



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

**Efeitos da matriz de membrana amniótica acelular e das  
células-tronco no remodelamento cardíaco pós-infarto do  
miocárdio em ratos.**

**DOUTORANDO: Gustavo Gavazzoni Blume**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza**

**Curitiba**

**Outubro/2021**



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

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

Aos 28 dias do mês de outubro de 2021 às 19:00, realizou-se a sessão aberta de Defesa de Tese “Efeitos da matriz de membrana amniótica acelular e das células-tronco no remodelamento cardíaco pós-infarto do miocárdio em ratos” apresentado por **Gustavo Gavazzoni Blume** para obtenção do título de Doutor; Área de concentração: Pesquisa Médica Translacional.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
<b>Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza - Presidente</b>	
<b>Profa. Dra. Lidia Ana Zytynski Moura (PUCPR)</b>	
<b>Prof. Dr. José Carlos Moura Jorge (PUCPR)</b>	
<b>Prof. Dr. Emilton Lima Junior (UFPR)</b>	
<b>Prof. Dr. Luiz Antonio Rivetti (Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo)</b>	

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

<b>Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza</b>	Conceito: Aprovado
<b>Profa. Dra. Lidia Ana Zytynski Moura</b>	Conceito: Aprovado
<b>Prof. Dr. José Carlos Moura Jorge</b>	Conceito: Aprovado
<b>Prof. Dr. Emilton Lima Junior</b>	Conceito: Aprovado
<b>Prof. Dr. Luiz Antonio Rivetti</b>	Conceito: Aprovado Parecer Final: Aprovado

**Observações da Banca Examinadora:**

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

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

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

**Efeitos da matriz de membrana amniótica acelular e das  
células-tronco no remodelamento cardíaco pós-infarto do  
miocárdio em ratos.**

**Dissertação de Tese de Doutorado apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para  
obtenção do título Doutor em Ciências da Saúde.**

Orientador: Prof. Dr. Luiz César Guarita de Souza

Curitiba  
Outubro/2021

## Dedicatória

*“A minha esposa e filhas, alicerces da minha existência.”*

## RESUMO

**Introdução:** O infarto agudo do miocárdio (IAM) continua a ser a principal causa de morte cardiovascular em todo o mundo e uma das principais causas de insuficiência cardíaca congestiva. Estudos recentes sugeriram que as terapias baseadas em células com células-tronco da medula óssea (BMSC) e membrana amniótica humana (hAM) recuperariam a função ventricular após o IM; no entanto, os mecanismos subjacentes a esses efeitos ainda são controversos.

**Objetivo:** Comparar os efeitos de BMSC e hAM em um modelo de rato de insuficiência cardíaca.

**Métodos:** IAM induzido por oclusão coronariana cirúrgica. Animais com fração de ejeção (FE) <50% foram incluídos e randomizados em três grupos: controle, BMSC e hAM. As BMSC e a HAM foram implantados na parede ventricular anterior sete dias após o IAM, sendo realizada nova análise ecocardiográfica, histológica e imunoistoquímica no 30º dia, seguida de eutanásia.

**Resultados:** Após 30 dias melhorias significativas na FE e nos volumes sistólico e diastólico final do ventrículo esquerdo em ambos os grupos BMSC e hAM, sem benefícios significativos no grupo de controle. Novos vasos sanguíneos, células desmina positivas e expressão de conexina-43 também foram elevados em ambos os grupos BMSC e hAM.

**Conclusão:** Os resultados sugerem uma recuperação da função cardíaca global com o uso terapêutico tanto do BMSC quanto do hAM, associado à angiogênese e regeneração dos cardiomiócitos após 30 dias.

**Palavras-Chave:** Infarto do miocárdio; Regeneração tecidual; Células-tronco; Membrana Amniótica Humana.

## ABSTRACT

**Background:** Myocardial infarction (MI) remains as the leading cause of cardiovascular death worldwide, and a major cause of heart failure. Recent studies have suggested that cell-based therapies with bone marrow stem cells (BMSC) and human amniotic membrane (hAM) would recover the ventricular function after MI; however, the mechanisms underlying these effects are still controversial.

**Methods:** Herein, we aimed to compare the effects of BMSC and hAM in a rat model of heart failure. MI was induced through coronary occlusion, and animals with ejection fraction (EF) < 50% were included and randomized into three groups: control, BMSC and hAM. The BMSC and hAM were implanted on the anterior ventricular wall seven days after MI, and a new echocardiographic analysis was performed on the 30th day, followed by euthanasia.

**Results:** The echocardiographic results after 30 days showed significant improvements on EF and left-ventricular end-systolic and end-diastolic volumes in both BMSC and hAM groups, without significant benefits in the control group. New blood vessels, desmine positive cells and connexin-43 expression were also elevated in both BMSC and hAM groups.

**Conclusion:** These results suggest a recovery of global cardiac function with the therapeutic use of both BMSC and hAM, associated with angiogenesis and cardiomyocyte regeneration after 30 days.

**Keywords:** Myocardial Infarction; Tissue Regeneration; Stem Cells; Human Amniotic Membrane.

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 01:</b> <i>Graphical Abstract</i> .....	9
<b>Figura 02:</b> <i>Flow Chart – Study Selection</i> .....	22
<b>Figura 03:</b> <i>Echocardiographic results of the analyzed groups</i> .....	52
<b>Figura 04:</b> <i>Collagen content analysis and infarct area after 30 days</i> .....	55
<b>Figura 05:</b> <i>Representative areas of Connexin, Desmine and Factor VIII after 30 days</i>	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Randomização dos grupos.....	37
<b>Tabela 2:</b> <i>Intragroup analysis of pre- and post-implantation of hAM and BMSC. 7<sup>th</sup> day</i> .....	50.
<b>Tabela 3:</b> <i>Comparison of groups two by two regarding ejection fraction 30 days after coronary occlusion</i> .....	51
<b>Tabela 4:</b> <i>Intergroup analysis of infarct area after 30 days after infarct induction</i> .....	53
<b>Tabela 5:</b> <i>Two by two collagen comparison of infarct area after 30 days after infarct induction</i> .....	54
<b>Tabela 6:</b> <i>: Intergroup analysis of the evaluation of Connexin-43, Desmine and Factor VIII in the infarct area 30 days after infarct induction</i> .....	57
<b>Tabela 7:</b> <i>Two by two evaluation of Connexin-43, Desmine and Factor VIII in the infarct area 30 days after infarct induction</i> .....	57



