardíaca, devido ao estado pró-inflamatório presente na IC.

Outras drogas como os diuréticos de alça, tiazídicos, digitálicos e aminas inotrópicas são capazes de aliviar os sintomas de IC, mas não são capazes de aumentarem a sobrevida (161). Mais recentemente, os inibidores do *sodium-glucose co-transporter 2* (SGLT2), uma classe de medicamentos já utilizada para o tratamento do *diabetes mellitus*, também se demonstrou promissora para o tratamento da IC, atuando através da inibição da reabsorção de glicose nos túbulos proximais do néfron e reduzindo a mortalidade em pacientes diabéticos portadores de IC (162,163).

4.4.2 Revascularização do miocárdio

Em pacientes com IC de etiologia isquêmica, a revascularização precoce é capaz de trazer benefícios na redução da mortalidade, principalmente por permitir a restauração do fluxo sanguíneo para a região de isquemia. A forma de revascularização pode ser percutânea ou cirúrgica, sendo que ambas são capazes de aumentar a sobrevida desses pacientes (171,174)

4.4.3 Dispositivos de Assistência Ventricular

Outra alternativa de tratamento para a IC foi encontrada nos dispositivos de assistência ventricular ainda na década de 1980. A principal função destes dispositivos é permitir um descanso ao músculo cardíaco: o dispositivo bombeia o sangue proveniente do átrio esquerdo diretamente para a aorta, diminuindo a utilização das fibras musculares no ventrículo esquerdo (166). Dessa forma, ele é capaz de proporcionar melhora na qualidade de vida e aumento na probabilidade de sobrevida até que o transplante cardíaco seja instituído (167,168). No Brasil, o primeiro caso foi

descrito em 1994, em um paciente portador de cardiomiopatia chagásica que recebeu um dispositivo de assistência ventricular como ponte para o transplante cardíaco (169).

Existem indicações específicas para o uso desses dispositivos, que variam de acordo com a condição clínica do paciente e as morbidades associadas (170). O INTERMACS (*Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support*) é um registro clínico criado em 2005 nos Estados Unidos e que reúne dados de pacientes com insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida e que são candidatos ao uso de algum dispositivo de assistência ventricular. Esse registro possui, atualmente, dados de aproximadamente 15.000 pacientes de 158 hospitais, e demonstra que após um ano a sobrevida é de aproximadamente 80% em pacientes que recebem dispositivo com fluxo contínuo (170,171).

Apesar disso, diversas complicações estão associadas ao seu uso, como sangramento, arritmias, trombose de dispositivo, infarto do miocárdio e AVC (172). Além disso, o número de implantes desses dispositivos no Brasil é substancialmente menor que nos Estados Unidos e na Europa, e isso deve-se aos custos diretos e indiretos do implante, que chegam a valores superiores a R\$ 500.000,00 por paciente (173). Alguns pesquisadores brasileiros já idealizaram dispositivos nacionais com o objetivo de proporcionar um suporte cardíaco com custo acessível ao SUS, como o DAV e o K-Pump (174,175). Entretanto, ainda não chegaram a ser produzidos de forma industrial.

4.4.4 Transplante Cardíaco

Apesar de todas as opções descritas acima serem consideradas como formas de tratamento ou de suporte para a IC, nenhuma delas é capaz de restaurar a contratilidade dos cardiomiócitos, sendo o transplante cardíaco o único tratamento considerado curativo para a IC (176,177). O primeiro transplante cardíaco ocorreu em 03 de dezembro de 1967, na África do Sul, realizado pelo cirurgião Christiaan Barnard (178). Meses depois, no Hospital de Clínicas da Universidade de São Paulo, o cirurgião Euryclides Zerbini realizou pela primeira vez o procedimento no Brasil (179).

Desde então, houve um aumento expressivo no número de transplantes cardíacos e os resultados com a cirurgia melhoraram de forma significativa, principalmente devido às melhoras nas técnicas cirúrgicas, eficácia da terapia imunossupressora e tratamento das infecções associadas. Atualmente, a sobrevida

média do paciente submetido ao transplante cardíaco é de aproximadamente 60% em seis anos (176). Apesar disso, a oferta de órgãos ainda é o principal fator limitante no Brasil e no mundo.

Dados da UNOS (*United Network for Organ Sharing*) revelam que a fila de espera é de aproximadamente 18 meses nos Estados Unidos. Durante esse período, 10-20% dos pacientes têm morte súbita e 25% pioram gravemente do quadro clínico, aumentando o número de internações (180–182). No Brasil, dados da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO) demonstraram que, no ano de 2019, foram realizados 380 transplantes cardíacos no país (183) .

Ainda, esses pacientes usualmente possuem morbidades associadas que são consideradas como contra-indicações ao transplante, como hepatopatia, nefropatia ou pneumopatias severas e irreversíveis, doenças psiquiátricas, doença vascular periférica acentuada e neoplasias (184). Esse cenário tem estimulado o estudo de terapias alternativas com potencial de regeneração tecidual após uma injúria no miocárdio.

4.5 Uso de biomateriais e terapias celulares

Diversos tipos de agentes já foram estudados com a finalidade de reparação e recuperação do tecido cardíaco: células-tronco adultas e embrionárias, mioblastos esqueléticos, polímeros sintéticos, géis de colágeno humanos e não-humanos e tecidos descellularizados provenientes de cadáveres.

O material ideal deve ser não-imunogênico e com boa resistência, possibilitando a integração com o tecido hospedeiro e permitindo que seu mecanismo de atuação possa ser exercido, seja através da secreção fatores capazes de promover a proliferação e regeneração celular, ou através de uma estrutura tridimensional que realize uma integração célula-matriz, possibilitando a adesão, proliferação e diferenciação celular (185). Esses efeitos devem ocorrer a um baixo custo de obtenção e fácil aplicabilidade no modelo estudado, permitindo uma translação dos modelos animais para os ensaios clínicos.

4.6 Membrana amniótica

4.6.1 Estrutura básica e composição

A membrana fetal é composta por duas camadas: uma camada externa (córion), que está em contato com as células maternas, e uma camada interna, em íntimo contato com a superfície fetal. Durante a gestação, a membrana possui a função de facilitar a movimentação fetal, proteger o feto contra variações mecânicas provenientes do ambiente externo, favorecer o desenvolvimento pulmonar, muscular e crescimento fetal (45,186).

A membrana amniótica (MA) é uma estrutura resistente e elástica, sendo essas propriedades atribuídas a presença de colágenos tipo I e II, elastina (resistência) e colágeno tipo III (elasticidade). Ainda, a MA é uma superfície completamente avascular, sendo também desprovida de músculos ou linfonodos. Sua espessura pode variar de 0.02mm a 0.5mm em humanos, podendo ser dividida didaticamente em três camadas: camada epitelial, membrana basal e estroma avascular (48,200).

A camada epitelial é composta por células cuboides e com microvilosidades em sua porção apical, estando em íntimo contato com o fluído amniótico (189). A membrana basal é basicamente composta por tecido conjuntivo, com fibras de colágeno tipo IV, V e VII, proteoglicanos, fibronectina e laminina, que conferem a integridade da estrutura da MA (190). O estroma avascular é camada mais espessa, que pode ainda ser subdividida em porção compacta, fibroelástica e esponjosa (45).

4.6.2 Propriedades biológicas da MA

Diversas propriedades biológicas são atribuídas à MA, principalmente devido à variedade de componentes celulares e proteicos presentes em sua superfície. Uma de suas propriedades mais importantes é sua atividade anti-inflamatória e bactericida (45). Shimmura et al. demonstraram que a MA é capaz de inibir a atividade de linfócitos T após sua aplicação como *patch* (191), sendo esses resultados semelhantes aos encontrados por Park e Tseng (192) e Li et al., que demonstraram que as células epiteliais da MA são capazes de secretar fatores solúveis que inibem o sistema imune inato e adaptativo (193).

Outros estudos comprovaram essa ação bactericida ao demonstrar *in vitro* a ação eficaz da MA contra alguns germes como *Streptococcus* do grupo A, *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas* (207). Essa propriedade biológica pode também ser atribuída à capacidade da MA em se aderir a superfícies,

atuando como uma barreira mecânica contra os agentes infecciosos (204) e também aos fatores solúveis secretados pela membrana, como a lisozima e beta-lisina, sendo capaz de inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β (210).

Além de suas propriedades anti-inflamatórias e bactericidas, a MA também possui grande potencial de regeneração celular devido à presença de fatores de proliferação em sua superfície. Tahara et al. demonstrou através de técnica de imunofluorescência a capacidade da membrana amniótica em secretar fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento beta-1 (TGF- β 1) (198), e Koizumi et al., analisando membranas preservadas, também detectou a presença de TGF- β 1 e outros fatores como fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator de crescimento fibroblástico básico (BFGF) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF) (199).

Os fatores EGF e KGF estimulam a proliferação e migração de células epiteliais, possuindo um importante papel na cicatrização de feridas (200,201). Já o fator TGF- β 1 é capaz de atuar sobre os fibroblastos e miócitos, estimulando a produção de colágeno e inibindo enzimas como as metaloproteinases, que degradam o colágeno, sendo essa ação de fundamental importância durante o processo de remodelamento cardíaco patológico (217).

Em relação aos seus fatores imunogênicos, a MA não expressa quantidades significativas de moléculas MHC classe I (204–206) e nenhuma expressão de MHC classe II (45). Este fato faz com que a MA não induza uma resposta imunogênica no hospedeiro após seu implante.

Outra importante propriedade biológica da MA é ser uma fonte abundante de células-tronco mesenquimais (188,207). Essas células já demonstraram *in vitro* e *in vivo* sua propriedade de pluripotência, sugerindo um potencial de diferenciação nas três camadas germinativas (ectoderme, mesoderme e endoderme), podendo diferenciar-se em adipócitos, osteócitos, condrócitos, hepatócitos e células vasculares (223).

Além disso, a MA apresenta propriedades mecânicas importantes como permeabilidade, flexibilidade e elasticidade, podendo inclusive funcionar como um meio de cultura celular, permitindo a migração e diferenciação de diversos tipos de células após seu implante no hospedeiro, funcionando como um arcabouço celular (225).

Devido a essas propriedades biológicas, acredita-se que a MA realize seu mecanismo de atuação através de uma ação parácrina no tecido hospedeiro, podendo

promover a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular no tecido celular injuriado (227).

4.6.3 Métodos de preparação da MA

Por ser um material biológico proveniente de humanos, diversos cuidados são necessários para sua aplicação clínica/experimental, com objetivo de evitar a disseminação de doenças infectocontagiosas. De forma geral, as membranas são obtidas de gestantes submetidas ao parto cesáreo, para evitar uma possível contaminação com bactérias da flora vaginal, e com sorologias negativas para HIV, Hepatite B, Hepatite C, toxoplasmose e sífilis, seguindo padrões internacionais (186,214), adicionando rastreamento para doença de Chagas no Brasil. Esses testes usualmente são repetidos após 06 meses devido à possibilidade de janela imunológica das infecções.

Após a obtenção, seu processamento pode ser realizado através de diversas formas. A forma mais comum é através do processamento a fresco, em que a membrana é separada da placenta em um ambiente estéril e irrigada com solução salina isotônica. Após, realiza-se lavagem com a adição de antibióticos como penicilina e estreptomicina (230). Um outro método é o de criopreservação, que envolve o uso de nitrocelulose e lavagem com solução salina, uso de penicilina, estreptomicina e anfotericina B (217); na sequência, seu armazenamento ocorre em uma solução de glicerina a 4°C e preservação em uma substância crioprotetora a -80°C, permitindo seu uso por durante 5 anos (202). Adds, Hunt e Dart demonstraram em 2001 que ambas as formas de processamento (fresca ou criopreservada) resultam em uma boa eficácia (220).

Além disso, a MA pode ser utilizada em sua forma íntegra ou descelularizada, processo pelo qual ocorre a remoção de sua camada epitelial com preservação de sua estrutura tridimensional intacta, para diminuir ainda mais o potencial imunogênico da membrana. Diversos relatos já demonstraram que a membrana amniótica é capaz de preservar suas características intrínsecas mesmo após o processo de lavagem, esterilização e descelularização (218,221,222).

Atualmente, existem poucos conflitos éticos em relação à sua utilização como terapia tecidual. As membranas ovulares e as placentas usualmente são descartadas logo após o parto, o que torna aceitável o uso da MA para a pesquisa clínica (43). Sua

fácil obtenção e aplicação, associada à sua baixa imunogenicidade, propriedades anti-inflamatórias e uma estrutura tridimensional rica em colágeno e fibronectina tornaram a membrana amniótica um importante alvo de estudo na engenharia de tecidos.

4.6.4 Estudos com a membrana amniótica

O primeiro relato do uso da MA ocorreu em 1910, quando John Staige Davis a utilizou para o tratamento de doenças da pele (223). Trinta anos depois, seu uso foi descrito para a reconstrução conjuntival (224) e em 1946, Sorby e Symons avaliaram o uso da membrana amniótica para aplicação em queimaduras relacionadas à oftalmologia (43). Desde então, a MA passou a ser avaliada como alternativa terapêutica para afecções oftalmológicas, principalmente, e também para outras patologias da cavidade oral, otorrinolaringológicas e ortopédicas (45,188,213).

Quanto ao seu uso para o tratamento das doenças cardiovasculares, em especial após uma injúria isquêmica no coração, ainda existem controvérsias acerca de seus efeitos. Alguns estudos sugerem que sua ação possa ocorrer através de diferenciação direta em cardiomiócitos, enquanto outros autores afirmam que suas propriedades biológicas são exercidas através de mecanismos parácrinos, com uma função imunomodulatória capaz de estimular a angiogênese e a proliferação e sobrevivência das células subjacentes ao infarto (185).

Em 2001, Ventura et al. demonstraram que o transplante de células-tronco provenientes da membrana fetal, em ratos submetidos à isquemia miocárdica, resultou em uma diminuição no tamanho de infarto e melhora da função contrátil do coração após 28 dias de tratamento (225). Posteriormente, Cargnoni et. al utilizaram um patch de membrana amniótica que foi implantado diretamente ao miocárdio após ligadura da artéria coronária. Os resultados após 07 dias de transplante demonstraram uma melhor preservação das dimensões cardíacas, melhora da função e contratilidade cardíaca em comparação ao grupo do controle (226). Apesar disso, os efeitos atribuídos à membrana amniótica estiveram presentes somente até 60 dias, sendo que em 90 dias não houve diferença significativa entre os grupos que receberam MA e o grupo não tratado. Esse foi o primeiro modelo de implante direto da MA ao coração.

Em 2009, Fujimoto et al. demonstrou que o transplante de membrana amniótica proveniente de ratas foi eficaz em diminuir o tamanho do infarto, melhorar a função

cardíaca e diminuir o remodelamento ventricular após 6 semanas de acompanhamento (227). No ano seguinte, o estudo de Tsuji et al. também demonstrou melhora nos parâmetros ecocardiográficos e diminuição da área de infarto utilizando células-tronco provenientes da membrana amniótica, observando, adicionalmente, capacidade de diferenciação dessas células em cardiomiócitos (228). Resultados semelhantes foram demonstrados no estudo de Fang et al. em 2012, no qual o transplante da membrana amniótica proporcionou na melhora da função cardíaca, diminuição do tamanho do infarto e diferenciação em cardiomiócitos, mensurada através da expressão de cadeias de miosina pelas células amnióticas após 4 semanas do implante (229).

Além da capacidade de diferenciação e melhora da função cardíaca, Kim et al. demonstrou potencial angiogênico e estimulação da migração celular com o uso da membrana amniótica após o infarto do miocárdio em ratos (230). Essa capacidade de estimulação de neovasos também foi observada em 2015 no estudo de Song et al. em condições de hipóxia *in vitro* e em um modelo de isquemia miocárdica *in vivo* (231). No mesmo ano, Danieli et al. observou uma elevada secreção de citocinas pró-angiogênicas com o uso da membrana amniótica após o infarto do miocárdio em ratos (232).

Mais recentemente, o estudo de Roy et al. demonstrou que o uso da membrana amniótica acelular foi capaz de atenuar o remodelamento cardíaco após o infarto do miocárdio (46). Esses resultados também foram observados por Henry et al. utilizando um modelo injetável de entrega da membrana amniótica no miocárdio infartado (233). De forma oposta, o estudo de Gorjipour et al. demonstrou que a injeção de membrana amniótica após 04 semanas do infarto do miocárdio não foi capaz de reduzir o tamanho do infarto ou melhorar a função cardíaca, apesar de ter identificado marcadores de diferenciação para cardiomiócitos e células vasculares (234).

Em 2019, Khorramirouz et al. realizaram análise histológica e imunológica do uso da membrana amniótica após o infarto do miocárdio, demonstrando capacidade de regeneração de cardiomiócitos, estimulação da angiogênese e diminuição da resposta inflamatória (34). Em 2020, Uemura et al. demonstraram que o uso da membrana amniótica acelular em associação com nanopartículas de 15d-PGJ2 foi capaz de estimular angiogênese e reduzir a fibrose miocárdica, melhorando a função cardíaca e reduzindo o remodelamento cardíaco patológico (235).

4.7 Células-tronco

As células-tronco (CT) são células encontradas no organismo humano e que diferem das células somáticas por possuírem capacidade de auto-renovação (capacidade de gerar cópias de si própria), proliferação (capacidade infinita de divisão) e diferenciação em diversas linhagens celulares (40).

Didaticamente, as CT são classificadas de acordo com o seu potencial de diferenciação em outras linhagens celulares em: células-tronco totipotentes, pluripotentes e multipotentes. Ainda, também podem ser divididas de acordo com sua origem em: células-tronco embrionárias, células-tronco pluripotentes induzidas e células-tronco adultas (tabela 03).

4.7.1 Células-tronco embrionárias

São células derivadas da camada interna do blastocisto embrionário antes de sua implantação no útero, entre 5-7 dias após a fecundação, possuindo o potencial de se diferenciar em todas as camadas embrionárias (ectoderme, mesoderme e endoderme) (237). Sua descoberta inicial trouxe novas perspectivas para o campo da medicina regenerativa, mas posteriormente alguns fatores passaram a limitar seu uso na prática experimental e clínica. Os principais aspectos estão relacionados aos aspectos éticos no momento de sua coleta no blastocisto e às possíveis consequências imunológicas no hospedeiro pelo fato de serem agentes alogênicos, com necessidade de imunossupressão para seu uso terapêutico de forma adequada (238,239). Ainda, possuem grande potencial de malignidade devido à sua elevada capacidade de proliferação associada a altos índices de instabilidade cromossômica (257).