**LISTA DE ABREVIATURAS**

AdSCs.	Células tronco adiposas autólogas
AMI	Acute myocardial infarction
ANG	Angiogenin
BMSC	Bone marrow mononuclear stem cells.
CRM	Cirurgia de revascularização miocárdica
CT	Computed tomography
CTM	Células tronco mesenquimais
DCV	Doenças cardiovasculares
EGF	Epidermal growth factor.
EF	Ejection fraction.
EPCs	Células progenitoras endoteliais
hAM	Human amniotic membrane.
H&E	Hematoxylin and eosin
HF	Heart failure
HSCs	Células-tronco hematopoiéticas
IAM	Infarto agudo do miocárdio.
ICP	Angioplastia percutânea transluminal
IL-6	Interleukin 6
LV	Left ventricle
LVADs.	Left ventricular assistance device
LVESV	Left ventricular end-systolic volume.
LVEDV	Left ventricular end-diastolic volume.
MA	Membrana amniótica.
MAF	Membrana amniótica fresca.

MAPCs	Células progenitoras adultas multipotentes
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein
MI	Myocardial Infarction.
MRI	Magnetic resonance imaging
MSC	Mesenchymal Stem Cell
PBS	Solução tamponada com fosfato
SkMB	Mioblastos esqueléticos
TX	Transplante

## **MATERIAL SUPLEMENTAR**

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

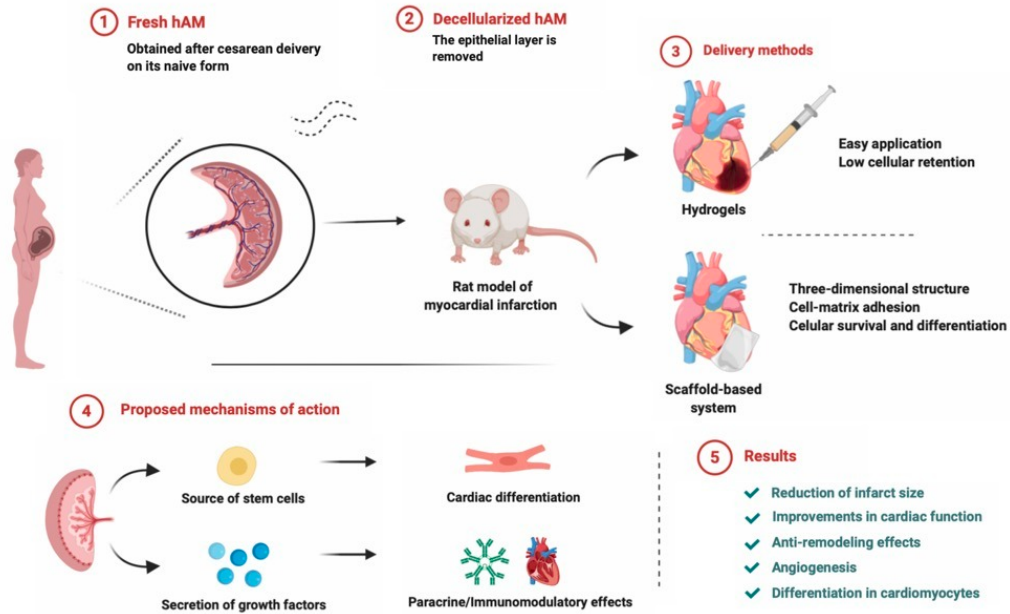
Anexo 2 – Artigo publicado na revista *Life* (Qualis A2)

Anexo 3 – Revisão sistemática publica na revista *American Journal of Cardiovascular Disease* (Qualis A3)

Anexo 4 – Editorial publicado no *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*

## GRAPHICAL ABSTRACT

# Human Amniotic membrane in myocardial infarction



## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1 Contextualizando Insuficiência Cardíaca E Terapia Celular .....	16
2.2 Mioblastos esqueléticos – os pioneiros da terapia celular .....	18
2.3 Células Tronco Hematopoiéticas E Mesenquimais .....	20
2.4 Células Tronco Cardio-Derivadas .....	24
2.5 Estudos clínicos.....	25
2.7 Membrana Amniótica Como Terapia Celular Alternativa .....	34
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>39</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
<b>5. MÉTODO</b> .....	<b>40</b>
5.1 Amostra .....	40
5.2 Anestesia.....	40
5.3 Técnica cirúrgica .....	40
5.3.1 Obtenção de via aérea e ventilação .....	40
5.3.2 Descrição do Infarto do Miocárdio .....	41
5.4 Analgesia Pós-operatória.....	42
5.5 Avaliação Ecocardiográfica.....	42
<b>6. METODOLOGIA EMPREGADA:</b> .....	<b>43</b>
6.1 Casuística e preparação da membrana amniótica .....	43
6.2. Preparação da matriz amniótica humana descellularizada (MAHD).....	44
6.3 Punção medular .....	45
6.3.1 Obtenção do sangue da medula óssea .....	45
6.3.2 Isolamento das células mononucleares .....	45
6.3.3 Estudo Anatomopatológico.....	46
6.3.4 Avaliação do depósito de colágeno.....	46
6.3.5. Análise Imuno-histoquímica .....	47
6.3.6 Análise Estatística.....	47
<b>7. DELINEAMENTO DO PROJETO</b> .....	<b>48</b>
<b>8. RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>75</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) aparecem como o principal problema de saúde pública no mundo. Sendo o infarto agudo do miocárdio (IAM) a principal causa isolada de morte entre as doenças crônicas não transmissíveis, representando uma das principais causas de morbi-mortalidade no mundo todo. (1)

Após o IAM ocorrem alterações da arquitetura ventricular, com estimulação de neutrófilos circulantes que produzem citocinas as quais regulam a resposta inflamatória no tecido isquêmico. A atenuação da resposta inflamatória tem sido igualmente buscada como mecanismo para reduzir a extensão do IAM e melhorar o remodelamento ventricular (2)

Resultados de estudos clínicos recentes indicaram a possibilidade de melhora da função global do ventrículo esquerdo por meio de transplante de células como alternativa para o tratamento do infarto do miocárdio. As opções terapêuticas atuais propostas, tanto clínicas como cirúrgicas, têm como principal objetivo tratar apenas as consequências do infarto do miocárdio e não as causas básicas da doença, que é a perda da célula contrátil, os cardiomiócitos. A ação das células tronco tem sido favorável funcionalmente em modelos de cardiomiopatia isquêmica com relação a formação de novos cardiomiócitos e vasos sanguíneos, entretanto falha na reversão do remodelamento ventricular. (3)

Os avanços terapêuticos disponíveis para o tratamento do IAM ainda são limitados e paliativos, evidenciando assim a necessidade do desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas (4)

Por outro lado, a necessidade de novos tratamentos com a finalidade de melhorar a qualidade de vida do paciente portador de insuficiência cardíaca se torna necessária. Atualmente a engenharia de tecidos vem utilizando biomateriais capazes de fornecer um

arcabouço com suporte estrutural à fixação e crescimento das células, criando um microambiente propício para a substituição ou reparação dos tecidos (5, 6)

Diversos tipos de células têm sido utilizados, isoladas ou em conjunto com diferentes materiais para reparo cardíaco e regeneração do miocárdio. Alguns estudos sugeriram a capacidade de neoangiogênese e outros de formação de novos cardiomiócitos no local onde as células foram transplantadas. Esses resultados estão diretamente relacionados ao modelo de lesão miocárdica realizado, ou seja, da lesão miocárdica de base. (7)

A membrana amniótica (MA) descelularizada é um arcabouço biodegradável que pode ser facilmente obtida, processada e transportada com propriedades que permite seu uso como biomaterial. Diversos estudos demonstraram que a MA promove a reparação tecidual em aplicações regenerativas, como cicatrização de queimaduras na pele, úlceras de decúbito e em especial na oftalmologia no tratamento de afecções da superfície ocular (8, 9)

Em modelos de infarto do miocárdio a MA pode servir como matriz que fornece suporte tridimensional ao ventrículo, sustentando a sobrevivência celular e promovendo o efeito anti-remodelamento, entretanto não apresenta melhora da fração de ejeção do ventrículo esquerdo pós implante. Outro mecanismo bastante interessante é que a MA não desencadeia uma resposta antigênica devido à baixa imunogenicidade e pode proporcionar um microambiente importante na sinalização da via de comunicação epitelial e estromal induzindo a regeneração de tecido nativo (10)

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Contextualizando Insuficiência Cardíaca E Terapia Celular**

As doenças cardiovasculares (DCV) se tornaram o problema de saúde mais importante em todo o mundo, ultrapassando a infecção como a principal causa mortalidade (11). Embora tenha havido uma redução na mortalidade em várias formas de DCV, incluindo infarto agudo do miocárdio (MI), o tratamento da insuficiência cardíaca (IC) ainda enfrenta desafios a despeito de sua evolução (12). O aumento da prevalência de IC é causado por vários fatores, incluindo a melhora da sobrevida de pacientes com síndromes coronarianas agudas e redução significativa de mortalidade devido a evolução terapêutica (11, 13, 14). Porém, o fator que tem maior impacto na incidência e prevalência da IC é o fato de ser uma doença associada envelhecimento. O número de pessoas com mais de 65 anos no mundo dobrará nos próximos 25 anos e estima-se que quase 15% dessa população desenvolverá IC (11). Tais números deixam claro que a IC serve como um importante alvo para pesquisas médicas e o desenvolvimento de terapias melhoradas.

O desenvolvimento da IC envolve uma série de condições subjacentes potenciais e um contínuo de mudanças fisiopatológicas ao longo de vários meses a anos. No entanto, a maioria das mudanças ocorre ao longo de uma via prejudicial comum. A lesão do miocárdio resulta em morte de cardiomiócitos, substituição do miocárdio infartado por tecido fibroso, expansão da cicatriz, incapacidade do miocárdio remanescente para compensar a falha da região lesada e ativação de uma série de mecanismos compensatórios como a via Renina-Angiotensina-Aldosterona (12-14). Esses fatores eventualmente levam ao aumento do estresse da parede com alterações secundárias no tamanho do miócito, metabolismo e expressão gênica, bem como



dilatação ventricular e, por fim, redução da função sistólica. Coletivamente, esse processo é conhecido como remodelação miocárdica e é a marca fenotípica da IC (12, 15). Uma vez que a remodelação miocárdica grave ocorreu e um estágio avançado de IC se desenvolveu, as opções de tratamento atuais são mais escassas. A principal terapia definitiva é a substituição cardíaca ou transplante (Tx), uma opção restrita a menos de 3.000 receptores em todo o mundo anualmente devido à escassez de órgãos de doadores e ao risco perioperatório relacionado (16). Transplante cardíaco e dispositivos mecânicos de assistência ventricular (LVADs) podem fornecer melhora dramática na perfusão de órgãos, redução no estresse da parede, melhoria na capacidade funcional e melhor qualidade de vida, mas não são uma opção para a grande maioria das pessoas com IC (ou seja, pacientes com mais de 65 anos) (17-19) LVADs como uma “terapia de destino” para pacientes que não são candidatos a transplante são uma opção em evolução; no entanto, eles não causam uma recuperação miocárdica suficiente para permitir o explante do dispositivo ou evitar o Tx, exceto em raros pacientes (20, 21). Assim, um objetivo plausível continua sendo o reparo do miocárdio lesado.

A ideia de intervir logo após a lesão cardíaca aguda para substituir as células lesadas e prevenir a cascata prejudicial que leva à IC foi o ímpeto inicial para o transplante de células. No entanto, logo ficou claro que a substituição de células também poderia trazer benefícios significativos para pacientes com IC crônica. Com a ideia de que a medula óssea continha células "tronco" ou progenitoras que podiam diferenciar várias linhagens, incluindo músculos, o campo se expandiu rapidamente. Nos anos 2000 dados de mais de 20 estudos clínicos iniciais ou intermediários estavam sendo discutidos em conferências científicas ou publicados na literatura revisada por pares. Assim, a regeneração potencial de tecido viável abriu novas perspectivas, pelo menos em teoria, para o tratamento de doenças isquêmicas do coração e insuficiência cardíaca crônica.