4.7.2 Células-tronco pluripotentes induzidas

Derivadas de células somáticas maduras através de indução *in vitro* por fatores específicos de transcrição que levam à expressão dos genes Oct4, Sox-2, c-Myc e Klf4 (31,242,243). Dessa forma, adquirem propriedades de células-tronco pluripotentes, com potencial de ação semelhante ao das células-tronco embrionárias devido à sua capacidade de auto-renovação, proliferação e diferenciação nas diferentes camadas germinativas. Esse grupo de células torna-se atrativo para uso em terapias celulares pelo

fato de serem facilmente obtidas *in vitro* e com grande potencial de expansão, podendo se diferenciar em diversos tecidos celulares (244,245). A grande limitação para o seu uso na prática clínica ocorre devido à sua possível instabilidade genômica ocasionada durante o processo de cultivo, com elevados riscos de teratogenia (257).

4.7.3 Células-tronco adultas

As células-tronco adultas são menos potentes que as células-tronco embrionárias e pluripotentes induzidas, pelo fato de sua capacidade de diferenciação em outros tecidos ser mais restrita, uma vez que essas células mantêm as características da camada embrionária de que foram originadas (247).

A medula óssea (MO) é a fonte mais tradicional de células-tronco adultas em humanos, principalmente por sua facilidade de aquisição e elevada concentração de células neste sítio, não requerendo terapias imunossupressoras para seu uso clínico (247). Além da MO, essas células também podem ser provenientes do tecido adiposo, polpa dental, glândulas salivares, cordão umbilical, placenta e fluido amniótico (31,248,249).

As células-tronco da medula óssea podem ser obtidas através da punção direta com agulha de biópsia em uma seringa heparinizada de diferentes localidades como a crista ilíaca (local mais comum de obtenção), esterno, tuberosidade do úmero e fêmur (31,250). Essas células podem se diferenciar de acordo com os estímulos do meio em que se encontram e podem sofrer dois processos de diferenciação: mononucleares ou multinucleares.

As células-tronco mononucleares podem ainda ser subdivididas na linhagem hematopoiética, que originará células do sangue (linfócitos, basófilos, neutrófilos, eritrócitos e plaquetas) e na linhagem mesenquimal, que possui potencial de originar células musculares, hepatócitos e tecido adiposo (251,252).

As células-tronco da linhagem mesenquimal, além de serem provenientes da medula óssea, também podem ser obtidas do tecido muscular, adiposo, sanguíneo, pele e cordão umbilical (253). Atualmente, não existe um biomarcador específico para sua identificação, e os diferentes meios para isolamento e expansão disponíveis dificultam a padronização de desfechos em ensaios clínicos. Por esse motivo, a Sociedade Internacional de Terapia Celular propôs em 2006 algumas características mínimas para

uma célula-tronco ser considerada como mesenquimal: capacidade de autorrenovação, potencial de diferenciação em tecidos osteogênicos, condrogênicos e adipogênicos *in vitro*, alta expressão de marcadores CD73, CD90, CD105 e baixa expressão de CD45, CD34 e CD14 (254).

Em relação às células-tronco mononucleares, sua principal vantagem para o uso em terapias de regeneração tecidual consiste no fato de serem facilmente obtidas e isoladas através de gradiente de densidade por centrifugação, sem necessidade de cultura para que seu uso possa ser exercido, diminuindo significativamente as chances de perda celular e infecção durante o processo de cultivo (255).

Tabela 03. Principais características das células-tronco

	Subtipo	Origem	Benefícios	Limitações
Células-tronco	Embrionárias	Provenientes da camada interna do blastocisto	Potencial de diferenciação nas três camadas embrionárias: ectoderme, mesoderme e endoderme	Problemas éticos, imunológicos e potencial de malignidade
	Pluripotentes induzidas	Derivadas de células somáticas maduras através da indução de fatores de transcrição específicos	Semelhante às células embrionárias, podendo ser facilmente obtidas <i>in vitro</i> e com grande potencial de expansão	Instabilidade genômica durante o processo de cultura e potencial teratogênico
	Adultas	Medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical, fluido amniótico, polpa dental	Diversidade de células, fácil obtenção, imunotolerância e poucas limitações éticas	Capacidade restrita de diferenciação em outras linhagens celulares
	Capacidade de diferenciação			
	Totipotentes	Qualquer tipo celular no organismo, incluindo os anexos embrionários.		
	Pluripotentes	Qualquer tipo celular no organismo, com exceção dos anexos embrionários.		
	Multipotentes	Poucas linhagens, com potencial de diferenciação reduzido.		

Fonte: O autor (2020).

4.7.4 Uso clínico e terapêutico das células-tronco

Os primeiros estudos com as células-tronco datam da década de 1990. Essa década foi conhecida como a década de ouro das células-tronco, em que se criou grande expectativa por parte dos pesquisadores e dos pacientes acerca dos potenciais de diferenciação das células-tronco em outros subtipos como tecido nervoso, sanguíneo, ósseo e cardíaco (36).

Apesar disso, não é consenso atual que as células-tronco exerçam sua função a partir de sua diferenciação em cardiomiócitos, mas sim através da secreção de fatores autócrinos e parácrinos no microambiente do infarto, a exemplo de fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento de hepatócitos, fator de crescimento semelhante à insulina tipo-1 e produção de fatores angiogênicos (256). Dessa forma, possuem capacidade de estimular a sobrevivência e proliferação celular após sua entrega ao miocárdio, além de estimular a formação de novos vasos (265).

Outros estudos sugeriram uma capacidade imunomodulatória das CT através da secreção de prostaglandina E2, óxido nítrico e TGF- β (258), suprimindo a ativação e proliferação de células pró-inflamatórias como linfócitos T e inibindo a maturação de células dendríticas após o infarto do miocárdio. Miteva et al. demonstrou a capacidade das CT em diminuir a mobilização de monócitos provenientes do baço através da redução da expressão da proteína CCL2 em um modelo de miocardite (259).

A eficácia terapêutica das células-tronco depende basicamente da sua sobrevivência após a entrega ao miocárdio. Depois de implantadas, as células-tronco precisam ter a capacidade de sobreviver, se multiplicar e diferenciar em um local metabolicamente alterado como o microambiente de hipóxia após o infarto do miocárdio. Essa capacidade varia principalmente de acordo com o método de entrega das células e o tipo de célula-tronco utilizada (185).

Atualmente, existem três principais formas de entrega das células: via intracoronária, intravenosa e intramuscular. A forma de entrega intravenosa é a forma mais fácil, devido a sua simplicidade e baixa invasividade, permitindo formas múltiplas e intermitentes de entrega. Apesar disso, alguns estudos apresentaram eficácia de 0% de retenção celular no miocárdio pelo fato de envolver a circulação sistêmica, podendo as células se depositarem em outros órgãos como pulmão e baço (260–262).

A via intracoronária possui a vantagem de entregar as células-tronco para a região subjacente à irrigação arterial escolhida, sendo um dos principais métodos praticados (263) logo após o infarto do miocárdio, pois pode ser realizada de forma simultânea com a revascularização percutânea da artéria acometida pelo infarto (264). A grande limitação desta técnica consiste no fato de não alcançar áreas não perfundidas, diminuindo também a sobrevivência e replicação das células-tronco neste microambiente. Em 2006, Kang et al. demonstrou que a via intracoronária apresentou

somente 1,5% de acúmulo de células após 2 horas de análise em pacientes com infarto do miocárdio (260).

A injeção intramuscular (intramiocárdica) é considerado um dos métodos com maior eficácia, por proporcionar a entrega de forma precisa na região acometida pela isquemia, podendo ser guiada por métodos de imagem ou por observação direta durante o ato operatório (265). Esse tipo de entrega pode ser realizado durante cirurgias abertas como a revascularização do miocárdio ou através de mini-toracotomias (266,267), sendo o acesso menos invasivo indicado principalmente para pacientes com insuficiência cardíaca e com capacidade funcional reduzida. Apesar de proporcionar uma entrega direta, a grande limitação consiste na perda significativa de células-tronco devido à contração cardíaca, que ainda assim é menor quando comparada a via coronariana (268).

Em relação aos estudos com células-tronco, Orlic et al. relatou em 2001 uma capacidade de diferenciação em cardiomiócitos com o uso terapêutico de células-tronco da medula óssea na região peri-infarto após a ligadura de artéria coronária em ratos (269). Além da diferenciação das células-tronco em cardiomiócitos, os autores reportaram melhora significativa da fração de ejeção nove dias após o implante no modelo animal. Em 2002, Strauer et al. demonstraram, em um ensaio clínico com 10 pacientes, uma melhora no tamanho do infarto e dos parâmetros ecocardiográficos após a entrega de células-tronco por via intracoronária durante a revascularização percutânea após o infarto (41), sugerindo que esta ação ocorreria através da formação de novos vasos e regeneração do tecido cardíaco. Apesar disso, em 2004 um grupo de pesquisadores contestou esses resultados, afirmando que as células-tronco não se diferenciavam em cardiomiócitos (270–272). Ainda assim, os estudos com células-tronco avançaram através de diversos ensaios clínicos ao redor do mundo.

Três importantes estudos foram o TOPCARE-AMI *trial* (*Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction*), BOOST *trial* (*Bone Marrow Transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration*) e REPAIR-AMI *trial* (*Reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodeling in acute myocardial infarction*), que demonstraram uma melhora na fração de ejeção em pacientes tratados com células-tronco da medula óssea após o infarto do miocárdio (273–275).

Esses resultados não foram observados nos estudos posteriores BOOST *trial-2*, TIME *trial* (*Late timing in myocardial infarction evaluation*), SWISS-AMI *trial* (*Swiss multicenter intracoronary stem cells study in acute myocardial infarction*), ASTAMI *trial* (*Autologous Stem-Cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction*), LEUVEN-AMI *trial* e HEBE *trial*, que não demonstraram melhora na fração de ejeção do ventrículo esquerdo com o uso de células-tronco provenientes da medula óssea (276–281).

Em função dos resultados conflitantes, surgiu o REGENERATE-AMI *trial*, um estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego, que avaliou os efeitos do transplante autólogo de células-tronco mononucleares dentro das primeiras 24 horas após o infarto do miocárdio em 100 pacientes. Os resultados demonstraram melhora não significativa na fração ejeção em comparação ao grupo placebo (282).

Em 2015, uma metanálise da Cochrane avaliou 41 estudos clínicos, envolvendo 2732 pacientes, para avaliar a eficácia das células-tronco no tratamento do infarto agudo do miocárdio. Os autores concluíram que não haviam evidências suficientes para declarar benefício com o tratamento celular para essa população de pacientes, sugerindo que estudos clínicos maiores fossem realizados para elucidar o potencial das células-tronco após o IAM (283).

No contexto da IC, os principais tipos de células-tronco utilizadas foram os mioblastos esqueléticos e as células-tronco da medula óssea (263). Em 2004, Carvalho et al. propuseram a co-cultura de células-tronco mesenquimais e mioblastos para a regeneração cardíaca em um modelo animal, demonstrando capacidade de angiogênese pelas células-tronco e miogênese com o uso de mioblastos (284). Esses resultados foram replicados posteriormente para avaliação de fibrose cardíaca (285).

Em 2005, Dib et al. realizaram o transplante de mioblastos esqueléticos em 30 pacientes com IC de origem isquêmica e que foram submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio, demonstrando melhora significativa na fração de ejeção após 2 anos de acompanhamento (286). Em 2008, surgiu o MAGIC *trial*, o primeiro estudo randomizado a avaliar o transplante de mioblastos em pacientes com disfunção sistólica, mas o estudo foi interrompido por não apresentar melhora significativa na função sistólica e por gerar aumento no número de arritmias cardíacas (287). Ainda em 2008, um outro estudo, SEISMIC *trial*, confirmou a eficácia do transplante de mioblastos

pela técnica percutânea em 26 pacientes mas não demonstrou melhora significativa na fração de ejeção após 6 meses de acompanhamento (288).

No ano de 2009, em um estudo similar ao SEISMIC *trial*, um total de 12 pacientes receberam mioblastos esqueléticos pela via percutânea, sendo denominado CAUSMIC *trial* (289), que demonstrou em seus resultados após 1 ano de acompanhamento que o transplante de mioblastos foi capaz de melhorar a qualidade de vida e reduzir a dilatação ventricular. Devido ao baixo número de pacientes avaliados no SEISMIC *trial* e no CAUSMIC *trial*, surgiu o MARVEL *trial*, um estudo multicêntrico, randomizado, com objetivo de avaliar a segurança e a eficácia do transplante de mioblastos pela via percutânea em 170 pacientes IC com fração de ejeção reduzida. Apesar de promissor, o estudo foi interrompido após 6 meses devido à questões financeiras (290).

Em relação ao uso de células-tronco da medula óssea em pacientes com IC, um dos primeiros estudos ocorreu em 2004, em que 14 pacientes com IC de origem isquêmica receberam essa população de células durante a cirurgia de revascularização do miocárdio, demonstrando melhora na função cardíaca após 10 meses de acompanhamento (40). Apesar disso, os resultados desse mesmo grupo de pesquisadores envolvendo o mesmo tipo celular em um número maior de pacientes (n=63) não demonstrou melhora significativa na função cardíaca (291).

Ao contrário desses resultados, o estudo conduzido por Stamm et al. demonstrou que o transplante de células-tronco da medula óssea foi capaz de melhorar a função cardíaca de forma significativa quando associada à cirurgia de revascularização do miocárdio após 6 meses de acompanhamento (292). De forma semelhante, o estudo de Perin et al. demonstrou melhora na fração de ejeção após 4 meses de acompanhamento em 21 pacientes com IC de origem isquêmica após o transplante de células-tronco da medula óssea (293).

Na sequência, o mesmo grupo de Perin et al. conduziu o FOCUS-CCTRN *trial* (*First mononuclear cells injected in the US conducted by the CCTRN*), envolvendo 92 pacientes com disfunção cardíaca e que receberam o transplante de CT da medula óssea, sendo que o transplante celular não foi capaz de melhorar a função cardíaca em comparação ao grupo placebo após 6 meses de acompanhamento (42).

Em 2016, metanálise de um grupo de pesquisadores da Cochrane avaliou o potencial das células-tronco para o tratamento da insuficiência cardíaca em 38 estudos

clínicos, envolvendo 1907 pacientes (294). Os autores concluíram que o uso de células-tronco para o tratamento da IC é capaz de reduzir a mortalidade e melhorar a fração de ejeção durante o curto e longo acompanhamento, sendo também capaz de reduzir a incidência de infarto do miocárdio e melhorando a qualidade de vida mensurada através da classificação de *New York Heart Association*.

Outros estudos avaliaram ainda uso de células-tronco para o tratamento de IC de etiologia chagásica. Em um modelo experimental, células-tronco mononucleares da medula óssea foram utilizadas após a indução de IC chagásica após a infecção por *T. Cruzi* (295). Os resultados demonstraram diminuição da inflamação cardíaca e diminuição da área de fibrose durante 2 meses de acompanhamento.

Em 2006, Guarita-Souza et al. avaliaram a co-cultura de células-tronco mesenquimais e mioblastos para o tratamento de IC chagásica em um modelo animal, demonstrando melhora significativa na função cardíaca e redução na dilatação ventricular após 30 dias de acompanhamento (296). Vilas-boas et al. avaliaram 28 pacientes com IC chagásica em 2006, demonstrando melhora na função cardíaca e nos sintomas congestivos após o uso de células-tronco mononucleares da medula óssea (297). Esses resultados não foram observados em um estudo subsequente que avaliou 90 pacientes com disfunção cardíaca de etiologia chagásica e que receberam a mesma terapia celular (298).

Desta forma, há consenso de que o benefício funcional de cada célula está diretamente relacionado à patologia de base onde a célula é transplantada. Ou seja, em modelos de infarto transmural, dificilmente houve um ganho funcional em decorrência de regeneração de cardiomiócitos, visto que as células-tronco não têm substrato para se diferenciar em cardiomiócitos. Da mesma forma que em modelos de isquemia miocárdica com miocárdio viável, as células-tronco realizam a formação de novos vasos o que resultam em benefício funcional (185).

5. ARTIGO

Bone-marrow mononuclear stem cells and acellular human amniotic membrane improves global cardiac function without inhibition of the NLRP3 Inflammasome in a rat model of heart failure

Paulo André Bispo Machado-Júnior¹ – paulo_vicmar@hotmail.com

Gustavo Gavazzoni Blume, MD¹ – gustavoblume@gmail.com

Rossana Baggio Simeoni, PhD¹ – rossanabaggio@gmail.com

Julio Cesar Francisco, PhD¹ - julio.apfr@gmail.com

Murilo Sgarbossa Tonial¹ – murilotonial@gmail.com

Luis Felipe Beltrão Marqueze² – luis_marqueze@hotmail.com

Lucia de Noronha, MD, PhD¹ - Inno.noronha@gmail.com

Marcia Olandoski, PhD¹ - bio.estadistica@pucpr.br

Eduardo Brunetti Cunha, PhD² - edubrunetti@hotmail.com

Ricardo Aurino de Pinho, PhD^{1,2} - rapinho12@gmail.com

Luiz César Guarita-Souza, MD, PhD¹ - guaritasouzalc@hotmail.com

1. Experimental laboratory of Institute of Biological and Health Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). 1555 Imaculada Conceição Street. Curitiba, State of Parana, Zip Code 80215-901
2. Laboratory of Exercise Biochemistry in Health, School of Medicine, Graduate Program in Health Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). 1555 Imaculada Conceição Street. Curitiba, State of Parana, Zip Code 80215-901.

**Post-graduation Program in Health Sciences – Pontifícia Universidade Católica do Paraná
(PUCPR)**

Corresponding author:

Paulo André Bispo Machado Júnior

School of medicine – Pontifícia Universidade Católica do Paraná

1555 Imaculada Conceição Street. Curitiba, State of Parana, Brazil. Zip Code 80215-901

Phone/Fax: +55 41 99818 5969

E-mail: paulo_vicmar@hotmail.com

CONFLICT OF INTEREST: The authors declare no conflicts of interest.