Uma terapia baseada em células com sucesso clínico terá que fornecer revascularização funcional, remodelação da matriz e regeneração dos elementos contráteis sem causar instabilidade elétrica ou mecânica. Se bem-sucedida, a terapia celular pode se tornar uma abordagem do século 21 para o tratamento da IC, oferecendo potencial real para um reparo significativo da lesão cardíaca subjacente e, portanto, para a recuperação.

Vários agentes têm sido estudados para esse fim: cardiomiócitos fetais, mioblastos esqueléticos, células-tronco embrionárias e adultas (CT), polímeros sintéticos, géis de colágeno humano e não humano e tecidos descelularizados. Essas terapias visam fornecer uma integração célula-matriz que forneça uma melhoria da função cardíaca global por meio da diferenciação em cardiomiócitos, parácrina e ações imunomoduladoras, ou fornecendo uma estrutura tridimensional que permite a adesão, sobrevivência e proliferação celular.

## 2.2 Mioblastos esqueléticos – os pioneiros da terapia celular

Os mioblastos são derivados de “células-satélite” musculares, descritas pela primeira vez em 1961 como células que regeneram o músculo esquelético danificado (22). Os mioblastos esqueléticos (SkMB) se expandem e formam neofibras após a lesão muscular. Assim, não é surpreendente que eles tenham sido os primeiros candidatos à regeneração cardíaca. Em 1994, o grupo de Magovern relatou o primeiro transplante experimental bem-sucedido de mioblastos esqueléticos em coração ferido (23). Entretanto, não ficou claro como esses mioblastos esqueléticos enxertados com sucesso melhorariam a função. Sugeriu-se que tais células musculares poderiam melhorar a contratilidade do coração previamente marcado, sem estritamente transdiferenciação em cardiomiócitos. Além disso, o SkMB pareceu produzir duas populações de células no coração lesado - células do tipo músculo esquelético transplantadas positivas para

miogenina no centro da cicatriz e uma segunda população de células do tipo músculo cardíaco mais primitivas negativas para miogenina "recrutadas" ao redor da cicatriz periférica (24).

Os mioblastos esqueléticos transplantados pareceram se adaptar ao miocárdio circundante formando miofibras de contração lenta que foram eletricamente isoladas dos cardiomiócitos do hospedeiro e, ainda assim, melhoraram o desempenho cardíaco (25). Esses resultados, mostrando uma melhora na função cardíaca sem integração completa das células transplantadas no miocárdio do hospedeiro e com recrutamento de células endógenas, levantaram questões sobre os mecanismos potenciais que fundamentam o benefício funcional. Vários mecanismos foram sugeridos, variando de mudanças passivas no estresse da parede ou geometria cardíaca até a contração ativa mecanicamente induzida das células injetadas, mas o(s) mecanismo(s) exato(s) subjacente(s) ao efeito benéfico ainda estão em debate. É provável que os benefícios envolvam um efeito direto das células musculares transplantadas no desempenho e um efeito indireto "parácrino" ou trófico no recrutamento de células endógenas e na remodelação do coração insuficiente. Como os mecanismos subjacentes aos efeitos positivos do transplante de mioblastos ainda não são totalmente compreendidos, há algum debate se os mioblastos melhoram a contração ou apenas evitam a deterioração do coração lesado.

Embora os dados pré-clínicos e clínicos iniciais pareçam encorajadores, o transplante de mioblastos tem limitações potenciais. A primeira limitação está associada a qualquer célula autóloga que tenha que ser expandida em laboratório (ou seja, mioblastos, células-tronco mesenquimais, células progenitoras endoteliais) o uso requer tempo suficiente entre a lesão e a injeção para permitir a expansão celular *in vitro*. Em doadores normais e saudáveis e em muitos pacientes com insuficiência cardíaca, isso varia de vários dias a várias semanas, dependendo do tipo de célula.

A segunda limitação potencial para qualquer terapia celular cardíaca é a incapacidade das células transplantadas para se integrarem eletricamente com o miocárdio nativo. Os mioblastos são o tipo de célula mais bem estudado, mas não está claro se, e como, eles se integram eletricamente ao miocárdio circundante. Tampouco está totalmente claro qual impacto a integração pode ter na função ou no ritmo cardíaco. Menasche e colegas relatam nenhuma integração elétrica de mioblastos pré-clinicamente (26). Da mesma forma, Suzuki e colegas relatam que, na ausência de hiperexpressão de conexina-43, os mioblastos não se acoplam bem com o coração circundante (27). No entanto, como mencionado anteriormente, as células parecem se contrair em sincronia com o tecido circundante e contribuem para o desempenho cardíaco. Dados clínicos iniciais sugerem que o transplante de mioblastos pode estar associado a um período de instabilidade elétrica nas primeiras semanas após o transplante de células.

Em resumo, embora o transplante de mioblastos seja uma técnica bem definida para regeneração miocárdica, questões importantes permanecem sobre sua segurança e eficácia em longo prazo. Se o transplante de células deve ser visto como uma solução de longo prazo para a lesão miocárdica, as células devem ser capazes de promover a revascularização sustentada e mediar um efeito funcional positivo por anos no coração sem provocar sequelas negativas.

## 2.3 Células Tronco Hematopoiéticas E Mesenquimais

### 2.3.1 *Células tronco hematopoiéticas*

Para avançar em direção às células progenitoras que têm potencial para se tornarem cardiomiócitos, mas superar os obstáculos éticos e imunológicos das células-tronco embrionárias, os pesquisadores começaram a examinar outras fontes autólogas de células-tronco, como medula óssea e sangue periférico, que contêm várias populações de

células que recentemente se mostraram capazes de se diferenciar em outras células além do sangue. Eles incluem a população mononuclear não fracionada, células-tronco hematopoiéticas (HSCs), células-tronco mesenquimais (MSCs), células progenitoras endoteliais (EPCs) e subconjuntos de cada uma delas, incluindo progenitores angiogênicos CD34 , células progenitoras adultas multipotentes (MAPCs) e células de crescimento excessivo de sangue CD14 . Populações de células progenitoras semelhantes também foram isoladas do sangue do cordão umbilical.

Historicamente, as HSCs são consideradas células que se diferenciam apenas em várias células do sangue e do sistema imunológico (ou seja, glóbulos vermelhos e brancos). Essas células são normalmente identificadas por marcação com CD34 e / ou AC133 para células humanas e, em camundongos, são examinadas para serem negativas para um coquetel de marcadores de linhagem de células hematopoiéticas maduras (lin-negativo) e às vezes positivo para antígeno-1 de células-tronco (Sca-1) e c-kit (CD117). Nos últimos anos, foi demonstrado que as HSCs têm a capacidade, nas condições certas, de se diferenciar em vários tipos de células, incluindo cardiomiócitos (28). Embora os HSCs possam se tornar cardiomiócitos sob condições laboratoriais estritas, ainda não há evidências de que eles possam se transdiferenciar em cardiomiócitos quando transplantados para o miocárdio infartado (29, 30). Talvez por causa dessa falta de diferenciação no infarto, estudos recentes sugerem que as HSCs podem não ter o potencial de alguns outros tipos de células para melhorar a função do VE após o transplante para o miocárdio infartado (30).

### 2.3.2 Células tronco mesenquimais

As CTMs são células progenitoras multipotentes raras, também conhecidas como células do estroma da medula óssea. No passado, as CTMs mostraram se diferenciar em vários tipos de células mesenquimais, incluindo adipócitos, gordura, osso, cartilagem

e músculo esquelético (31, 32) tanto *in vitro* quanto em miocárdio de rato infartado (33). Há também evidências de que, em injeção no miocárdio, essas CTMs podem se diferenciar em cardiomiócitos (7, 34). Estudos atuais sugerem que isso pode acontecer com facilidade quando as CTMs estão em contato com cardiomiócitos nativos e não no interior do infarto (35). Esses dados implicam que o curso de tempo ideal da terapia com CTMs pode ser no início do estado da doença, quando cardiomiócitos sobreviventes ainda estão presentes no infarto.

Apesar de sua incapacidade de formar cardiomiócitos em um grau significativo, foi demonstrado que as CTMs transplantadas enxertam em altos números no coração infartado e levam a uma série de benefícios funcionais, incluindo aumento da neovascularização e melhora da contratilidade regional e diastólica global função (36-38). Vários estudos sugerem que as CTMs podem servir de lar para os locais de lesão após a injeção na vascularização coronária ou mesmo periférica (35, 39). No entanto, também foi relatado que a administração intracoronária de CTMs pode causar microinfartos e promover danos ao miocárdio de outra forma saudável, o que levou a alguma reticência sobre a distribuição vascular dessas células (40). Mais recentemente, as CTMs têm sido apresentadas como células imunologicamente privilegiadas, capazes de administração alogênica *in vivo* com poucas ou nenhuma consequência negativa (41). Este é possivelmente o aspecto mais tentador dessas células para o reparo cardíaco.

### *2.3.3 Células progenitoras endoteliais*

Células progenitoras endoteliais (EPCs) são células derivadas da medula óssea que são mobilizadas para o sangue periférico e acredita-se que participem da neoangiogênese (42). Pesquisas recentes mostraram que o número de EPCs presentes na circulação vascular é aumentado em pacientes após infarto agudo do miocárdio (43). Acredita-se que as EPCs para responder a danos isquêmicos no coração (e outros tecidos)

migram para áreas danificadas para induzir a formação de neovasculatura. Em apoio a isso, foi recentemente demonstrado que quando as EPCs foram injetadas na cavidade ventricular esquerda de ratos com lesão isquêmica do miocárdio, foi observado um aumento maior de duas vezes no acúmulo de EPCs infundidas em comparação com animais submetidos à cirurgia simulada (44). Além disso, ratos submetidos à injeção intravenosa de EPCs após lesão isquêmica do miocárdio mostraram melhorias nas dimensões ventriculares, encurtamento fracionário e movimento regional da parede quando comparados com animais de controle injetados com meio de cultura (34, 45). Embora o mecanismo de benefício das EPCs não tenha sido claramente elucidado, é provável que as melhorias observadas neste estudo tenham sido, pelo menos em parte, secundárias à melhora da perfusão miocárdica e subsequente resgate do miocárdio em hibernação. Até o momento, não foi demonstrado que as EPCs participem da miogênese dentro do miocárdio lesado, mas várias funções parácrinas foram recentemente atribuídas às células (46).

#### 2.3.4 *Células de cordão umbilical*

Uma fonte relativamente nova de células-tronco ou progenitoras é o sangue do cordão umbilical, que contém a maioria, senão todos, os tipos de células derivadas da medula óssea discutidos acima. As células do sangue do cordão são facilmente obtidas, embora não em grandes volumes, têm o potencial de se desenvolver em várias linhagens, não colocam as questões éticas levantadas pelas células-tronco embrionárias e são menos imunogênicas do que suas contrapartes da medula óssea - o que significa uma percentagem maior de a população poderia receber células de doadores compatíveis. Além disso, se as células do cordão umbilical forem isoladas e armazenadas no nascimento, essas células podem fornecer uma fonte autóloga de células-tronco para tratar

danos miocárdicos posteriores. Estudos atuais em modelos animais mostram que células do cordão umbilical não fracionadas injetadas diretamente no infarto mostram o potencial para melhorar a fração de ejeção do VE, espessamento da parede anteroseptal e  $dP / dt$  (máx.), enquanto diminuem o tamanho do infarto (47). Além disso, a injeção intravenosa de células do sangue do cordão umbilical em camundongos após lesão cardíaca isquêmica induzida por ligadura mostrou densidade capilar aproximadamente 20% maior nas zonas de fronteira do infarto em comparação com animais não tratados (48). Dados recentes sugerem que o sangue do cordão humano que derivou de células CD34 pode ser capaz de prevenir a progressão da lesão em ratos, se administrado logo após o IM, e reverter parcialmente a disfunção sistólica e diastólica na insuficiência cardíaca. Infelizmente, nenhuma evidência ainda sugere que as células do cordão umbilical injetadas nas porções infartadas do miocárdio têm o potencial de se diferenciar em cardiomiócitos maduros. No geral, entretanto, parece que as células do cordão umbilical podem fornecer uma célula interessante de escolha para estudos adicionais no tratamento de lesão miocárdica.