ABSTRACT

Background: The NLRP3 Inflammasome is a key regulator of the inflammatory response after myocardial infarction. Recent experimental studies had suggested that cell-based therapies with stem cells and human amniotic membrane can modulate the inflammation following an ischemic injury in the heart; however, the exact mechanisms underlying this association is still not clear. This study aimed to evaluate the possible relationship between the bone-marrow mononuclear stem cells (BMMC), the acellular human amniotic membrane (AHAM) and the NLRP3 complex after myocardial infarction in rats. **Methods:** Rats were submitted to myocardial ischemia through the ligation of the left coronary artery. After seven days, an echocardiographic evaluation was performed, and animals with ejection fraction < 50% were included and randomized into three groups: control (n=10), BMMC (n=11), and AHAM (n=8). The stem cells and the amniotic membrane were injected and implanted, respectively, on the anterior surface of the heart seven days after coronary occlusion. On the 30th day, the animals were again submitted to echocardiographic evaluations, followed by euthanasia and surgical excision of the heart for biochemical and histological analyzes. P values < 0,05 denoted statistical significance. **Results:** The groups were homogenous during the echocardiographic baseline analysis. After 30 days, both BMMC and AHAM groups had significant improvements in ejection fraction and showed decreased ventricular remodeling, and no significant changes were observed in the control group. Oxidative stress analysis was similar between the three groups, and the inflammatory parameters and the NLRP3 inflammasome activity were not decreased with the therapeutic use of both BMMC and AHAM, in comparison to the control group. **Conclusion:** Despite the improvements observed in global cardiac function, cell-therapy with BMMC AHAM was not able to suppress the NLRP3 inflammasome activity after 30 days of myocardial infarction.

Keywords: Heart failure; Stem cells; Amniotic membrane; NLRP3 inflammasome

1. INTRODUCTION

Acute myocardial infarction (AMI) remains the leading cause of cardiovascular death worldwide ¹, and despite the benefits of the current therapeutic strategies in ameliorating symptoms and improving patient survival rates, none of them can recover the contractility of the necrotic cardiomyocytes. Therefore, pathological ventricular remodeling and progression to heart failure are inevitable in most of the cases ².

Inflammation plays a major role in this process ³, and even though certain levels of the inflammatory response are necessary for the myocardial repairing, previous studies had shown that elevated levels of pro-inflammatory cells and cytokines may increase the myocardial dysfunction and contribute to ventricular remodeling and functional deterioration of the heart ^{4,5}.

The nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-Like-Receptor protein 3 (NLRP3 inflammasome), a multiprotein and cytosolic complex, has been recently appointed as the major regulator of the inflammatory response after AMI ⁶. This complex is usually activated by reactive oxygen species (ROS), extracellular ATP and potassium efflux after an ischemic injury in the heart ⁷, and its activity has been associated with the development of atherosclerosis and heart failure ^{8,9}. Thus, ameliorating the inflammatory response through the blockade of the NLRP3 activity had become a potential therapeutic target with the attempt to preserve the global cardiac function after AMI ¹⁰⁻¹².

Previous studies had already demonstrated the reduction of the inflammatory response using cell-based approaches with stem cells and human amniotic membrane after an ischemic injury in the heart, resulting in significant improvements of global cardiac function ¹³⁻¹⁵. Despite this, the exact mechanisms underlying this association are still not elucidated. In this study, we assessed the hypothesis that both bone-marrow mononuclear stem cells (BMMC) and acellular human amniotic membrane (AHAM) would preserve the cardiac function and reduce the left-ventricular remodeling process through the inhibition of the NLRP3 Inflammasome in a model of chronic myocardial infarction in rats.

2. MATERIALS AND METHODS

All experiments were conducted following the standards and ethical principles of the Brazilian College of Animal experimentation (COBEA), with approval by the CEUA (Committee of Ethics in Research Animals at PUCPR), under the registration number 1273/2018.

2.1 Isolation of the mononuclear stem cells

Animals were placed in lateral decubitus position with the posterior limb in flexion under general anesthesia with Ketamine (50 mg/kg) and Xylazine (10 mg/kg). The cell harvesting was achieved by the puncture and aspiration of the posterior iliac crest, using 5-mL syringes containing 0.2 mL of heparin (5.000 UI/mL). About 1 mL volume was obtained for each animal and the mononuclear fraction of the stem cells was obtained through Ficoll-Hypaque density gradient ($d= 1.077 \text{ g/m}^3$), in accordance to Böyum (14).

2.2 Preparation of acellular human amniotic membrane

The amniotic membranes were obtained from patients undergoing cesarean delivery with signed consent, and serologically negative for HIV, Hepatitis B, Hepatitis C and Syphilis. The amnion was peeled from the chorion and blood clots were removed with extensive washing in phosphate-buffered saline (PBS) containing 100U/mL penicillin and 100ug/mL streptomycin, with posterior preparation of the amniotic membrane as suggested by Riau et al. ¹⁶; the decellularization was performed using hypotonic buffer, sodium dodecyl sulfate and tris-buffered saline.

2.3 Animals and surgery

Fifty male Wistar rats, weighing between 250-300 grams were used in this study. The animals were housed in groups of four rats in polypropylene cages at ambient with constant temperature ($23^{\circ}\text{C} \pm 2$), 12-hour light-dark cycle and free access to water and standard commercial diet during the conduction of the study.

The coronary artery ligation was performed as previously described ¹⁷. Briefly, the rats were anesthetized by intraperitoneal injection of Ketamine (50 mg/kg) and Xylazine (10 mg/kg), then submitted to endotracheal intubation and to mechanical ventilation at a

frequency of 60 cycles/min and a volume of 2.5 mL (683, Harvard® Apparatus, Inc, USA). The animals were placed in the supine position and a left lateral thoracotomy was performed in the fourth intercostal space. The anterior interventricular coronary artery, identified between the left atrium and the pulmonary artery, was permanently ligated using 7.0 polypropylene thread. The ischemia was confirmed with paling and hypokinetic area in the ventricular wall. All rats received perioperative antibiotics and analgesia. The mortality rate of the animals after AMI induction was about 25%.

2.4 Echocardiographic assessment

All animals were submitted to echocardiographic evaluations under the same anesthetic conditions on the 7th and 30th days after myocardial infarction, in order to analyze the ejection fraction (EF), left ventricular end-systolic (LVESV) and end-diastolic volumes (LVEDV). Bidimensional transthoracic evaluations were taken using Sonos 5500 (Hewlett Packard, USA) with S12 sectorial transducer (5-12 MHz) and 15L6 linear (7-15 MHz), allowing an analysis of up to 160 Hz. LVESV, LVEDV and EF were obtained with the transducer placed in the left anterolateral portion of the thorax using the following formula: ventricular volume (V) was $8 \times (S)^2 / (3 \times 3.1415926 \times C)$, where V=volume, S=area and C=weight. EF was calculated as follows: $EF = (LVEDV - LVESV) / LVEDV$ ¹⁸. Measurements were blindly obtained three times by the same cardiologist.

2.5 Transplantation of the BMMC and AHAM

Seven days after myocardial infarction, animals with EF lower than 50% were randomly assigned into three groups: control group (n= 8), BMMC group (n = 11) and AHAM group (n=8). The animals were again anesthetized (50 mg/kg Ketamine and 10 mg/kg Xylazine), intubated and submitted to median transsternal sternotomy. The BMMC group received 5×10^6 mononuclear stem cells injected directly on the infarcted area and the AHAM group received the amniotic patch on the anterior surface of the heart. After thirty days, a new echocardiographic evaluation was blindly performed on the three groups, followed by euthanasia with an overdose of the anesthetic drugs.

2.6 Immunohistochemical analyses

Sample preparation: the apex of the heart was surgically removed and immediately frozen at liquid nitrogen and stored at -80°C for biochemical analysis. The remaining tissue was fixed in 10% phosphate-buffered formaldehyde for 24 hours then embedded in paraffin blocks and sectioned at a 5 μm -thick slices.

2.6.1 Tissue microarray (TMA) and immunohistochemistry (IHC)

Representative areas of the muscle were transferred from the histology block to a recipient TMA block. Next, two 4 μm thick paraffin-embedded sections of the TMA blocks were transferred to electrically charged Star Frost™ (Braunschweig, Germany) slides and incubated with a primary anti-NFK β p105/50 (ab797; 1:200; Abcam, Cambridge, UK), TNF α (ab6671; 1:100; Abcam), ASC (ab70627; 1:200; Abcam) and Caspase1 (ab189796; 1:200, Abcam) overnight in a humidified chamber at a temperature between 2–8 $^{\circ}\text{C}$. A Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System-Spring Bioscience™ (Pleasanton, CA, USA) the slides were incubated with the secondary antibody for 30 min at room temperature. The immunoreactivity was developed by adding DAB chromogen-substrate solution (Spring) to the slides. Harris hematoxylin was used for counterstaining. Positive and negative controls were run in parallel with all reactions. The slides were scanned using the Axio Scan.Z1 scanner (Carl Zeiss, Germany). The files generated were fragmented into single images, and approximately 25 images were selected for analysis. The areas of immunopositive markings for the anti-protein antibodies were quantified using Image-Pro Plus software version 4.5 (Media Cybernetics, USA). The immunopositive objects were selected using a “mask” for standardizing and automating the process. The numerical data of the immunopositive marking area were generated and subsequently exported to an Excel spreadsheet.

2.6.2 Oxidation of dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and NALP3

The tissue was placed in eppendorf, 100 μl of phosphate buffered saline (PBS) was added and homogenized vigorously at 4 $^{\circ}\text{C}$ with the use of a homogenizer. Afterwards, 200 μl of trypsin-EDTA (0.25% - Sigma-Aldrich) was added for 30 minutes for digestion. These extracts were centrifuged at 11,000 rpm at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 40 min to remove insoluble material and part of the supernatants from these tissues were used for protein

quantification according to the Bradford method. About 500µl of the supernatant was carefully collected and incubated, in the dark, with a 10mM H₂DCFDA or 100µl NALP3 solution, for 30 minutes at 37°C. After this time, the samples were centrifuged at 1200 rpm for 10 minutes to remove excess marker and resuspend the pellet in 400µl of PBS. The samples were kept at 4°C and protected from light until the acquisition of the data on the cytometer (BD Accuri C6 Plus – Biosciences). The flowering signals were obtained using the FITC channel. Data analysis was performed with the aid of the BD Accuri C6 Plus software, by determining the average fluorescence intensity of 30,000 events.

2.6.3 Total and oxidized glutathione

The total glutathione (GSH) levels were based on the reaction of GSH with DTNB (Ellman's reagent), which forms an oxidized glutathione-TNB product that is later reduced by glutathione reductase in the presence of NADPH with the consequent synthesis of GSH. The total GSH concentration was determined using a regression curve that was plotted using various GSH standards. The oxidized (GSSG) levels were measured from the recycling of GSSG by the spectrophotometric monitoring of NADPH in the presence of 2-vinylpyridine. The total GSH and GSSG concentrations were determined using a regression curve plotted using various GSH standards ¹⁹.

2.6.4 Interleukin-1β

IL1-β tissue concentrations were determined using commercial ELISA kits as recommended by the manufacturer (Bioalbra biotechnology, Brazil)

2.7 Statistical analysis

Quantitative variables were described by mean, standard deviation, median, minimum and maximum values. The model of analysis of variance (ANOVA) was applied in the echocardiographic evaluation for the comparison of the three groups at the baseline analysis, and the covariance analysis model (ANCOVA) was used for the 30th day and for the difference between baseline and 30th day, adjusting for the baseline evaluation. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used for the immunohistochemical evaluations. P values <0,05 indicated statistical significance, and the analyses were conducted with statistical software STATA version 16.0 (StataCorpLp, Texas, United States).

3. RESULTS

3.1 Echocardiographic analysis

The left ventricular EF, LVESV and LVEDV, assessed by the baseline echocardiogram at 7 days after AMI, were not significantly different between the groups ($p=0.122$). At the 30th day after AMI analysis, both BMMC and AHAM groups had significant improvements in EF in both intragroup analysis (46.4 ± 6.6 vs. $30.6\pm 8.8\%$, $p<0.01$ and 49.7 ± 9.9 vs. $33.2\pm 7.6\%$, $p=0.01$ respectively) and in comparison to control group.

Both LVESV and LVEDV were decreased on the BMMC (0.12 ± 0.05 vs. 0.22 ± 0.07 mL, $p=0.004$ and 0.09 ± 0.04 vs. 0.22 ± 0.10 mL, $p=0.001$, respectively), and AHAM groups (0.22 ± 0.06 vs. 0.31 ± 0.08 mL, $p=0.011$ and 0.18 ± 0.06 vs. 0.33 ± 0.11 mL, $p=0.002$, respectively), without significant difference when the compared to each other. No significant benefits on EF, LVESV and LVEDV were observed in the control group during the 30 days follow-up (Figure 1).

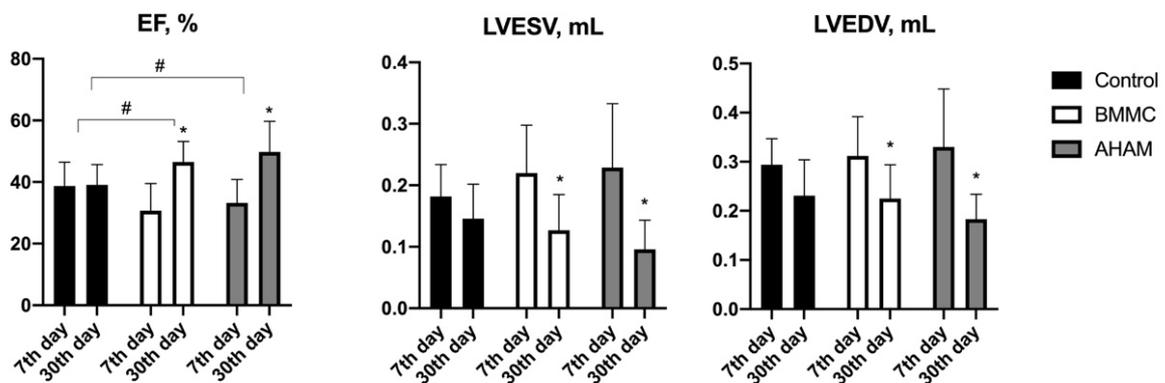


Figure 1: Intragroup comparison of the echocardiography results on the 7th and 30th days after myocardial infarction. The results are presented as mean \pm standard deviation. $p<0,05$ denoted statistical significance versus control group (#) or baseline analysis (*). Sample size: control = 8; BMMC = 11; AHAM = 8. EF (ejection fraction, in %); LVESV (left ventricle end-systolic volume, in mL); LVEDV (left ventricle end-diastolic volume, in mL); BMMC (bone marrow mononuclear stem cells); AHAM (acellular human amniotic membrane).

3.2 Inflammation parameters

Immunohistochemical evaluations for TNF- α and NF- κ B were conducted in order to evaluate the activity of pro-inflammatory markers after 30 days in the infarcted heart. The results showed no difference on the levels of TNF- α between the three groups (fig. 2A), and the levels of NF- κ B were significantly higher in both BMMC and AHAM groups in comparison to control group (fig. 2B), without statistical significance when compared to each other.

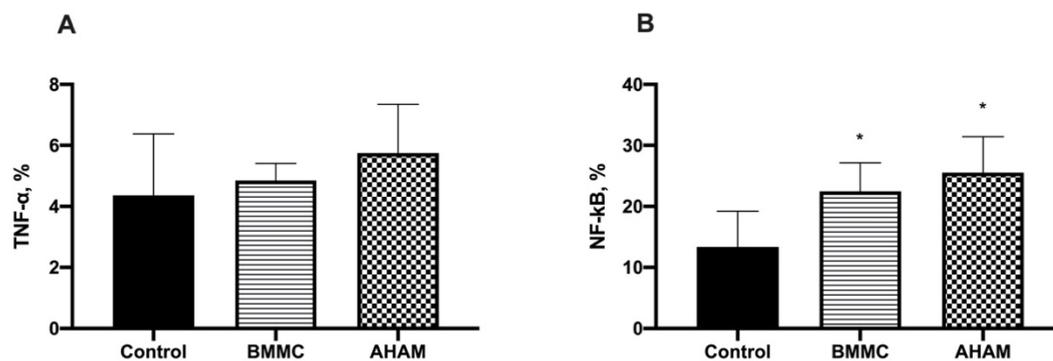


Figure 2: Effects of BMMC and AHAM on inflammatory parameters 30 days after myocardial infarction. The results of TNF- α (A) and NF- κ B (B) are presented as mean \pm standard deviation. $p < 0,05$ denoted statistical significance versus control group (*). Sample size: control = 4; BMMC = 3; AHAM = 4. BMMC (bone marrow mononuclear stem cells); AHAM (acelular human amniotic membrane).

3.3 Oxidative stress parameters

Reactive oxygen species levels were measured through the oxidation of the 2',7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) in a fluorescent 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF), and as shown in figure 3A, no significant difference was observed among the groups after the 30 days analysis. The GSH (fig. 3B) and GSSG (fig. 3C) levels were also similar between the groups, and the ratio GSH/GSSG remained unchanged in all groups (fig 3D).

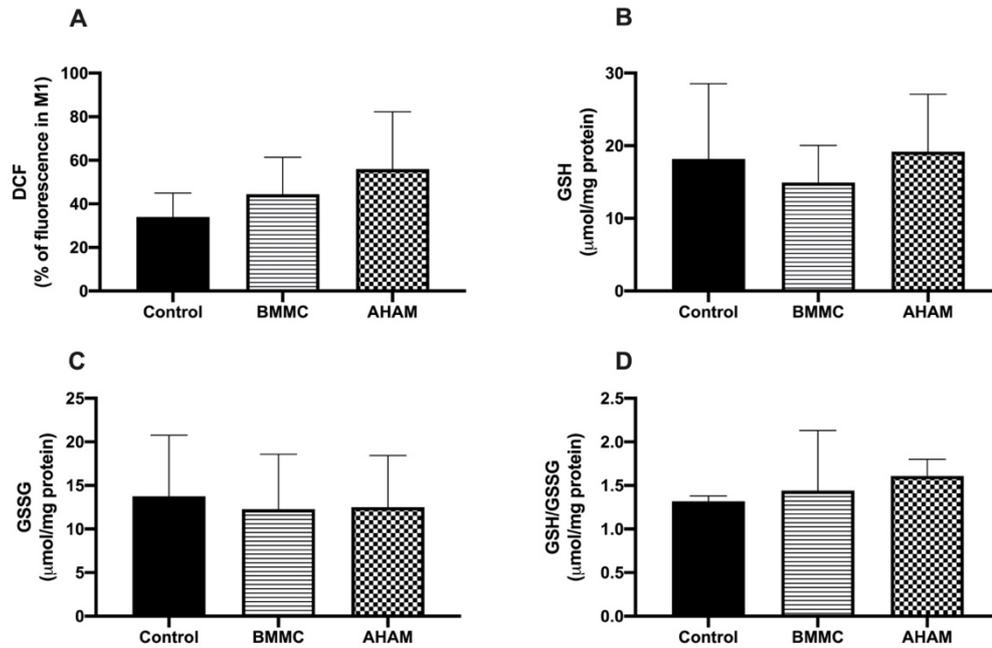


Figure 3: Effects of BMMC and AHAM on oxidative stress parameters after 30 days of myocardial infarction. The values of DCF (A), total GSH (B), GSSG (C) and GSH/GSSG ratio (D) are presented as mean \pm standard deviation. $p < 0.05$ denoted statistical significance. Sample size: control = 8; BMMC = 11; AHAM = 8. BMMC (bone marrow mononuclear stem cells); AHAM (acellular human amniotic membrane).