#### 2.4 Células Tronco Cardio-Derivadas

Nos últimos anos, foram identificadas células-tronco cardíacas que podem ser consideradas como uma célula potencial para reparo cardíaco. Embora as evidências de reparo com essas células sejam limitadas, seu potencial de amadurecimento em cardiomiócitos as torna candidatas atraentes. Novamente, essas células foram isoladas principalmente do coração neonatal e em uma extensão muito limitada do miocárdio adulto (49-52). Seu uso pré-clínico é intrigante e sugere que o futuro do reparo cardíaco pode envolver a mobilização endógena ou o recrutamento dessas células-tronco - se eles podem ser encontrados em números razoáveis no miocárdio adulto.



As células-tronco derivadas do coração podem ser isoladas de corações de ratos neonatais usando o fator de transcrição do homeodomínio LIM, islet-1. É possível expandir essas células *in vitro* quando acopladas a uma camada alimentadora mesenquimal cardíaca. Além disso, quando essas células são co-cultivadas com cardiomiócitos neonatais, elas são capazes de se integrar eletricamente às células do miocárdio *in vitro*, formando junções comunicantes (50). Células-tronco derivadas do coração isoladas de corações adultos, incluindo aquelas de infarto agudo, falência e até mesmo corações de transplante não lesados foram identificados por sua expressão de c-kit, MRD1 e Sca-1 e por sua falta de expressão de marcadores de linhagem hematopoiética (53). Essas células mostram a capacidade de se diferenciar em miócitos, células de músculo liso e vias de células endoteliais, mas sua capacidade de formar células maduras desses tipos (ou cardiomiócitos) é desconhecida. As células-tronco derivadas do coração positivas para Sca-1 endógenas podem ser capazes de se diferenciar em cardiomiócitos funcionais, mas seu potencial de diferenciação dentro da cicatriz do infarto é, ainda, desconhecido (49, 54). Até o momento, os métodos para colheita, expansão e crescimento *in vitro* desses precursores ainda é limitado. Isso, combinado com seu potencial de diferenciação desconhecido, torna difícil seu uso clínico neste momento. No entanto, sua biologia é interessante e vale a pena observar desenvolvimentos futuros. As células progenitoras cardíacas expandidas a partir de biópsias endomiocárdicas e pré-diferenciadas *in vitro* podem se tornar candidatas muito fortes para o reparo cardíaco.

## 2.5 Estudos clínicos

Até o momento, a segurança e a viabilidade da terapia com células de mioblasto e medula óssea foram avaliadas em uma série de estudos clínicos com células administradas cirurgicamente como um adjunto à CRM ou percutaneamente como um

adjunto à reperfusão ou como um tratamento autônomo, em insuficiência cardíaca aguda ou crônica.

#### 2.5.1 Insuficiência Cardíaca Aguda

- Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)

Ensaio de segurança e viabilidade direcionado a pacientes com infarto agudo do miocárdio reperfundido com sucesso por implantação de stent. Utilizada uma infusão intracoronária de EPCs (aproximadamente  $245 \pm 72 \times 10^6$  EPCs cultivadas, separadas por Ficoll) e células da medula óssea (aproximadamente  $10 \pm 7 \times 10^6$  células CTMs separadas por Ficoll) 4 dias após o infarto. Demonstrou-se uma tendência de melhora no movimento regional da parede na zona infartada e redução do volume sistólico final do VE imediatamente após a injeção, bem como durante o seguimento de 4 meses. A eficácia foi semelhante entre os pacientes que receberam CTMs e os pacientes que receberam EPCs derivados do sangue (55).

- Bone marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration (BOOST)

Estudo teve como alvo pacientes que tiveram IAM agudo e stent implantado usando angioplastia percutânea transluminal (ICP). Os pacientes selecionados receberam transfusão de uma única dose de células-tronco autólogas da medula óssea por via intracoronária. O número de células usadas foi de aproximadamente  $2,5 \times 10^9$  de células CTMs não fracionadas. Os resultados mostraram uma leve melhora na FEVE de 7%, que, entretanto, não foi mantida aos 18 meses (56, 57).

- Autologous Stem-cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction (ASTAMI)

Este estudo teve como alvo pacientes com infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento ST. Foram coletadas células autólogas da medula óssea, entregues por meio de injeções intracoronárias durante a ICP para implantação de stent. O número de células usadas foi de aproximadamente  $7 \times 10^7$  CTMs separadas por Ficoll. Neste ensaio, não houve melhora na FEVE 6 meses após a entrega das células injetadas (58).

- Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI)

Estudo randomizado e duplo-cego direcionado a pacientes que tiveram ICP após IM agudo. População dividida em dois grupos que receberam células da medula óssea versus infusão de placebo. O número total de células usadas foi estimado em  $2,4 \pm 10^8$ . O resultado inicial de 4 meses mostrou um aumento na FEVE no grupo de medula óssea em comparação com o grupo de placebo. No acompanhamento de 2 anos, os pacientes tratados com células neste estudo tiveram menos isquemia miocárdica e menos pacientes atingiram o desfecho combinado de morte, IM ou necessidade de revascularização. Embora os resultados não tenham sido estatisticamente significativos, houve uma tendência de melhora sustentada na FE e no volume sistólico final do VE (59-61).

- Myocardial REGENeration by intracoronary infusion of selected population of stem cells in acute myocardial infarction (REGENT)

REGENT foi um estudo multicêntrico randomizado direcionado a pacientes com infarto agudo em até 12 horas após os sintomas, para avaliar a regeneração miocárdica por infusão intracoronária de populações selecionadas de células-tronco de medula. Eles usaram CTM autólogas e as dividiram em três grupos: grupo CD34

selecionado (número médio de células  $1,90 \times 10^6$ ), grupo de células não selecionadas da medula óssea (número médio de células  $1,78 \times 10^8$ ) e grupo placebo. O tratamento com células-tronco CTM não levou a uma melhora significativa nos volumes da FEVE ou do VE. No entanto, houve uma tendência a favor da terapia celular em pacientes com a FEVE mais gravemente comprometida e períodos prolongados entre os sintomas e a revascularização (62).