3.4 Inflammasome NLRP3 activity

Heart tissues from the BMMC and AHAM groups had significantly elevated expressions of the NALP3 enzyme 30 days after AMI (fig. 4A) in comparison to control group ($p=0.032$ and 0.017 , respectively). The immunohistochemistry demonstrated similar levels of ASC (fig. 4B, $p=0.07$) and Caspase-1 (fig. 4C, $p=0.116$) between the analyzed groups, and the levels interleukin-1 β (fig. 4D) were significantly reduced in AHAM group in comparison to both control and BMMC groups ($p=0.03$ and $p < 0.01$, respectively).

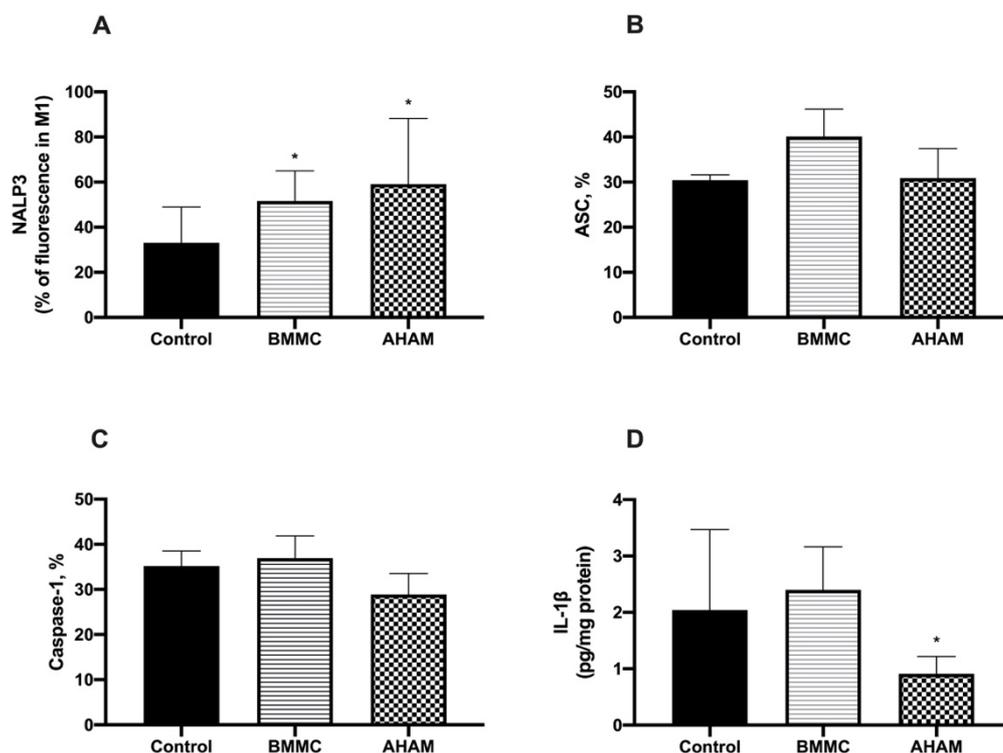


Figure 4: Effects of BMMC and AHAM on the NLRP3 inflammasome activity 30 days after myocardial infarction. The values of NALP3 (A), ASC (B), Caspase-1 (C) and interleukin-1 β (D) are presented as mean \pm standard deviation. $p < 0,05$ denoted statistical significance. Sample size for ASC and Caspase-1: control = 4; BMMC = 3; AHAM = 4. Sample size for NALP3 and interleukin-1 β : control = 6; BMMC = 6; AHAM = 5. BMMC (bone marrow mononuclear stem cells); AHAM (acellular human amniotic membrane).

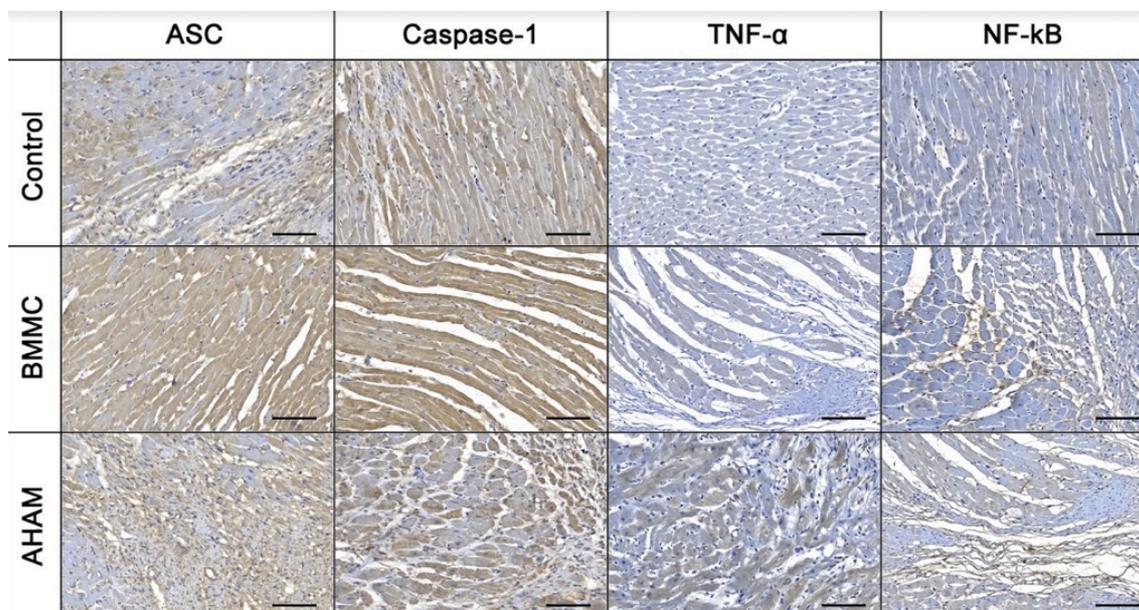


Figure 5: Representative images of cross-sectional histological sections of the heart of animals submitted to myocardial infarction. of BMMC and AHAM on the NLRP3 inflammasome activity 30 days after myocardial infarction. BMMC (bone marrow mononuclear stem cells); AHAM (acellular human amniotic membrane). Acquisition of images in 10x objective. Scale bars = 50 μ m.

4. DISCUSSION

In the current study, we investigated whether cell-therapy with BMMC and AHAM could inhibit the NLRP3 inflammasome activity in a rat model of chronic ischemia. The BMMC and AHAM patch were injected and engrafted, respectively, seven days after coronary ligation in animals with EF < 50% to simulate the clinical scenario of heart failure, and the results observed after 30 days demonstrated that the NLRP3 inflammasome activity was not suppressed with the therapeutic use of both BMMC and AHAM, in comparison to control group in a 30 days follow-up analysis.

Bone-marrow stem cells and human amniotic membrane has been appointed as potential therapeutic-agents with the attempt of regeneration of the heart in models of heart failure²⁰⁻²². The proposed mechanism of action is based on paracrine and immunomodulatory effects able to reduce the cardiac dysfunction after coronary occlusion, and promote functional and ventricular benefits in the heart^{23,24}; however, the exact mechanism by which this effect might occur is still not clear.

The microenvironment of hypoxia with the subsequent death of cardiomyocytes after AMI release to the extracellular space a group of substances normally present in the intracellular environment; such substances (HMGB1, Heat shock proteins, and DNA fragments) are known as damage-associated molecular patterns (DAMPs), and during a stressful situation, such as AMI, can cause an immunological reaction by the activation of the pattern recognition receptors (PRRs)²⁵⁻²⁷. These receptors are found in the cell-membranes of macrophages and dendritic cells or in the cytoplasm, causing a process of sterile inflammation in the heart^{6,28}.

The inflammasome is a PRR, and at least five types of inflammasomes had already been identified so far, and the most well-characterized is the NLRP3²⁸. The activation of the NLRP3 complex usually involves two signals: the first signal (priming) is mediated through the stimulation of toll-like receptors and activation of the NF- κ B signaling pathway, providing the transcriptional expression of pro-IL-18, pro-IL-1 β , and NALP3^{4,29}. The second signal is dependent on DAMPs stimulus, PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), and other substances such as ROS, extracellular ATP, and potassium efflux²⁹. These molecules trigger the oligomerization of NLRP3 complex (modulated by ASC) and activate Caspase-1, with posterior cleavage and release of Interleukin-1 β , Interleukin-18, and cell death mediated through gasdermin-D, in a process known as pyroptosis^{9,30,31}.

In the present study, the results showed that both BMMC and AHAM had upregulated the levels of NALP3 enzyme at the 30 days analysis (fig. 4A), and no modulation of ASC or Caspase was observed in comparison to the control group. These elevated levels of NALP3 are consistent with the high levels of NF- κ B observed in both BMMC and AHAM groups in the immunohistochemistry (fig. 2B), once the priming signal provides the transcriptional expression of NALP3 and pro-IL-1 β ³².

Despite this, the levels of IL-1 β were similar in both control and BMMC groups, and the AHAM group had significantly lower levels of IL-1 β (fig. 4D). Also, the cell redox-cell state was not different among the three groups, which was expected considering the close association between the production of ROS and the mechanism of activation of the NLRP3 inflammasome^{9,33}. The mitochondrial dysfunction, consequent to the anaerobic metabolism after the establishment of hypoxia following coronary occlusion,

is the major responsible for the release of ROS, that behaves like the second signal for the NLRP3 oligomerization ⁷.

The lack of association between the analyzed therapies and the NLRP3 inflammasome in the context of chronic myocardial ischemia suggests that either the immunomodulatory action of the BMMC and AHAM occurs by other mechanisms than the NLRP3 inflammasome inhibition, or the activity of the NLRP3 complex was not suppressed in a long-term analysis such as 30 days after AMI. This time-related attribute may also justify the similarity of the redox-cell state between the three groups.

This last hypothesis is supported by an important randomized clinical trial, the BOOST-trial, on which 60 patients with a recent history of myocardial infarction were randomized 1:1 to receive bone-marrow stem cells or placebo, and the results after 18 months suggested that the beneficial effects of the cells in cardiac function would be only transient ³⁴; this fact may be related to a low percentage of viable cells after delivery to the myocardium due to cardiac contraction, with a consequent decrease in cardiac function after months ^{35,36}. In a cellular analysis, the scarcity of viable cells on the delivery site may justify the similarity between the groups analyzed, suggesting that the possible immunomodulatory action of both BMMC and AHAM may not be occurring after 30 days of AMI.

The direct myocardial injection used in the present study is an alternative to decrease the loss of stem cells on the delivery site, but this approach is associated with a transient inflammatory response on the myocardium ³⁷, which can explain the elevated levels NF- κ B of observed in both BMMC and AHAM groups. Also, these levels may be related to the physiological process of myocardial repair after AMI, once certain levels of the inflammatory response are necessary for myocardial healing ³⁸, as well for the process of stem cell activation after delivery to the myocardium, with consequent benefits in cardiac function and ventricular remodeling ^{38,39,40}. The same logic applies to cell-therapy with AHAM.

Previous experimental studies and clinical trials had successfully prevented cardiovascular events and reduced pathological ventricular remodeling through the inhibition of the NLRP3 enzymes and/or cytokines after AMI ^{9,11,31,32,40}. The agents most commonly used as NLRP3 inhibitors are Canakinumab (a monoclonal antibody targeting

interleukin B), Anakinra (a recombinant interleukin-1 receptor antagonist), colchicine, OLT1177, MCC-950, and muscone^{40,42-44}.

A study conducted by Du et al. showed that sequential doses of muscone after permanent coronary occlusion in rats were capable of inhibiting the NLRP3 inflammasome activity and the levels of NF- κ B, with improvements in cardiac function after four weeks⁴⁵. In a similar analysis, Fujisue et al. demonstrated that oral administration of colchicine for five days resulted in attenuation of the left ventricular remodeling and reduced inflammatory response and NLRP3 activity after AMI⁴⁶.

In our study, despite the absence of inhibition of the NLRP3 inflammasome or the inflammatory response, the echocardiographic assessment showed that cell-therapy with either BMMC or AHAM was capable of improving cardiac function during the 30 days follow-up, in comparison to baseline results. The LV ejection fraction improved about 16% in the BMMC group ($p < 0.001$) and almost 20% in the AHAM group ($p = 0.001$), with no difference when these two groups were compared to each other (figure 1). Also, the LV remodeling, measured by LVESV and LVEDV, was improved in both BMMC and AHAM groups, without significant changes in cardiac function nor LV remodeling in the control group.

To our knowledge, this is the first study to evaluate the possible relationship between the stem cells, the human amniotic membrane, and the NLRP3 inflammasome complex in the context of chronic myocardial ischemia. The recovery of the global heart function in a model of severe ventricular dysfunction observed in our study reinforces the potential of both stem cells and human amniotic membrane as possible therapeutic approaches for the treatment of heart failure. The absence of modulation of the inflammatory response and the NLRP3 inflammasome enzymes/cytokines after 30 days suggests that the immunomodulatory action over the NLRP3 inflammasome may not be sustained in a long period, or that the mechanism of action of both BMMC and AHAM occur independently of the NLRP3 inflammasome inhibition.

Despite this, some considerable limitations should be expressed. Beyond the limitations of the rat model, the analysis after myocardial ischemia without reperfusion differs from previous studies that proposed to evaluate the inhibition of the NLRP3 Inflammasome as a therapeutic target after AMI. Most of the studies aimed to assess the short-terms effects of the NLRP3 inhibition, usually during hours or few days after

myocardial infarction^{10,42,43}; therefore, we could not predict the short-term consequences of BMMC and AHAM over the NLRP3 complex. Also, treatment with either BMMC or AHAM occurred only once during the period of evaluation in animals with severe ventricular dysfunction; a single dose of these agents may be not sufficient to inhibit the NLRP3 Inflammasome after 30 days, although was capable of improving cardiac function and ameliorating LV-remodeling. Future studies should explore the benefits of BMMC and AHAM on NLRP3 complex inhibition in a shorter period of time.

5. CONCLUSION

Despite the improvements observed in cardiac function and the reduction of pathological ventricular remodeling, treatment with bone-marrow mononuclear stem cells or human amniotic membrane was not able to suppress the inflammatory response nor the NLRP3 inflammasome activity after 30 days of myocardial infarction.

6. ABBREVIATIONS

AHAM - Acellular human amniotic membrane
AMI – Acute myocardial infarction
BMMC – Bone marrow mononuclear stem cells
DAMPs - Damage-associated molecular patterns
DCFH - Dichlorodihydrofluorescein
EF – Ejection fraction
GSH – Total glutathione
GSSG – Oxidized glutathione
IHC - Immunohistochemistry
LVEDV – Left ventricle end-diastolic volume
LVESV – Left ventricle end-systolic volume
NLRP3 – Nod-like receptor protein 3
PAMPs - Pathogen-associated molecular patterns
PRRs - Pattern recognition receptors
ROS – Reactive oxygen species
TMA – Tissue microarray

7. FUNDING SOURCES

This work was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ) [grant number 405670/2018-4], and Pontical Catholic University of Paraná, [grant number 06/2019].

8. REFERENCES

1. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2019;139(10):e56-e528. doi:10.1161/CIR.0000000000000659
2. Tanai E, Frantz S. Pathophysiology of heart failure. *Compr Physiol*. 2016;6(1):187-214. doi:10.1002/cphy.c140055
3. Shirazi LF, Bissett J, Romeo F, Mehta JL. Role of Inflammation in Heart Failure. *Curr Atheroscler Rep*. 2017;19(6). doi:10.1007/s11883-017-0660-3
4. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11(5):255-265. doi:10.1038/nrcardio.2014.28
5. Anzai T. Post-infarction inflammation and left ventricular remodeling - A double-edged sword -. *Circ J*. 2013;77(3):580-587. doi:10.1253/circj.CJ-13-0013
6. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(7):407-420. doi:10.1038/nri.2016.58
7. Moretti J, Blander JM. Increasing complexity of NLRP3 inflammasome regulation. *J Leukoc Biol*. 2020. doi:10.1002/JLB.3MR0520-104RR
8. Butts B, Gary RA, Dunbar SB, Butler J. The Importance of NLRP3 Inflammasome in Heart Failure. *J Card Fail*. 2015;21(7):586-593. doi:10.1016/j.cardfail.2015.04.014
9. Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a novel player in myocardial infarction. *Int Heart J*. 2014;55(2):101-105. doi:10.1536/ihj.13-388
10. Marchetti C, Toldo S, Chojnacki J, et al. Pharmacologic Inhibition of the NLRP3 Inflammasome Preserves Cardiac Function after Ischemic and Nonischemic Injury in the Mouse. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015;66(1):1-8. doi:10.1097/FJC.0000000000000247
11. Van Der Heijden T, Kritikou E, Venema W, et al. NLRP3 Inflammasome Inhibition by MCC950 Reduces Atherosclerotic Lesion Development in Apolipoprotein E-Deficient Mice - Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(8):1457-1461. doi:10.1161/ATVBAHA.117.309575
12. Mastrocola R, Penna C, Tullio F, et al. Pharmacological inhibition of NLRP3 inflammasome attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by activation of RISK and mitochondrial pathways. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/5271251
13. Guo J, Lin GS, Bao CY, Hu ZM, Hu MY. Anti-inflammation role for mesenchymal

- stem cells transplantation in myocardial infarction. *Inflammation*. 2007;30(3-4):97-104. doi:10.1007/s10753-007-9025-3
14. Zhao L, Cheng G, Choksi K, et al. Transplantation of human umbilical cord blood-derived cellular fraction improves left ventricular function and remodeling after myocardial ischemia/reperfusion. *Circ Res*. 2019;125(8):759-772. doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.315216
 15. Khorramirouz R, Kameli SM, Fendereski K, Daryabari SS, Kajbafzadeh AM. Evaluating the efficacy of tissue-engineered human amniotic membrane in the treatment of myocardial infarction. *Regen Med*. 2019;14(2):113-126. doi:10.2217/rme-2018-0024
 16. Riau AK, Beurman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials*. 2010;31(2):216-225. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.034
 17. Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res*. 2007;74(1):29-38. doi:10.1016/j.cardiores.2006.11.026
 18. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, et al. Recommendations for Quantitation of the Left Ventricle by Two-Dimensional Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 1989;2(5):358-367. doi:10.1016/S0894-7317(89)80014-8
 19. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*. 2007;1(6):3159-3165. doi:10.1038/nprot.2006.378
 20. Ntege EH, Sunami H, Shimizu Y. Advances in regenerative therapy: A review of the literature and future directions. *Regen Ther*. 2020;14:136-153. doi:10.1016/j.reth.2020.01.004
 21. Fisher SA, Doree C, Mathur A, Taggart DP, Martin-Rendon E. Stem cell therapy for chronic ischaemic heart disease and congestive heart failure. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;2016(12):CD007888-CD007888. doi:10.1002/14651858.CD007888.pub3
 22. Roy R, Haase T, Ma N, et al. Decellularized amniotic membrane attenuates postinfarct left ventricular remodeling. *J Surg Res*. 2016;200(2):409-419. doi:10.1016/j.jss.2015.08.022
 23. Machado-Júnior PAB, Blume GG, Francisco JC, Guarita-Souza LC. Cell-Based Therapies for Myocardial Regeneration in Heart Failure: 20 Years of Debate. *Brazilian J Cardiovasc Surg*. 2020;35(4):VIII-XI. doi:10.21470/1678-9741-2020-0362

24. Bagno L, Hatzistergos KE, Balkan W, Hare JM. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Cardiovascular Disease: Progress and Challenges. *Mol Ther*. 2018;26(7):1610-1623. doi:10.1016/j.ymthe.2018.05.009
25. Jin C, Cleveland JC, Ao L, et al. Human myocardium releases heat shock protein 27 (HSP27) after global ischemia: The proinflammatory effect of extracellular HSP27 through toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *Mol Med*. 2014;20(1):280-289. doi:10.2119/molmed.2014.00058
26. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2007;81(1):1-5. doi:10.1189/jlb.0306164
27. Saparov A, Ogay V, Nurgozhin T, et al. Role of the immune system in cardiac tissue damage and repair following myocardial infarction. *Inflamm Res*. 2017;66(9):739-751. doi:10.1007/s00011-017-1060-4
28. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. *Cell*. 2010;140(6):821-832. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040
29. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13). doi:10.3390/ijms20133328
30. He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. 2016. doi:10.1016/j.tibs.2016.09.002
31. Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1319(1):82-95. doi:10.1111/nyas.12458
32. Silvis MJM, Demkes EJ, Fiolet ATL, et al. Immunomodulation of the NLRP3 Inflammasome in Atherosclerosis, Coronary Artery Disease, and Acute Myocardial Infarction. *J Cardiovasc Transl Res*. July 2020:1-12. doi:10.1007/s12265-020-10049-w
33. Toldo S, Abbate A. The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(4):203-214. doi:10.1038/nrcardio.2017.161
34. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, et al. Intracoronary Bone Marrow Cell Transfer After Myocardial Infarction. *Circulation*. 2006;113(10):1287-1294. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.575118
35. Mäkelä J, Anttila V, Ylitalo K, et al. Acute homing of bone marrow-derived mononuclear cells in intramyocardial vs. intracoronary transplantation. *Scand Cardiovasc J*. 2009;43(6):366-373. doi:10.1080/14017430903045350
36. Sheng CC, Zhou L, Hao J. Current stem cell delivery methods for myocardial repair.

Biomed Res Int. 2013;2013. doi:10.1155/2013/547902

37. Suzuki K, Murtuza B, Beauchamp JR, et al. Role of interleukin-1 β in acute inflammation and graft death after cell transplantation to the heart. *Circulation.* 2004;110(11 SUPPL.). doi:10.1161/01.CIR.0000138388.55416.06
38. Yan W, Abu-El-Rub E, Saravanan S, Kirshenbaum LA, Arora RC, Dhingra S. Inflammation in myocardial injury: Mesenchymal stem cells as potential immunomodulators. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2019;317(2):H213-H225. doi:10.1152/ajpheart.00065.2019
39. Vagnozzi RJ, Maillet M, Sargent MA, et al. An acute immune response underlies the benefit of cardiac stem cell therapy. *Nature.* 2020;577(7790):405-409. doi:10.1038/s41586-019-1802-2
40. Zahid A, Li B, Kombe AJK, Jin T, Tao J. Pharmacological inhibitors of the nlrp3 inflammasome. *Front Immunol.* 2019;10(OCT). doi:10.3389/fimmu.2019.02538
41. Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(8):588-606. doi:10.1038/nrd.2018.97
42. Van Hout GPJ, Bosch L, Ellenbroek GHJM, et al. The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces infarct size and preserves cardiac function in a pig model of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2017;38(11):828-836. doi:10.1093/eurheartj/ehw247
43. Toldo S, Mauro AG, Cutter Z, et al. The NLRP3 Inflammasome Inhibitor, OLT1177 (Dapansutrile), Reduces Infarct Size and Preserves Contractile Function after Ischemia Reperfusion Injury in the Mouse. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2019;73(4):215-222. doi:10.1097/FJC.0000000000000658
44. Buckley LF, Libby P. Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activity in Acute Myocardial Infarction: A Review of Pharmacologic Agents and Clinical Outcomes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2019;74(4):297-305. doi:10.1097/FJC.0000000000000701
45. Du Y, Gu X, Meng H, et al. Muscone improves cardiac function in mice after myocardial infarction by alleviating cardiac macrophage-mediated chronic inflammation through inhibition of NF- κ B and NLRP3 inflammasome. *Am J Transl Res.* 2018;10(12):4235-4246.
46. Fujisue K, Sugamura K, Kurokawa H, et al. Colchicine improves survival, left ventricular remodeling, and chronic cardiac function after acute myocardial infarction. *Circ J.* 2017;81(8):1174-1182. doi:10.1253/circj.CJ-16-0949

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversos relatos na literatura já demonstraram o potencial terapêutico das células-tronco e da membrana amniótica humana como alternativa de tratamento da insuficiência cardíaca. Apesar disso, controvérsias acerca do mecanismo de ação e efeitos dessas terapias podem surgir em função dos diversos métodos de entrega celular ao miocárdio existentes, diferentes subtipos de células-tronco passíveis de uso, métodos variados de mensuração da função cardíaca e ausência de padronização temporal das análises funcionais, bioquímicas e histopatológicas.

O presente estudo demonstrou que o uso terapêutico de células-tronco mononucleares da medula óssea ou membrana amniótica humana acelular após o infarto do miocárdio foi capaz de recuperar a função cardíaca global, mensurada através de análise ecocardiográfica 30 dias após a indução de isquemia. Apesar disso, não se observou diferença significativa entre os grupos em relação aos resultados bioquímicos e histopatológicos, com ausência de modulação da resposta inflamatória, do complexo inflamassoma NLRP3 e das espécies reativas de oxigênio após 30 dias de análise.

A realização da análise bioquímica e histopatológica após 30 dias da indução do infarto do miocárdio ocorreu em busca de avaliar o processo de remodelamento cardíaco que ocorre após o infarto do miocárdio; entretanto, esse longo período de tempo pode limitar o poder de análise, visto que medidas realizadas em períodos de tempo mais curtos poderiam ser capazes de detectar a possível modulação das células-tronco e da membrana amniótica sobre os parâmetros inflamatórios e oxidativos.

Dessa forma, concluímos que o uso terapêutico das células-tronco da medula óssea ou da membrana amniótica acelular após o infarto do miocárdio foi capaz de recuperar a função cardíaca global, mas essa ação não foi dependente da modulação do complexo inflamassoma NLRP3 após 30 dias de análise.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vos T, Allen C, Arora M, Barber RM, Brown A, Carter A, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016 Oct 8;388(10053):1545–602.
2. Frangogiannis NG. Pathophysiology of myocardial infarction. *Compr Physiol*. 2015 Oct 1;5(4):1841–75.
3. Anderson JL, Morrow DA. Acute Myocardial Infarction. Vol. 376, *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society; 2017. p. 2053–64.
4. Hashmi S, Al-Salam S. Acute myocardial infarction and myocardial ischemia-reperfusion injury: A comparison. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(8):8786–96.
5. Burke AP, Virmani R. Pathophysiology of Acute Myocardial Infarction. Vol. 91, *Medical Clinics of North America*. 2007. p. 553–72.
6. Charlagorla P, Liu J, Patel M, Rushbrook JI, Zhang M. Loss of plasma membrane integrity, complement response and formation of reactive oxygen species during early myocardial ischemia/reperfusion. *Mol Immunol*. 2013 Dec 31;56(4):507–12.
7. Puhl SL, Steffens S. Neutrophils in Post-myocardial Infarction Inflammation: Damage vs. Resolution? Vol. 6, *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. Frontiers Media S.A.; 2019.
8. Saxena A, Russo I, Frangogiannis NG. Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: Learning from past failures to meet future challenges. Vol. 167, *Translational Research*. Mosby Inc.; 2016. p. 152–66.
9. Saparov A, Ogay V, Nurgozhin T, Chen WCW, Mansurov N, Issabekova A, et al. Role of the immune system in cardiac tissue damage and repair following myocardial infarction. Vol. 66, *Inflammation Research*. Birkhauser Verlag AG; 2017. p. 739–51.
10. Zimmer A, Bagchi AK, Vinayak K, Bello-Klein A, Singal PK. Innate immune response in the pathogenesis of heart failure in survivors of myocardial infarction. Vol. 316, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. American Physiological Society; 2019. p. H435–45.
11. Sattler S, Fairchild P, Watt FM, Rosenthal N, Harding SE. The adaptive immune response to cardiac injury—the true roadblock to effective regenerative therapies? *npj Regen Med*. 2017 Dec;2(1).
12. Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. Vol. 17, *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group; 2018. p. 588–606.
13. Rheinheimer J, de Souza BM, Cardoso NS, Bauer AC, Crispim D. Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: A systematic review. Vol. 74, *Metabolism: Clinical and Experimental*. W.B. Saunders; 2017. p. 1–9.
14. Toldo S, Abbate A. The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction. Vol. 15, *Nature Reviews Cardiology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 203–14.
15. Liu D, Zeng X, Li X, Mehta JL, Wang X. Role of NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of cardiovascular diseases. Vol. 113, *Basic Research in Cardiology*.

- Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH and Co. KG; 2018. p. 5.
16. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, et al. Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *J Immunol.* 2009 Jul 15;183(2):787–91.
 17. Takahashi M. Role of NLRP3 inflammasome in cardiac inflammation and remodeling after myocardial infarction. Vol. 42, *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* Pharmaceutical Society of Japan; 2019. p. 518–23.
 18. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG; 2019.
 19. Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1319(1):82–95.
 20. Szekely Y, Arbel Y. A Review of Interleukin-1 in Heart Disease: Where Do We Stand Today? *Cardiol Ther.* 2018 Jun;7(1):25–44.
 21. Mezzaroma E, Toldo S, Farkas D, Seropian IM, Van Tassell BW, Salloum FN, et al. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Dec 6;108(49):19725–30.
 22. Toldo S, Marchetti C, Mauro AG, Chojnacki J, Mezzaroma E, Carbone S, et al. Inhibition of the NLRP3 inflammasome limits the inflammatory injury following myocardial ischemia-reperfusion in the mouse. *Int J Cardiol.* 2016 Apr 15;209:215–20.
 23. Buckley LF, Libby P. Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activity in Acute Myocardial Infarction: A Review of Pharmacologic Agents and Clinical Outcomes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2019 Oct;74(4):297–305.
 24. Du Y, Gu X, Meng H, Aa N, Liu S, Peng C, et al. Muscone improves cardiac function in mice after myocardial infarction by alleviating cardiac macrophage-mediated chronic inflammation through inhibition of NF- κ B and NLRP3 inflammasome. *Am J Transl Res.* 2018;10(12):4235–46.
 25. Fujisue K, Sugamura K, Kurokawa H, Matsubara J, Ishii M, Izumiya Y, et al. Colchicine improves survival, left ventricular remodeling, and chronic cardiac function after acute myocardial infarction. *Circ J.* 2017;81(8):1174–82.
 26. Van Hout GPJ, Bosch L, Ellenbroek GHJM, De Haan JJ, Van Solinge WW, Cooper MA, et al. The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces infarct size and preserves cardiac function in a pig model of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2017;38(11):828–36.
 27. Birnbaum Y, Tran D, Bajaj M, Ye Y. DPP-4 inhibition by linagliptin prevents cardiac dysfunction and inflammation by targeting the Nlrp3/ASC inflammasome. *Basic Res Cardiol.* 2019 Sep 1;114(5):35.
 28. Marchetti C, Toldo S, Chojnacki J, Mezzaroma E, Liu K, Salloum FN, et al. Pharmacologic Inhibition of the NLRP3 Inflammasome Preserves Cardiac Function after Ischemic and Nonischemic Injury in the Mouse. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2015 Jul 23;66(1):1–8.
 29. Toldo S, Mauro AG, Cutter Z, Van Tassell BW, Mezzaroma E, Del Buono MG, et al. The NLRP3 Inflammasome Inhibitor, OLT1177 (Dapansutrile), Reduces Infarct Size and Preserves Contractile Function after Ischemia Reperfusion Injury in the

- Mouse. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2019 Apr 1;73(4):215–22.
30. Zuurbier CJ, Abbate A, Cabrera-Fuentes HA, Cohen M V, Collino M, De Kleijn DP V, et al. Innate immunity as a target for acute cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2019;115(7):1131–42.
 31. Ntege EH, Sunami H, Shimizu Y. Advances in regenerative therapy: A review of the literature and future directions. Vol. 14, *Regenerative Therapy*. Japanese Society of Regenerative Medicine; 2020. p. 136–53.
 32. De Luca M, Aiuti A, Cossu G, Parmar M, Pellegrini G, Robey PG. Advances in stem cell research and therapeutic development. Vol. 21, *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2019. p. 801–11.
 33. Miao C, Lei M, Hu W, Han S, Wang Q. A brief review: The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction. Vol. 8, *Stem Cell Research and Therapy*. BioMed Central Ltd.; 2017. p. 242.
 34. Khorramirouz R, Kameli SM, Fendereski K, Daryabari SS, Kajbafzadeh AM. Evaluating the efficacy of tissue-engineered human amniotic membrane in the treatment of myocardial infarction. *Regen Med*. 2019 Feb 1;14(2):113–26.
 35. Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res*. 2010 Oct 1;107(7):913–22.
 36. Chien KR, Frisén J, Fritsche-Danielson R, Melton DA, Murry CE, Weissman IL. Regenerating the field of cardiovascular cell therapy. Vol. 37, *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group; 2019. p. 232–7.
 37. Mahla RS. Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics. *Int J Cell Biol*. 2016;2016.
 38. Ward MR, Abadeh A, Connelly KA. Concise review: Rational use of mesenchymal stem cells in the treatment of ischemic heart disease. *Stem Cells Transl Med*. 2018 May 5;7(7):543–50.
 39. Qi K, Li N, Zhang Z, Melino G. Tissue regeneration: The crosstalk between mesenchymal stem cells and immune response. *Cell Immunol*. 2018 Apr 1;326:86–93.
 40. Galiñanes M, Loubani M, Davies J, Chin D, Pasi J, Bell PR. Autotransplantation of Unmanipulated Bone Marrow into Scarred Myocardium is Safe and Enhances Cardiac Function in Humans. *Cell Transplant*. 2004 Jan 22;13(1):7–13.
 41. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg R V., et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002 Oct 8;106(15):1913–8.
 42. Perin EC, Willerson JT, Pepine CJ, Henry TD, Ellis SG, Zhao DXM, et al. Effect of transendocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: The FOCUS-CCTRN trial. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2012 Apr 25;307(16):1717–26.
 43. Francisco JC, Cunha RC, Simeoni RB, Guarita-Souza LC, Ferreira RJ, Irioda AC, et al. Amniotic membrane as a potent source of stem cells and a matrix for engineering heart tissue. *J Biomed Sci Eng*. 2013;06(12):1178–85.
 44. Lacorzana J. Amniotic membrane, clinical applications and tissue engineering. Review of its ophthalmic use. Vol. 95, *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia*. Elsevier Ltd; 2020. p. 15–23.