- MYocardial STem cell Administration after acute myocardial infarction (MYSTAR)

A hipótese invocada é de que o *homing* das células-tronco injetadas, seria ideal 21 dias após o incidente do IM, mas não depois de 42 dias. Foram usadas células-tronco autólogas da medula óssea por meio de injeções intracoronárias e intramiocárdicas em dois momentos diferentes. Os pacientes foram divididos em quatro grupos: células-tronco CTMs intracoronárias precoces não selecionadas (entre 21 e 42 dias), células-tronco CTMs intracoronárias combinadas precocemente com injeção intramiocárdica, injeção intracoronária tardia (3 meses) e injeções combinadas tardias. O número médio de células injetadas no grupo inicial e no grupo tardio foi de  $1,56 \pm 0,40 \pm 10^9$  e  $1,55 \pm 0,44 \pm 10^9$ , respectivamente. Os resultados demonstraram que a entrega precoce e tardia de células induziu melhorias leves, mas não clinicamente relevantes. Houve uma redução no tamanho do infarto e uma melhora na FEVE em ambos os 3 meses e 9 a 12 meses após a isquemia miocárdica aguda. As principais melhorias nos grupos inicial e tardio foram estimados em 3,5% e 3,9%, respectivamente, melhora na FEVE, bem como 3,5% e 3,4%, respectivamente, no tamanho do infarto (63).

- SWiss Multicenter Intracoronary Stem cells Study in Acute Myocardial Infarction (SWISS-AMI)

Neste estudo, as células-tronco mononucleares medulares foram injetadas por via intracoronária em pacientes que tiveram IAMCSST, receberam uma intervenção de ICP com sucesso em 24 horas e tiveram FE inferior a 45%. Foi utilizada uma injeção intracoronária de  $153 \times 10^6$  e  $139,5 \times 10^6$  CTMs estimadas no grupo inicial (5-7 dias) e no grupo tardio (3-4 semanas), respectivamente. A infusão de células-tronco CTMs, seja em 5-7 dias ou 3-4 semanas após o IM agudo, não melhorou a função do VE em 4 meses (3).

- Use of Adult Autologous Stem Cells in Treating People 2 to 3 Weeks after having a Heart Attack (LateTIME)

Este estudo avaliou o uso de células-tronco mononucleares da medula óssea com infusão em 2 a 3 semanas após o IM agudo da parede anterior versus placebo em pacientes com FE inferior a 45% tratados com sucesso com ICP primária. Uma única infusão intracoronária de  $150 \times 10^6$  de células-tronco BMD autólogas foi injetada dentro de 12 horas da aspiração e preparação das células. Os resultados não mostraram melhora substancial na FEVE medida após 6 meses (64-67).

- CARDiosphere-Derived aUtologous Stem Cells to reverse ventricUlar dySfunction (CADUCEUS)

Estudo prospectivo randomizado direcionado a pacientes dentro de 2-4 semanas de IM agudo com uma FEVE de 25% -45%. As células foram obtidas do endocárdio do ventrículo direito por biópsia. Os pacientes receberam uma dose baixa ( $12,5 \times 10^6$ ) ou uma dose alta ( $25 \times 10^6$ ) de células versus um grupo de controle (que não recebeu células). As células foram introduzidas por via intracoronária com cateter de angioplastia por um período de 15 minutos. Houve uma diminuição significativa no tamanho da cicatriz e aumento no miocárdio viável em 6 e 12 meses no grupo de

tratamento em comparação com o grupo de controle, mas não houve diferença significativa entre os dois grupos em 6 meses em termos de melhora da FE (68, 69).

### 2.5.2 Insuficiência Cardíaca Crônica

- AdiPose-derived stEm and Regenerative Cells In the Treatment of Patients with non revascularizable ischemic myocardium (PRECISE)

PRECISE foi um ensaio clínico randomizado de células tronco adiposas autólogas (AdSCs) para pacientes sem opção de revascularização por cirurgia ou ICP. As células foram colhidas por lipoaspiração e a média do número total de células utilizadas foi de  $42 \pm 10^6$  no grupo de tratamento. Este ensaio, que teve um grupo AdSCs versus um grupo placebo, mostrou que a coleta e injeção transendocárdica de AdSCs são seguras e viáveis. Além disso, o tratamento pareceu resultar na estabilização da cicatriz (70). Não houve grande melhora na FEVE em 6 ou 12 meses no grupo tratado quando comparado com os controles. Houve, no entanto, uma melhora substancial na capacidade de exercício, bem como na carga isquêmica, medida por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT), encontrada aos 6 e 12 meses (71).

- Transplantation of progenitor cells and recovery of left ventricular function in patients with chronic ischemic heart disease (TOPCARE-CHD)

Este estudo teve como alvo pacientes com um infarto do miocárdio de mais de 3 meses que permaneceram estáveis com terapia médica desde o evento. Células-tronco autólogas de medula (número médio de  $214 \pm 98 \times 10^6$ ) foram injetadas pela via intracoronária. O estudo demonstrou que o tratamento foi associado a uma redução nos níveis séricos de peptídeo natriurético e melhora na sobrevida de pacientes com insuficiência cardíaca crônica pós-IM(72).

- Percutaneous stem cell injection delivery effects on neomyogenesis: Comparison of Allogeneic versus Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Delivered by Trans-Endocardial Injection in Patients with Ischemic Cardiomyopathy (POSEIDON)

Este estudo teve como alvo pacientes com cardiomiopatia isquêmica com FE inferior a 50%. Comparou-se células tronco autólogas (extraídas por aspiração de medula óssea) e alogênicas (extraídas por aspiração de medula óssea de doadores saudáveis). Os pesquisadores dividiram a população em três grupos de acordo com o número de células infundidas:  $20 \times 10^6$  para o primeiro grupo,  $100 \times 10^6$  para o segundo grupo e  $200 \times 10^6$  para o terceiro grupo. O tratamento foi associado a taxas mais baixas de efeitos adversos graves decorrentes do tratamento, incluindo reações imunológicas. A injeção de CTM afetou favoravelmente a qualidade de vida, a capacidade funcional e a remodelação ventricular do paciente (73).