45. Mamede AC, Carvalho MJ, Abrantes AM, Laranjo M, Maia CJ, Botelho MF. Amniotic membrane: From structure and functions to clinical applications. Vol. 349, *Cell and Tissue Research*. 2012. p. 447–58.
46. Roy R, Haase T, Ma N, Bader A, Becker M, Seifert M, et al. Decellularized amniotic membrane attenuates postinfarct left ventricular remodeling. *J Surg Res*. 2016 Feb 1;200(2):409–19.
47. Association WH. Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. 2017 [cited 2020 Apr 22]. Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
48. Brasil. Ministério da Saúde. Óbitos por doenças do aparelho circulatório, capítulo IX da 10ª Classificação Internacional de Doenças (CID10) [Internet]. Secretaria Executiva. DATASUS. Informações de Saúde. Morbidade e informações epidemiológicas. [cited 2020 Apr 22]. Available from: <https://datasus.saude.gov.br/>
49. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2019 Mar 5;139(10):e56–528.
50. Silvain J, Collet JP, Nagaswami C, Beygui F, Edmondson KE, Bellemain-Appaix A, et al. Composition of coronary thrombus in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Mar 22;57(12):1359–67.
51. Kübler W, Spieckermann PG. Regulation of glycolysis in the ischemic and the anoxic myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1970;1(4):351–77.
52. Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: From channels to arrhythmias. Vol. 79, *Physiological Reviews*. American Physiological Society; 1999. p. 917–1017.
53. Kléber AG. Resting membrane potential, extracellular potassium activity, and intracellular sodium activity during acute global ischemia in isolated perfused guinea pig hearts. *Circ Res*. 1983 Apr;52(4):442–50.
54. Stanley WC. Cardiac energetics during ischaemia and the rationale for metabolic interventions. *Coron Artery Dis*. 2001 Feb;12 Suppl 1:S3-7.
55. Moris D, Spartalis M, Spartalis E, Karachaliou GS, Karaolani GI, Tsourouflis G, et al. The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox. Vol. 5, *Annals of Translational Medicine*. AME Publishing Company; 2017.
56. Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol*. 2005 Jul 1;14(4):170–5.
57. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2007 Jan;81(1):1–5.
58. Jin C, Cleveland JC, Ao L, Li J, Zeng Q, Fullerton DA, et al. Human myocardium releases heat shock protein 27 (HSP27) after global ischemia: The proinflammatory effect of extracellular HSP27 through toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *Mol Med*. 2014 Jun 9;20(1):280–9.
59. Ghigo A, Franco I, Morello F, Hirsch E. Myocyte signalling in leucocyte recruitment to the heart. *Cardiovasc Res*. 2014 May 1;102(2):270–80.
60. Zhang W, Lavine KJ, Epelman S, Evans SA, Weinheimer CJ, Barger PM, et al. Necrotic myocardial cells release Damage-Associated Molecular Patterns that provoke fibroblast activation in vitro and trigger myocardial inflammation and

- fibrosis in vivo. *J Am Heart Assoc.* 2015 Jun 1;4(6):e001993.
61. Yan X, Anzai A, Katsumata Y, Matsushashi T, Ito K, Endo J, et al. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2013 Sep;62:24–35.
 62. Sattler S, Fairchild P, Watt FM, Rosenthal N, Harding SE. The adaptive immune response to cardiac injury—the true roadblock to effective regenerative therapies? *npj Regen Med.* 2017 Dec 19;2(1):1–5.
 63. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. Vol. 110, *Circulation Research.* 2012. p. 159–73.
 64. Frangogiannis NG. The mechanistic basis of infarct healing. Vol. 8, *Antioxidants and Redox Signaling.* Mary Ann Liebert Inc.; 2006. p. 1907–39.
 65. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. Vol. 10, *Nature Reviews Immunology.* 2010. p. 427–39.
 66. Majmudar MD, Keliher EJ, Heidt T, Leuschner F, Truelove J, Sena BF, et al. Monocyte-directed RNAi targeting CCR2 improves infarct healing in atherosclerosis-prone mice. *Circulation.* 2013 May 21;127(20):2038–46.
 67. Gerarduzzi C, Di Battista JA. Myofibroblast repair mechanisms post-inflammatory response: a fibrotic perspective. Vol. 66, *Inflammation Research.* Birkhauser Verlag AG; 2017. p. 451–65.
 68. Shinde A V., Frangogiannis NG. Fibroblasts in myocardial infarction: A role in inflammation and repair. Vol. 70, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* Academic Press; 2014. p. 74–82.
 69. Tian M, Yuan Y-C, Li J-Y, Gionfriddo MR, Huang R-C. Tumor necrosis factor- α and its role as a mediator in myocardial infarction: A brief review. *Chronic Dis Transl Med.* 2015 Mar;1(1):18–26.
 70. Chen Y, Zhang Q, Liao Y-H, Cao Z, Du Y-M, Xia J-D, et al. Effect of Tumor Necrosis Factor- α on Neutralization of Ventricular Fibrillation in Rats with Acute Myocardial Infarction. *Mediators Inflamm.* 2011;2011.
 71. Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramanian N, et al. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 May 9;97(10):5456–61.
 72. Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J, Prionas SD, Allison AC. Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *Am J Pathol.* 1992;140(3):539.
 73. Jin YC, Kim CW, Kim YM, Nizamutdinova IT, Ha YM, Kim HJ, et al. Cryptotanshinone, a lipophilic compound of *Salvia miltiorrhiza* root, inhibits TNF- α -induced expression of adhesion molecules in HUVEC and attenuates rat myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo. *Eur J Pharmacol.* 2009 Jul 1;614(1–3):91–7.
 74. Galvez AS, Diwan A, Odley AM, Hahn HS, Osinska H, Melendez JG, et al. Cardiomyocyte degeneration with calpain deficiency reveals a critical role in protein homeostasis. *Circ Res.* 2007 Apr;100(7):1071–8.
 75. Bajaj G, Sharma RK. TNF- α -mediated cardiomyocyte apoptosis involves caspase-12 and calpain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jul 14;345(4):1558–64.
 76. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. Vol. 94, *Circulation Research.* 2004. p. 1543–53.
 77. Frangogiannis NG. The immune system and the remodeling infarcted heart: Cell

- biological insights and therapeutic opportunities. Vol. 63, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2014. p. 185–95.
78. Bradham WS, Moe G, Wendt KA, Scott AA, Konig A, Romanova M, et al. TNF- α and myocardial matrix metalloproteinases in heart failure: Relationship to LV remodeling. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2002;282(4 51-4).
 79. Moe GW, Marin-Garcia J, Konig A, Goldenthal M, Lu X, Feng Q. In vivo TNF- α inhibition ameliorates cardiac mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis in experimental heart failure. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2004 Oct;287(4 56-4):H1813-20.
 80. Gulick T, Chung MK, Pieper SJ, Lange LG, Schreiner GF. Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte β -adrenergic responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(17):6753–7.
 81. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor- α and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*. 2000 May 9;101(18):2149–53.
 82. Fichtlscherer S, Rössig L, Breuer S, Vasa M, Dimmeler S, Zeiher AM. Tumor necrosis factor antagonism with etanercept improves systemic endothelial vasoreactivity in patients with advanced heart failure. *Circulation*. 2001 Dec 18;104(25):3023–5.
 83. Bozkurt B, Torre-Amione G, Warren MS, Whitmore J, Soran OZ, Feldman AM, et al. Results of targeted anti-tumor necrosis factor therapy with etanercept (ENBREL) in patients with advanced heart failure. *Circulation*. 2001 Feb 27;103(8):1044–7.
 84. Dunlay SM, Weston SA, Redfield MM, Killian JM, Roger VL. Tumor necrosis factor- α and mortality in heart failure: A community study. *Circulation*. 2008 Aug 5;118(6):625–31.
 85. Mann DL, McMurray JJV, Packer M, Swedberg K, Borer JS, Colucci WS, et al. Targeted Anticytokine Therapy in Patients with Chronic Heart Failure: Results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). *Circulation*. 2004 Apr 6;109(13):1594–602.
 86. Seino Y, Ikeda U, Ikeda M, Yamamoto K, Misawa Y, Hasegawa T, et al. Interleukin 6 gene transcripts are expressed in human atherosclerotic lesions. *Cytokine*. 1994 Jan;6(1):87–91.
 87. Szekanecz Z, Shah MR, Pearce WH, Koch AE. Human atherosclerotic abdominal aortic aneurysms produce interleukin (IL)-6 and interferon-gamma but not IL-2 and IL-4: the possible role for IL-6 and interferon-gamma in vascular inflammation. *Agents Actions*. 1994 Oct;42(3–4):159–62.
 88. Loppnow H, Libby P. Adult human vascular endothelial cells express the IL6 gene differentially in response to LPS or IL1. *Cell Immunol*. 1989;122(2):493–503.
 89. Rus HG, Vlaicu R, Niculescu F. Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. *Atherosclerosis*. 1996 Dec 20;127(2):263–71.
 90. Huang M, Yang D, Xiang M, Wang J. Role of interleukin-6 in regulation of immune responses to remodeling after myocardial infarction. *Heart Fail Rev*. 2014 Jan;20(1):25–38.
 91. Fredj S, Bescond J, Louault C, Potreau D. Interactions between cardiac cells enhance cardiomyocyte hypertrophy and increase fibroblast proliferation. *J Cell*

- Physiol. 2005 Mar;202(3):891–9.
92. Sano M, Fukuda K, Kodama H, Pan J, Saito M, Matsuzaki J, et al. Interleukin-6 family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2000 Sep 22;275(38):29717–23.
 93. Karpiński Ł, Płaksej R, Derzhko R, Orda A, Witkowska M. Serum levels of interleukin-6, interleukin-10 and C-reactive protein in patients with myocardial infarction treated with primary angioplasty during a 6-month follow-up. *Pol Arch Med Wewn*. 2009;119(3):115–21.
 94. Kobara M, Noda K, Kitamura M, Okamoto A, Shiraishi T, Toba H, et al. Antibody against interleukin-6 receptor attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice.
 95. Fuchs M, Hilfiker A, Kaminski K, Hilfiker-Kleiner D, Guener Z, Klein G, et al. Role of interleukin-6 for LV remodeling and survival after experimental myocardial infarction. *FASEB J*. 2003 Nov;17(14):2118–20.
 96. Iuchi A, Harada H, Tanaka T. IL-6 blockade for myocardial infarction. Vol. 271, *International Journal of Cardiology*. Elsevier Ireland Ltd; 2018. p. 19–20.
 97. Abbate A, Toldo S, Marchetti C, Kron J, Van Tassell BW, Dinarello CA. Interleukin-1 and the Inflammasome as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 2020 Apr 24;126(9):1260–80.
 98. Offner FA, Feichtinger H, Stadlmann S, Obrist P, Marth C, Klingler P, et al. Transforming growth factor- β synthesis by human peritoneal mesothelial cells: Induction by interleukin-1. *Am J Pathol*. 1996 May;148(5):1679–88.
 99. Cozzolino F, Torcia M, Aldinucci D, Ziche M, Almerigogna F, Bani D, et al. Interleukin 1 is an autocrine regulator of human endothelial cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(17):6487–91.
 100. Grames M, Breviario F, Pintucci G, Millet I, Dejana E, van Damme J, et al. Enhancement by interleukin-1 (IL-1) of plasminogen activator inhibitor (PA-I) activity in cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986 Sep 14;139(2):720–7.
 101. Bochner BS, Luscinskas FW, Gimbrone MA, Newman W, Sterbinsky SA, Derse-Anthony CP, et al. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: Contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med*. 1991 Jun 1;173(6):1553–6.
 102. Isoda K, Sawada S, Ishigami N, Matsuki T, Miyazaki K, Kusahara M, et al. Lack of interleukin-1 receptor antagonist modulates plaque composition in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Jun;24(6):1068–73.
 103. Shimokawa H, Ito A, Fukumoto Y, Kadokami T, Nakaike R, Sakata M, et al. Chronic treatment with interleukin-1 β induces coronary intimal lesions and vasospastic responses in pigs in vivo: The role of platelet-derived growth factor. *J Clin Invest*. 1996 Feb 1;97(3):769–76.
 104. Bhaskar V, Yin J, Mirza AM, Phan D, Vanegas S, Issafras H, et al. Monoclonal antibodies targeting IL-1 beta reduce biomarkers of atherosclerosis in vitro and inhibit atherosclerotic plaque formation in Apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2011 Jun;216(2):313–20.
 105. Chamberlain J, Evans D, King A, Dewberry R, Dower S, Crossman D, et al. Interleukin-1 β and signaling of interleukin-1 in vascular wall and circulating cells

- modulates the extent of neointima formation in mice. *Am J Pathol.* 2006 Apr;168(4):1396–403.
106. Liu SJ, Zhou W, Kennedy RH. Suppression of β -adrenergic responsiveness of L-type Ca^{2+} current by IL-1 β in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 1999 Jan;276(1 45-1).
 107. Combes A, Frye CS, Lemster BH, Brooks SS, Watkins SC, Feldman AM, et al. Chronic exposure to interleukin 1 β induces a delayed and reversible alteration in excitation-contraction coupling of cultured cardiomyocytes. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2002;445(2):246–56.
 108. Zell R, Geck P, Werdan K, Boekstegers P. TNF- α and IL-1 α inhibit both pyruvate dehydrogenase activity and mitochondrial function in cardiomyocytes: Evidence for primary impairment of mitochondrial function. *Mol Cell Biochem.* 1997;177(1–2):61–7.
 109. Tatsumi T, Matoba S, Kawahara A, Keira N, Shiraishi J, Akashi K, et al. Cytokine-induced nitric oxide production inhibits mitochondrial energy production and impairs contractile function in rat cardiac myocytes. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Apr;35(5):1338–46.
 110. Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K, Mendoza LH, Li N, Reddy A, et al. Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am J Pathol.* 2008 Jul;173(1):57–67.
 111. Van Tassell BW, Seropian IM, Toldo S, Mezzaroma E, Abbate A. Interleukin-1 β induces a reversible cardiomyopathy in the mouse. *Inflamm Res.* 2013 Jul;62(7):637–40.
 112. van Tassell BW, Arena RA, Toldo S, Mezzaroma E, Azam T, Seropian IM, et al. Enhanced interleukin-1 activity contributes to exercise intolerance in patients with systolic heart failure. *PLoS One.* 2012 Mar 16;7(3).
 113. Furst DE. Anakinra: Review of recombinant human interleukin-I receptor antagonist in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Ther.* 2004 Dec;26(12):1960–75.
 114. Emsley HCA, Smith CJ, Georgiou RF, Vail A, Hopkins SJ, Rothwell NJ, et al. A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005 Oct;76(10):1366–72.
 115. Smith CJ, Emsley HC, Udeh CT, Vail A, Hoadley ME, Rothwell NJ, et al. Interleukin-1 receptor antagonist reverses stroke-associated peripheral immune suppression. *Cytokine.* 2012 Jun 22;58(3):384–9.
 116. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Ehses JA, Donath MY, Mandrup-Poulsen T. Sustained effects of interleukin-1 receptor antagonist treatment in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2009 Sep;32(9):1663–8.
 117. Dailymed. Kineret prescribing information [Internet]. 2018 [cited 2020 Apr 23]. Available from: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=d9d74915-6606-4570-9c52-c4001d3177de>
 118. Curran MP. Canakinumab: In patients with cryopyrin-associated periodic syndromes. Vol. 26, *BioDrugs.* 2012. p. 53–9.
 119. Ridker PM, Howard CP, Walter V, Everett B, Libby P, Hensen J, et al. Effects of interleukin-1 β inhibition with canakinumab on hemoglobin A1c, lipids, C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen a phase IIb randomized, placebo-

- controlled trial. *Circulation*. 2012 Dec 4;126(23):2739–48.
120. Hacıhamdioglu DO, Ozen S. Canakinumab induces remission in a patient with resistant familial Mediterranean fever. *Rheumatology (Oxford)*. 2012 Jun;51(6):1041.
 121. Cantarini L, Vitale A, Borri M, Galeazzi M, Franceschini R. Successful use of canakinumab in a patient with resistant Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol*. 30(3 Suppl 72):S115.
 122. Schlesinger N, Alten RE, Bardin T, Schumacher HR, Bloch M, Gimona A, et al. Canakinumab for acute gouty arthritis in patients with limited treatment options: Results from two randomised, multicentre, active-controlled, double-blind trials and their initial extensions. *Ann Rheum Dis*. 2012 Nov;71(11):1839–48.
 123. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. 2011 Jan;30(1):16–34.
 124. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annu Rev Immunol*. 2015 Mar 21;33(1):257–90.
 125. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. Vol. 140, *Cell*. 2010. p. 805–20.
 126. Beutler BA. TLRs and innate immunity. Vol. 113, *Blood*. 2009. p. 1399–407.
 127. Mitchell D, Olive C. Regulation of Toll-like receptor-induced chemokine production in murine dendritic cells by mitogen-activated protein kinases. *Mol Immunol*. 2010 Jul;47(11–12):2065–73.
 128. Chen L, Yu J. Modulation of Toll-like receptor signaling in innate immunity by natural products. *Int Immunopharmacol*. 2016 Aug 1;37:65–70.
 129. Barbé F, Douglas T, Saleh M. Advances in Nod-like receptors (NLR) biology. Vol. 25, *Cytokine and Growth Factor Reviews*. Elsevier Ltd; 2014. p. 681–97.
 130. Kanneganti TD, Lamkanfi M, Núñez G. Intracellular NOD-like Receptors in Host Defense and Disease. Vol. 27, *Immunity*. Cell Press; 2007. p. 549–59.
 131. Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: A sensor for metabolic danger? Vol. 327, *Science*. 2010. p. 296–300.
 132. Sokolova M, Ranheim T, Louwe MC, Halvorsen B, Yndestad A, Aukrust P. NLRP3 Inflammasome: A Novel Player in Metabolically Induced Inflammation - Potential Influence on the Myocardium. Vol. 74, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2019. p. 276–84.
 133. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. Vol. 13, *Nature Reviews Immunology*. 2013. p. 397–411.
 134. Yang Y, Wang H, Kouadir M, Song H, Shi F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. Vol. 10, *Cell Death and Disease*. Nature Publishing Group; 2019.
 135. Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a novel player in myocardial infarction. *Int Heart J*. 2014;55(2):101–5.
 136. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*. 2015 Oct 29;526(7575):660–5.
 137. Lee HM, Kim JJ, Kim HJ, Shong M, Ku BJ, Jo EK. Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2013

- Jan;62(1):194–204.
138. Kingsbury SR, Conaghan PG, McDermott MF. The role of the NLRP3 inflammasome in gout. Vol. 4, *Journal of Inflammation Research*. Dove Press; 2011. p. 39–49.
 139. Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*. 2013 Jan 31;493(7434):674–8.
 140. Liu Y, Li C, Yin H, Zhang X, Li Y, Yi Y-S. NLRP3 Inflammasome: A Potential Alternative Therapy Target for Atherosclerosis. 2020;
 141. Baba N, Bitton A, Libioulle C, Belaiche J, Gaudet D, Cohen A, et al. Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet*. 2009;41(1):71–6.
 142. Buckley LF, Libby P. Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activity in Acute Myocardial Infarction: A Review of Pharmacologic Agents and Clinical Outcomes. Vol. 74, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2019. p. 297–305.
 143. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2011 Feb 15;123(6):594–604.
 144. Toldo S, Marchetti C, Mauro AG, Chojnacki J, Mezzaroma E, Carbone S, et al. Inhibition of the NLRP3 inflammasome limits the inflammatory injury following myocardial ischemia-reperfusion in the mouse. *Int J Cardiol*. 2016 Apr 15;209:215–20.
 145. Mezzaroma E, Toldo S, Farkas D, Seropian IM, Van Tassell BW, Salloum FN, et al. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Dec 6;108(49):19725–30.
 146. Pinto DS, Kirtane AJ, Nallamothu BK, Murphy SA, Cohen DJ, Laham RJ, et al. Hospital delays in reperfusion for ST-elevation myocardial infarction: Implications when selecting a reperfusion strategy. *Circulation*. 2006 Nov 7;114(19):2019–25.
 147. Avezum Junior Á, Feldman A, Carvalho ACDC, Sousa ACS, Mansur ADP, Bozza AEZ, et al. V Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio com Supradesnível do Segmento ST. *Arq Bras Cardiol*. 2015 Aug 1;105(2):1–105.
 148. Lee TH, Weisberg MC, Brand DA, Rouan GW, Goldman L. Candidates for thrombolysis among emergency room patients with acute chest pain. Potential true- and false-positive rates. *Ann Intern Med*. 1989 Jun 15;110(12):957–62.
 149. Dickstein K, Vardas PE, Auricchio A, Daubert J-C, Linde C, McMurray J, et al. 2010 Focused Update of ESC Guidelines on device therapy in heart failure: an update of the 2008 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of a... - PubMed - NCBI [Internet]. *European Heart Journal*. 2010 [cited 2020 Apr 24]. p. 2677–87. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20801924>
 150. Steg PG, Dabbous OH, Feldman LJ, Cohen-Solal A, Aumont MC, López-Sendón J, et al. Determinants and Prognostic Impact of Heart Failure Complicating Acute Coronary Syndromes: Observations from the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). *Circulation*. 2004 Feb 3;109(4):494–9.

151. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, et al. Heart disease and stroke statistics - 2018 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*. 2018 Mar 1;137(12):E67–492.
152. Rohde LEP, Montera MW, Bocchi EA, Clausell NO, de Albuquerque DC, Rassi S, et al. Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica e aguda. *Arq Bras Cardiol*. 2018 Sep 1;111(3):436–539.
153. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, et al. Heart Disease and Stroke Statistics'2017 Update: A Report from the American Heart Association. Vol. 135, *Circulation*. Lippincott Williams and Wilkins; 2017. p. e146–603.
154. Bocchi EA, Arias A, Verdejo H, Diez M, Gómez E, Castro P. The reality of heart failure in Latin America. Vol. 62, *Journal of the American College of Cardiology*. 2013. p. 949–58.
155. Mohseni H, Kiran A, Khorshidi R, Rahimi K. Influenza vaccination and risk of hospitalization in patients with heart failure: a self-controlled case series study. *Eur Heart J*. 2017;38:326–33.
156. Cooper LB, Mentz RJ, Sun JL, Schulte PJ, Fleg JL, Cooper LS, et al. Psychosocial Factors, Exercise Adherence, and Outcomes in Heart Failure Patients: Insights From Heart Failure: A Controlled Trial Investigating Outcomes of Exercise Training (HF-ACTION). *Circ Hear Fail*. 2015 Nov 1;8(6):1044–51.
157. Lavie CJ, Sharma A, Alpert MA, De Schutter A, Lopez-Jimenez F, Milani R V., et al. Update on Obesity and Obesity Paradox in Heart Failure. Vol. 58, *Progress in Cardiovascular Diseases*. W.B. Saunders; 2016. p. 393–400.
158. Hjalmarson A, Goldstein S, Fagerberg B, Wedel H, Waagstein F, Kjekshus J, et al. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet*. 1999 Jun 12;353(9169):2001–7.
159. Dargie HJ, Lechat P. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): A randomised trial. *Lancet*. 1999 Jan 2;353(9146):9–13.
160. Pfeffer MA, McMurray JJV, Velazquez EJ, Rouleau JL, Køber L, Maggioni AP, et al. Valsartan, Captopril, or Both in Myocardial Infarction Complicated by Heart Failure, Left Ventricular Dysfunction, or Both. *N Engl J Med*. 2003 Nov 13;349(20):1893–906.
161. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Drazner MH, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: A report of the American college of cardiology foundation/American heart association task force on practice guidelines. *Circulation*. 2013 Oct 15;128(16).
162. McMurray JJV, DeMets DL, Inzucchi SE, Køber L, Kosiborod MN, Langkilde AM, et al. A trial to evaluate the effect of the sodium–glucose co-transporter 2 inhibitor dapagliflozin on morbidity and mortality in patients with heart failure and reduced left ventricular ejection fraction (DAPA-HF). *Eur J Heart Fail*. 2019 May 1;21(5):665–75.
163. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Colvin MM, et al. 2016 ACC/AHA/HFSA focused update on new pharmacological therapy for heart failure: An update of the 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Failure

- Society of America. Vol. 134, *Circulation*. Lippincott Williams and Wilkins; 2016. p. e282–93.
164. Tazaki J, Shiomi H, Morimoto T, Imai M, Yamaji K, Sakata R, et al. Three-year outcome after percutaneous coronary intervention and coronary artery bypass grafting in patients with triple-vessel coronary artery disease: Observations from the CREDO-Kyoto PCI/CABG registry cohort-2. *EuroIntervention*. 2013 Aug 22;9(4):437–45.
 165. Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U, et al. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. Vol. 40, *European Heart Journal*. Oxford University Press; 2019. p. 87–165.
 166. Wilson SR, Givertz MM, Stewart GC, Mudge GH. Ventricular Assist Devices. The Challenges of Outpatient Management. Vol. 54, *Journal of the American College of Cardiology*. *Journal of the American College of Cardiology*; 2009. p. 1647–59.
 167. Cooley DA. The total artificial heart. Vol. 9, *Nature Medicine*. 2003. p. 108–11.
 168. Liotta D, Hall CW, Henly WS, Cooley DA, Crawford ES, DeBakey ME. Prolonged assisted circulation during and after cardiac or aortic surgery. Prolonged partial left ventricular bypass by means of intracorporeal circulation. *Am J Cardiol*. 1963 Sep;12(3):399–405.
 169. E.A. B, M.L. V, A. F, S. H, M. M, A. L, et al. Hemodynamic and neurohormonal profile during assisted circulation with heterotopic artificial ventricle followed by heart transplantation. *Arq Bras Cardiol*. 1994;62(1):23–7.
 170. Cook JL, Colvin M, Francis GS, Grady KL, Hoffman TM, Jessup M, et al. Recommendations for the Use of Mechanical Circulatory Support: Ambulatory and Community Patient Care: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2017 Jun 20;135(25):e1145–58.
 171. Kirklin JK, Naftel DC, Pagani FD, Kormos RL, Stevenson LW, Blume ED, et al. Seventh INTERMACS annual report: 15,000 patients and counting. *J Hear Lung Transplant*. 2015 Dec 1;34(12):1495–504.
 172. Han J, Trumble DR. Cardiac assist devices: Early concepts, current technologies, and future innovations. Vol. 6, *Bioengineering*. MDPI AG; 2019.
 173. Baras Shreibati J, Goldhaber-Fiebert JD, Banerjee D, Owens DK, Hlatky MA. Cost-Effectiveness of Left Ventricular Assist Devices in Ambulatory Patients With Advanced Heart Failure. *JACC Hear Fail*. 2017 Feb 1;5(2):110–9.
 174. BENÍCIO A, MOREIRA LFP, HAYASHIDA S, CESTARI IA, LEIRNER AA, STOLF NAG, et al. Avaliação do desempenho hemodinâmico do dispositivo de assistência ventricular InCor como substituto do coração esquerdo. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 1999 Jul;14(3):237–46.
 175. KUBRUSLY LF, MARTINS AF, MADEIRA J, SAVYTZY S, WOLLMAN D, MELHEM A, et al. Dispositivo de assistência circulatória mecânica intraventricular de fluxo axial: estudo in vitro. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2000 Jun;15(2):169–72.
 176. Mehra MR, Canter CE, Hannan MM, Semigran MJ, Uber PA, Baran DA, et al. The 2016 International Society for Heart Lung Transplantation listing criteria for heart transplantation: A 10-year update. *J Hear Lung Transplant*. 2016 Jan 1;35(1):1–23.
 177. Kittleson MM, Kobashigawa JA. Cardiac Transplantation: Current Outcomes and Contemporary Controversies. Vol. 5, *JACC: Heart Failure*. Elsevier Inc.; 2017. p. 857–68.

178. Barnard CN. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *South African Med J.* 1967 Dec 30;41(48):1271–4.
179. Stolf NAG, Braile DM. Euryclides de Jesus Zerbini: a biography. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2012;27(1):137–47.
180. Rossano JW, Cherikh WS, Chambers DC, Goldfarb S, Khush K, Kucheryavaya AY, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twentieth Pediatric Heart Transplantation Report-2017; Focus Theme: Allograft ischemic time. 2017;
181. Vega JD, Moore J, Murray S, Chen JM, Johnson MR, Dyke DB. Heart Transplantation in the United States, 1998-2007. *Am J Transplant.* 2009 Apr 1;9(4p2):932–41.
182. Goldstein BA, Thomas L, Zaroff JG, Nguyen J, Menza R, Khush KK. Assessment of heart transplant waitlist time and pre-and post-transplant failure: A mixed methods approach.
183. Registro Brasileiro de Transplantes. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado - 2019. 2019.
184. De Jonge N, Kirkels JH, Klöpping C, Lahpor JR, Caliskan K, Maat APWM, et al. Guidelines for heart transplantation. Vol. 16, *Netherlands Heart Journal*. Bohn Stafleu van Loghum; 2008. p. 79–87.
185. Machado-Júnior PAB, Blume GG, Francisco JC, Guarita-Souza LC. Cell-Based Therapies for Myocardial Regeneration in Heart Failure: 20 Years of Debate. Vol. 35, *Brazilian journal of cardiovascular surgery*. NLM (Medline); 2020. p. VIII–XI.
186. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring H-J, Evangelista M, et al. Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells.* 2008 Feb;26(2):300–11.
187. Van Herendael BJ, Oberti C, Brosens I. Microanatomy of the human amniotic membrane. A light microscopic, transmission, and scanning electron microscopic study. *Am J Obstet Gynecol.* 1978;131(8):872–80.
188. Toda A, Okabe M, Yoshida T, Nikaido T. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. Vol. 105, *Journal of Pharmacological Sciences*. 2007. p. 215–28.
189. Malhotra C, Jain AK. Human amniotic membrane transplantation: Different modalities of its use in ophthalmology. *World J Transplant.* 2014;4(2):111.
190. Fukuda K, Chikama TI, Nakamura M, Nishida T. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea.* 1999;18(1):73–9.
191. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea.* 2001;20(4):408–13.
192. Park WC, Tseng SC. Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood, and amniotic membrane in PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000 Sep;41(10):2906–14.
193. Li H, Niederkorn JY, Neelam S, Mayhew E, Word RA, McCulley JP, et al. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Investig*

- Ophthalmol Vis Sci. 2005 Mar;46(3):900–7.
194. Kjaergaard N, Helmig RB, Schønheyder HC, Ulbjerg N, Hansen ES, Madsen H. Chorioamniotic membranes constitute a competent barrier to group b streptococcus in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999 Apr 1;83(2):165–9.
 195. Kjaergaard N, Hein M, Hyttel L, Helmig RB, Schonheyder HC, Ulbjerg N, et al. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001;94(2):224–9.
 196. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SCG. Suppression of interleukin 1 α and interleukin 1 β in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol.* 2001;85(4):444–9.
 197. Galask RP, Snyder IS. Antimicrobial factors in amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol.* 1970 Jan 1;106(1):59–65.
 198. Tahara M, Tasaka K, Masumoto N, Adachi K, Adachi H, Ikebuchi Y, et al. Expression of messenger ribonucleic acid for epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- α (TGF α), and EGF receptor in human amnion cells: Possible role of TGF α in prostaglandin E2 synthesis and cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995 Jan;80(1):138–46.
 199. Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res.* 2000;20(3):173–7.
 200. Brown GL, Nanney LB, Griffen J, Cramer AB, Yancey JM, Curtsinger LJ, et al. Enhancement of Wound Healing by Topical Treatment with Epidermal Growth Factor. *N Engl J Med.* 1989 Jul 13;321(2):76–9.
 201. Hudson LG, McCawley LJ. Contributions of the epidermal growth factor receptor to keratinocyte motility. *Microsc Res Tech.* 1998 Dec 1;43(5):444–55.
 202. Ogawa K, Chen F, Kuang C, Chen Y. Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor- β is mediated by a nuclear factor- κ B site. *Biochem J.* 2004 Jul 15;381(2):413–22.
 203. Greenwel P, Inagaki Y, Hu W, Walsh M, Ramirez F. Sp1 is required for the early response of α 2(I) collagen to transforming growth factor- β 1. *J Biol Chem.* 1997 Aug 8;272(32):19738–45.
 204. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(7):1539–46.
 205. Adinolfi M, Akle CA, McColl I, Fensom AH, Tansley L, Connolly P, et al. Expression of HLA antigens, β 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature.* 1982;295(5847):325–7.
 206. Akle CA, Welsh KI, Adinolfi M, Leibowitz S, Mccoll I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet.* 1981 Nov 7;318(8254):1003–5.
 207. Chopra A, Thomas BS. Amniotic Membrane: A Novel Material for Regeneration and Repair. *J Biomimetics Biomater Tissue Eng.* 2013;18(1):1–8.
 208. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian A. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cells Mater.* 2008 Apr 29;7:88–99.

209. Kar IB, Singh AK, Mohapatra PC, Mohanty PK, Misra S. Repair of oral mucosal defects with cryopreserved human amniotic membrane grafts: Prospective clinical study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Nov 1;43(11):1339–44.
210. Akazawa K, Iwasaki K, Nagata M, Yokoyama N, Ayame H, Yamaki K, et al. Cell transfer technology for tissue engineering. *Inflamm Regen*. 2017 Dec 16;37(1):21.
211. Selver ÖB, Yağcı A, Eğrilmez S, Gürdal M, Palamar M, Çavuşoğlu T, et al. Limbal stem cell deficiency and treatment with stem cell transplantation. Vol. 47, *Turkish Journal of Ophthalmology*. Turkish Ophthalmology Society; 2017. p. 285–91.
212. Li J-Y, Ren K-K, Zhang W-J, Xiao L, Wu H-Y, Liu Q-Y, et al. Human amniotic mesenchymal stem cells and their paracrine factors promote wound healing by inhibiting heat stress-induced skin cell apoptosis and enhancing their proliferation through activating PI3K/AKT signaling pathway. *Stem Cell Res Ther*. 2019 Dec 9;10(1):247.
213. Rennie K, Gruslin A, Hengstschläger M, Pei D, Cai J, Nikaido T, et al. Applications of Amniotic Membrane and Fluid in Stem Cell Biology and Regenerative Medicine. *Stem Cells Int*. 2012;2012:13.
214. Hill SJ. Placental amniotic membrane: the pathway to ocular transplantation. Vol. 88, *AORN journal*. 2008.
215. Arora R, Mehta D, Jain V. Amniotic membrane transplantation in acute chemical burns. *Eye*. 2005;19(3):273–8.
216. Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. Vol. 31, *Biomaterials*. 2010. p. 216–25.
217. Maral T, Borman H, Arslan H, Demirhan B, Akinbingol G, Haberal M. Effectiveness of human amnion preserved long-term in glycerol as a temporary biological dressing. *Burns*. 1999 Nov;25(7):625–35.
218. Russo A, Bonci P, Bonci P. The effects of different preservation processes on the total protein and growth factor content in a new biological product developed from human amniotic membrane. *Cell Tissue Bank*. 2012 Jun;13(2):353–61.
219. Gupta A, Kedige SD, Jain K. Amnion and Chorion Membranes: Potential Stem Cell Reservoir with Wide Applications in Periodontics. 2015;
220. Adds PJ, Hunt CJ, Dart JKG. Amniotic membrane grafts, “fresh” or frozen? A clinical and in vitro comparison. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(8):905–7.
221. Wolbank S, Hildner F, Redl H, Van Griensven M, Gabriel C, Hennerbichler S. Impact of human amniotic membrane preparation on release of angiogenic factors. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009;3(8):651–4.
222. Jorge LF, Francisco JC, Bergonse N, Baena C, Carvalho KAT, Abdelwahid E, et al. Tracheal repair with acellular human amniotic membrane in a rabbit model. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018 Mar 1;12(3):e1525–30.
223. DAVIS JS. Skin Grafting at the Johns Hopkins Hospital. *Ann Surg*. 1909 Sep;50(3):542–9.
224. de ROTTH A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. *Arch Ophthalmol*. 1940 Mar 1;23(3):522–5.
225. Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, Lionetti V, Cavallini C, Scarlata I, 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. *J Biol Chem*. 2007 May 11;282(19):14243–52.
226. 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(10–11):1147–59.
227. Fujimoto KL, Miki T, Liu LJ, Hashizume R, Strom SC, Wagner WR, et al. Naive rat amnion-derived cell transplantation improved left ventricular function and reduced myocardial scar of postinfarcted heart. *Cell Transplant*. 2009;18(4):477–86.
228. Tsuji H, Miyoshi S, Ikegami Y, Hida N, Asada H, Togashi I, et al. Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. *Circ Res*. 2010 May 28;106(10):1613–23.
229. Fang CH, Jin J, Joe JH, Song YS, So BI, Lim SM, 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):1687–96.
230. Kim SW, Zhang HZ, Kim CE, Kim JM, Kim MH. Amniotic mesenchymal stem cells with robust chemotactic properties are effective in the treatment of a myocardial infarction model. *Int J Cardiol*. 2013 Sep 30;168(2):1062–9.
231. Song YS, Joo HW, Park IH, Shen GY, Lee Y, Shin JH, et al. Transplanted human amniotic epithelial cells secrete paracrine proangiogenic cytokines in rat model of myocardial infarction. *Cell Transplant*. 2015 Oct 13;24(10):2055–64.
232. Danieli P, Malpasso G, Ciuffreda MC, Cervio E, Calvillo L, Copes F, et al. Conditioned Medium From Human Amniotic Mesenchymal Stromal Cells Limits Infarct Size and Enhances Angiogenesis. *Stem Cells Transl Med*. 2015 May;4(5):448–58.
233. Henry JJD, Delrosario L, Fang J, Wong SY, Fang Q, Sievers R, et al. Development of Injectable Amniotic Membrane Matrix for Postmyocardial Infarction Tissue Repair. *Adv Healthc Mater*. 2020 Jan 1;9(2).
234. Gorjipour F, Hosseini-Gohari L, Alizadeh Ghavidel A, Hajimiresmaei SJ, Naderi N, Darbandi Azar A, et al. Mesenchymal stem cells from human amniotic membrane differentiate into cardiomyocytes and endothelial-like cells without improving cardiac function after surgical administration in rat model of chronic heart failure. *J Cardiovasc Thorac Res*. 2019 Feb 25;11(1):35–42.
235. Francisco JC, Uemura L, Simeoni RB, da Cunha RC, Mogharbel BF, Simeoni PRB, et al. Acellular human amniotic membrane scaffold with 15d-PGJ2 nanoparticles in post-infarct rat model. *Tissue Eng Part A*. 2020 Jun 3;
236. Lerou PH, Daley GQ. Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev*. 2005;19(6):321–31.
237. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future.
238. Volarevic V, Markovic BS, Gazdic M, Volarevic A, Jovicic N, Arsenijevic N, et al. Ethical and safety issues of stem cell-based therapy. Vol. 15, *International Journal of Medical Sciences*. Ivyspring International Publisher; 2018. p. 36–45.

239. Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, Amit M, Andrews PW, Beighton G, et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol.* 2007;25(7):803–16.
240. Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. Vol. 11, *Nature Reviews Cancer.* 2011. p. 268–77.
241. Thomson JA. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* (80-). 1998 Nov 6;282(5391):1145–7.
242. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):663–76.
243. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 2007 Nov 30;131(5):861–72.
244. Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, et al. Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells Are Distinguished by Gene Expression Signatures. *Cell Stem Cell.* 2009 Jul 2;5(1):111–23.
245. Bilic J, Izpisua Belmonte JC. Concise review: Induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells: Close enough or yet too far apart? Vol. 30, *Stem Cells.* 2012. p. 33–41.
246. Riggs JW, Barrilleaux BL, Varlakhanova N, Bush KM, Chan V, Knoepfler PS. Induced pluripotency and oncogenic transformation are related processes. *Stem Cells Dev.* 2013 Jan 1;22(1):37–50.
247. Goradel NH, Hour FG, Negahdari B, Malekshahi ZV, Hashemzahi M, Masoudifar A, et al. Stem Cell Therapy: A New Therapeutic Option for Cardiovascular Diseases. *J Cell Biochem.* 2018 Jan 1;119(1):95–104.
248. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takahashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy.* 2004;6(6):543–53.
249. Li H, Ghazanfari R, Zacharaki D, Lim HC, Scheduling S. Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2016 Apr 1;1370(1):109–18.
250. Branco E, Miranda CMFC, Lima AR, Silva KSM, Cabral RM, Miranda MS, et al. Bone marrow mononuclear cells versus mesenchymal stem cells from adipose tissue on bone healing in an Old World primate: Can this be extrapolated to humans? *Arq Bras Med Vet e Zootec.* 2019 May 1;71(3):917–28.
251. Friedenstein AJ, Petrakova K V, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968 Mar;6(2):230–47.
252. Guarita-Souza LC, Carvalho KAT de, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, Furuta M, et al. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2005 Sep;20(3):270–8.
253. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641–50.
254. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006

- Aug;8(4):315–7.
255. B??yum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Investig Suppl.* 1968;97:77–89.
 256. Gneccchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. Vol. 103, *Circulation Research*. 2008. p. 1204–19.
 257. Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Stimulate Cardiac Stem Cell Proliferation and Differentiation. *Circ Res.* 2010 Oct 1;107(7):913–22.
 258. Yan W, Abu-El-Rub E, Saravanan S, Kirshenbaum LA, Arora RC, Dhingra S. Inflammation in myocardial injury: Mesenchymal stem cells as potential immunomodulators. Vol. 317, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. American Physiological Society; 2019. p. H213–25.
 259. Miteva K, Pappritz K, El-Shafeey M, Dong F, Ringe J, Tschöpe C, et al. Mesenchymal stromal cells modulate monocytes trafficking in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Stem Cells Transl Med.* 2017 Apr 1;6(4):1249–61.
 260. Won JK, Kang HJ, Kim HS, Chung JK, Myung CL, Dong SL. Tissue distribution of 18F-FDG-labeled peripheral hematopoietic stem cells after intracoronary administration in patients with myocardial infarction. *J Nucl Med.* 2006 Aug 1;47(8):1295–301.
 261. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: Feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation.* 2003 Aug 19;108(7):863–8.
 262. Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B, et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation.* 2005 May 3;111(17):2198–202.
 263. Mozid AM, Arnous S, Sammut EC, Mathur A. Stem cell therapy for heart diseases.
 264. Dib N, Khawaja H, Varner S, McCarthy M, Campbell A. Cell therapy for cardiovascular disease: A comparison of methods of delivery. Vol. 4, *Journal of Cardiovascular Translational Research*. Springer New York LLC; 2011. p. 177–81.
 265. Dib N, Menasche P, Bartunek JJ, Zeiher AM, Terzic A, Chronos NA, et al. Recommendations for Successful Training on Methods of Delivery of Biologics for Cardiac Regeneration. A Report of the International Society for Cardiovascular Translational Research. Vol. 3, *JACC: Cardiovascular Interventions*. 2010. p. 265–75.
 266. Pompilio G, Steinhoff G, Liebold A, Pesce M, Alamanni F, Capogrossi MC, et al. Direct minimally invasive intramyocardial injection of bone marrow-derived AC133+ stem cells in patients with refractory ischemia: Preliminary results. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2008 Mar;56(2):71–6.
 267. Patel AN, Geffner L, Vina RF, Saslavsky J, Urschel HC, Kormos R, et al. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: A prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005 Dec 1;130(6):1631-1638.e2.
 268. Mäkelä J, Anttila V, Ylitalo K, Takalo R, Lehtonen S, Mäkikallio T, et al. Acute

- homing of bone marrow-derived mononuclear cells in intramyocardial vs. intracoronary transplantation. *Scand Cardiovasc J*. 2009;43(6):366–73.
269. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001 Apr 5;410(6829):701–5.
270. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Säwén P, Röhl W, Hescheler J, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med*. 2004 May;10(5):494–501.
271. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004 Apr 8;428(6983):664–8.
272. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissmann IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004 Apr 8;428(6983):668–73.
273. Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002 Dec 10;106(24):3009–17.
274. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: The BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004 Jul 10;364(9429):141–8.
275. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, et al. Intracoronary Bone Marrow-Derived Progenitor Cells in Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2006 Sep 21;355(12):1210–21.
276. Wollert KC, Meyer GP, Müller-Ehmsen J, Tschöpe C, Bonarjee V, Larsen AI, et al. Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: The BOOST-2 randomised placebo-controlled clinical trial. *Eur Heart J*. 2017 Oct 14;38(39):2936–43.
277. Research RM, Moyé L, Traverse JH, Henry TD, Pepine CJ, Willerson JT, et al. TIME Trial: Effect of Timing of Stem Cell Delivery Following ST-Elevation Myocardial Infarction on the Recovery of Global and Regional Left Ventricular Function Final 2-Year Analysis. 2017;
278. Gastl M, Sürder D, Corti R, Faruque Osmany DMM, Gotschy A, von Spiczak J, et al. Effect of intracoronary bone marrow-derived mononuclear cell injection early and late after myocardial infarction on CMR-derived myocardial strain. *Int J Cardiol*. 2020;
279. Hirsch A, Nijveldt R, Van Der Vleuten PA, Tijssen JGP, Van Der Giessen WJ, Tio RA, 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. *Eur Heart J*. 2011 Jul;32(14):1736–47.
280. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: Double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2006 Jan 14;367(9505):113–21.

281. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, et al. Intracoronary Injection of Mononuclear Bone Marrow Cells in Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2006 Sep 21;355(12):1199–209.
282. Choudry F, Hamshere S, Saunders N, Veerapen J, Bavnbek K, Knight C, et al. A randomized double-blind control study of early intra-coronary autologous bone marrow cell infusion in acute myocardial infarction: the REGENERATE-AMI clinical trial†. *Eur Heart J*. 2015 Sep 24;37(3):256–63.
283. Fisher SA, Zhang H, Doree C, Mathur A, Martin-Rendon E. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. Vol. 2015, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd; 2015.
284. Carvalho KAT, Guarita-Souza LC, Rebelatto CLK, Senegaglia AC, Hansen P, Mendonça JGR, et al. Could the coculture of skeletal myoblasts and mesenchymal stem cells be a solution for postinfarction myocardial scar? In: *Transplantation Proceedings*. 2004. p. 991–2.
285. Carvalho KAT, Guarita-Souza LC, Hansen P, Rebelatto CLK, Senegaglia AC, Miyague N, 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 Jun 1;38(5):1596–602.
286. Dib N, Michler RE, Pagani FD, Wright S, Kereiakes DJ, Lengerich R, et al. Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: Four-year follow-up. *Circulation*. 2005 Sep 20;112(12):1748–55.
287. Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, et al. The myoblast autologous grafting in ischemic cardiomyopathy (MAGIC) trial: First randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*. 2008;117(9):1189–200.
288. Duckers HJ, Houtgraaf J, Hehrlein C, Schofer J, Waltenberger J, Gershlick A, et al. Final results of a phase IIa, randomised, open-label trial to evaluate the percutaneous intramyocardial transplantation of autologous skeletal myoblasts in congestive heart failure patients: The SEISMIC trial. *EuroIntervention*. 2011;6(7):805–12.
289. Dib N, Dinsmore J, Lababidi Z, White B, Moravec S, Campbell A, et al. One-Year Follow-Up of Feasibility and Safety of the First U.S., Randomized, Controlled Study Using 3-Dimensional Guided Catheter-Based Delivery of Autologous Skeletal Myoblasts for Ischemic Cardiomyopathy (CAuSMIC Study). *JACC Cardiovasc Interv*. 2009 Jan;2(1):9–16.
290. Povsic TJ, O'Connor CM, Henry T, Taussig A, Kereiakes DJ, Fortuin FD, et al. A double-blind, randomized, controlled, multicenter study to assess the safety and cardiovascular effects of skeletal myoblast implantation by catheter delivery in patients with chronic heart failure after myocardial infarction. *Am Heart J*. 2011 Oct 1;162(4):654-662.e1.
291. Ang KL, Chin D, Leyva F, Foley P, Kubal C, Chalil S, et al. Randomized, controlled trial of intramuscular or intracoronary injection of autologous bone marrow cells into scarred myocardium during CABG versus CABG alone. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008;5(10):663–70.
292. Stamm C, Kleine HD, Choi YH, Dunkelmann S, Lauffs JA, Lorenzen B, et al. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery

- bypass grafting for chronic ischemic heart disease: Safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;133(3).
293. Perin EC, Dohmann HFR, Borojevic R, Silva SA, Sousa ALS, Mesquita CT, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation.* 2003 May 13;107(18):2294–302.
 294. Fisher SA, Doree C, Mathur A, Taggart DP, Martin-Rendon E. Stem cell therapy for chronic ischaemic heart disease and congestive heart failure. Vol. 2016, *Cochrane Database of Systematic Reviews.* John Wiley and Sons Ltd; 2016. p. CD007888–CD007888.
 295. Rossi MA, Goncalves S, Ribeiro Dos Santos R. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. *Am J Pathol.* 1984 Feb 1;114(2):209–16.
 296. Guarita-Souza LC, Carvalho KAT, Woitowicz V, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, et al. Simultaneous autologous transplantation of cocultured mesenchymal stem cells and skeletal myoblasts improves ventricular function in a murine model of Chagas disease. *Circulation.* 2006 Jul;114(SUPPL. 1).
 297. Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MBP, Mota A, Pinho-Filho JA, Gonçalves Almeida AJ, et al. Resultados iniciais do transplante de células de medula óssea para o miocárdio de pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia chagásica. *Arq Bras Cardiol.* 2006 Aug;87(2):159–66.
 298. Dos Santos RR, Rassi S, Feitosa G, Grecco OT, Rassi A, Da Cunha AB, et al. Cell therapy in chagas cardiomyopathy (Chagas arm of the multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies study): A multicenter randomized trial. *Circulation.* 2012 May 22;125(20):2454–61.

ANEXO 01 – APROVAÇÃO NO CEUA



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 08 de novembro de 2018.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 01273 – 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO: *EFEITOS DA MATRIZ DE MEMBRANA AMNIÓTICA ACELULAR E DAS CÉLULAS-TRONCO NO REMODELAMENTO CARDÍACO PÓS-INFARTO DO MIOCÁRDIO EM RATOS*

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

LUIZ CEZAR GUARITA SOUZA

EQUIPE DE PESQUISA

Rossana Baggio Simeoni, Julio Cesar Francisco, Anna Flavia Santos, Laércio Uema, Raul Nisch Pigatto Paulo Andre Machado

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CURSO

Escola de Medicina

VIGÊNCIA DO PROJETO	Novembro/2018 a Novembro 2020	QUANTIDADE DE ANIMAIS	40
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Rattus norvegicus</i>	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	Macho	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	Adulto / 250g	ESPECIE – GRUPO TAXONÔMICOS (de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	UFPR	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado da CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi **APROVADO** pela CEUA - PUCPR em reunião de colegiado. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório á CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por esta CEUA em qualquer tempo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Sérgio Luiz Rogha

Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais



Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br

Cell-Based Therapies for Myocardial Regeneration in Heart Failure: 20 Years of Debate

Paulo André Bispo Machado-Júnior¹; Gustavo Gavazzoni Blume¹, MD; Julio César Francisco², PhD; Luiz César Guarita-Souza¹, MD, PhD

DOI: 10.21470/1678-9741-2020-0362

Heart failure (HF) is still a challenging disease around the world, and despite the advances in pharmacological approaches and surgical techniques over the past few years, the recovery of the contractility of cardiomyocytes after an injury in the heart is still not feasible.

Heart transplantation remains as the most effective treatment for this patient population, and the techniques regarding this procedure had made huge progress since the first transplant, performed in 1967 by Dr Christiaan Barnard. Despite this, the challenges in candidate selection, shortage of organ donors, and comorbidities that may contraindicate the postoperative immunosuppression are factors that still limit the transplant to a selected group of patients. This scenario has encouraged research for alternative therapeutic approaches for HF, aiming the regeneration of the heart tissue^[1].

Several agents have been studied for this purpose: fetal cardiomyocytes, skeletal myoblasts, embryonic and adult stem cells (SC), synthetic polymers, human and non-human collagen gels, and decellularized tissues. These therapies aim to provide a cell-matrix integration that provides an improvement of global cardiac function either through differentiation into cardiomyocytes, paracrine, and immunomodulatory actions, or providing a three-dimensional structure that enables cell adhesion, survival, and proliferation.

Fetal cardiomyocytes were the agents initially evaluated, and the results showed capacity of colonization of the infarcted area with gain of cellular function. However, its use was abandoned due to the need for immunosuppression and ethical issues involved. Later, skeletal myoblasts were tested, principally for their self-regenerating characteristics, with regional functional improvements and colonization of the transplanted region; yet, by their non-differentiation into cardiomyocytes and the maintenance of their

phenotypic characteristics, a process of fatty degeneration was commonly triggered, with consequent ventricular arrhythmias after the implantation, and the anti-remodeling effect in transmural infarction models was not observed^[2].

To date, the most studied agents are SC. These cells had raised great expectation on the part of researchers and patients about the differentiation potentials into other subtypes lines such as nervous, blood, bone, and cardiac tissue, due to the capacity of self-renewal, proliferation, and differentiation into other cell lines (Table 1).

In 2001, Orlic et al.^[3] suggested the SC ability to transdifferentiate into cardiomyocytes after using bone marrow SC in a model of coronary artery ligation in rats, with significant improvements in ejection fraction on the animal model. These results were not replicated in subsequent experiments, but studies with SC advanced through several clinical trials around the world.

Due to the pluripotential characteristic and medium-dependent differentiation, the results of the studies were mainly related to the underlying pathologies in topic. In transmural infarction models, the functional benefit was discreet since these cells presented difficulty in differentiating into cardiomyocytes, similarly as in models of dilated cardiomyopathy with the predominance of fibrosis. In contrast, when the studies were related to ischemic pathologies, the results were more encouraging, justified by the possibility of neovascularization in the regions on which the cells were injected^[4].

Other studies evaluated the association of skeletal myoblasts and adult SC (cell coculture), based on the hypothesis that adult SC could stimulate neoangiogenesis and the myoblasts would provide the regeneration of the cell tissue, both in autologous form. The functional benefits were identified in both models of transmural infarction and Chagasic cardiomyopathy, but the left ventricular

¹Post-Graduation program in Health Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR, Brazil.

²Universidade Positivo (UP), Curitiba, PR, Brazil.

Correspondence Address:

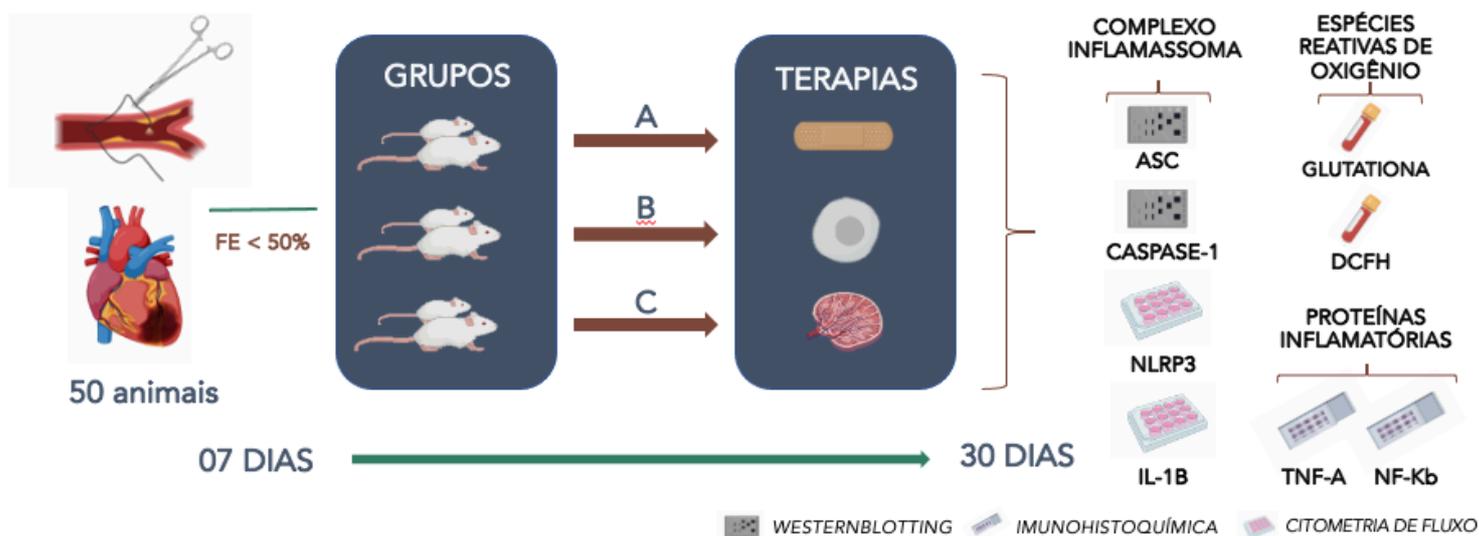
Luiz César Guarita-Souza

 <https://orcid.org/0000-0003-2781-9705>

E-mail: cesar.souza@pucpr.br

ANEXO 03 – GRÁFICOS RESUMO

ANÁLISE BIOQUÍMICA E HISTOPATOLÓGICA DOS EFEITOS DA MATRIZ DE MEMBRANA AMNIÓTICA ACELULAR E DAS CÉLULAS-TRONCO NO INFARTO DO MIOCÁRDIO EM RATOS



Human Amniotic membrane in myocardial infarction