- The acute and long-term effects of intracoronary Stem cell Transplantation in patients with chronic heARt failure (STAR-heart)

Este estudo incluiu um grande grupo de pacientes com insuficiência cardíaca isquêmica crônica em um intervalo de tempo de  $8,5 \pm 3,2$  anos entre a intervenção do infarto e a admissão ao atendimento clínico. O estudo avaliou células-tronco autólogas de medula óssea em pacientes com FEVE de 35% ou menos e história prévia de IM. Durante este estudo não cego, os pacientes que recusaram a terapia celular serviram como controles. As células-tronco da medula foram injetadas na artéria coronária relacionada ao infarto pela via intracoronária e o número estimado de células injetadas foi de  $6,6 \pm 3,3 \times 10^7$ . Aos 3 meses, o grupo tratado teve melhorias substanciais no índice cardíaco e calculo da FEVE com um aumento de quase 7%. Também houve uma queda na classe da

New York Heart Association e nos volumes sistólico final (15 mL) e diastólico final (10 mL). Essas melhorias persistiram em 12 e 60 meses após o tratamento, enquanto nenhuma mudança foi observada no grupo de controle. Além disso, a taxa de mortalidade do grupo tratado foi menor do que a do grupo controle (0,75% vs 3,68% ao ano). Este estudo forneceu a primeira evidência de longo prazo de que a terapia celular pode afetar a mortalidade em pacientes com insuficiência cardíaca (74).

- Stem Cell Infusion in Patients with Ischemic cardiomyopathy (SCIPIO)

SCIPIO foi o primeiro ensaio clínico de Fase I randomizado e aberto em humanos a avaliar células autólogas em pacientes com insuficiência cardíaca isquêmica (FEVE igual ou inferior a 40%) em uma média de 3,7 anos após IAM. As células foram coletadas do apêndice atrial direito durante a revascularização do miocárdio em 33 pacientes (20 tratados com terapia celular vs 13 indivíduos controle), com  $1 \times 10^6$  células injetadas por paciente. Os pacientes tratados com terapia celular receberam uma infusão intracoronária de células em uma média de 113 dias após a CRM. No grupo tratado, a ressonância magnética cardíaca mostrou um aumento na FEVE em 4 meses (de  $27,5\% \pm 1,6\%$  para  $35,1\% \pm 2,4\%$  [ $P \pm 0,004$ ,  $n \pm 8$ ]) e em 12 meses ( $41,2\% \pm 4,5\%$  [ $P \pm 0,013$ ,  $n \pm 5$ ]). O tamanho do infarto, medido como realce tardio do gadolínio por imagem de ressonância magnética de perfusão, diminuiu em  $\pm 9,8 \pm 3,5$  g após a infusão de células tronco em 12 meses em seis pacientes que completaram o acompanhamento de 1 ano. No grupo tratado, a massa infartada do VE diminuiu em  $-14,7 \pm 3,9$  g e a massa não infartada do VE aumentou em  $-31,5 \pm 11,0$  g em 12 meses de acompanhamento. O estudo concluiu que as melhorias na FEVE, diminuição da massa do VE infartado e aumento da massa do VE não infartado observados em 4 meses e persistentes por até 12 meses em um subgrupo de pacientes eram consistentes com regeneração cardíaca (75-79).



## 2.6 Terapia Celular: Histórias Pré-Clínicas De Sucesso Com Eficácia Clínica Incerta

Como demonstrado, estratégias clínicas potencialmente válidas destinadas a reparar o músculo cardíaco danificado e o tecido isquêmico e aumentar o potencial regenerativo do coração estão atualmente sendo testadas em ensaios clínicos. Apesar das expectativas originalmente elevadas alimentadas por empolgantes progressos científicos em modelos pré-clínicos e de longo prazo, ensaios clínicos randomizados que mostraram perfis de segurança tranquilizadores para entrega intracoronária de células de terapia regenerativa para doenças cardiovasculares foram inconsistentes e mostraram eficácia modesta até agora (56, 65, 69, 70, 73, 75, 78, 80, 81). Várias limitações da maioria dos ensaios clínicos anteriores de terapias baseadas em células foram levantadas e devem ser abordadas antes que possamos compreender totalmente seu verdadeiro potencial terapêutico. Dentre as principais limitações podemos citar:

1. Baixa adesão das células tronco medulares e endoteliais (79, 82-84).
2. Baixa sobrevivência das células transplantadas(85).
3. Falha das células tronco adultas em diferenciar eficazmente em cardiomiócitos maduros e funcionais(86).
4. Recrutamento inadequado das células circulantes ou residentes(79, 87).
5. Potencial arritmogênico devido ao acoplamento eletromecânico anômalo(88).
6. População alvo incorreta (89).
7. Existência de terapêutica medicamentosa mais eficaz (90).

Frente a tais limitações das células tronco aventa-se que a MA pode servir como matriz alternativa que fornece suporte tridimensional ao ventrículo, sustentando a sobrevivência celular e promovendo o efeito anti-remodelamento.

## 2.7 Membrana Amniótica Como Terapia Celular Alternativa

### 2.7.1 Introdução

Como alternativa, a engenharia de tecidos por meio da MA passou a ser amplamente utilizada na medicina regenerativa. A principal hipótese para seu uso é que poderia servir como um possível arcabouço para a proliferação e diferenciação de células-tronco, com potencial agregado. (91-98). Recentemente, a aplicação de MA no coração infartado surgiu como um possível tratamento para o IAM, com base não apenas na teoria de transdiferenciação, mas também em suas propriedades antiinflamatórias, bacteriostáticas e antimicrobianas (99).

### 2.7.2 Métodos De Intervenção

Análises in vivo e in vitro foram usadas para avaliar a eficácia de hAM em corações infartados. Duas técnicas principais foram escolhidas para análises in vivo: injeção de hidrogéis de hAM na área infartada ou transplante de um patch de hAM na área de MI. A escolha por qualquer uma das técnicas deveu-se principalmente à experiência dos autores. Os possíveis benefícios dos hidrogéis ou de um adesivo não foram avaliados [14-22]. O benefício teórico do uso de implantes de patch sobre hidrogéis, hipoteticamente mencionado por Khorramirouz et al., é baseado no fato de que os patches poderiam servir como uma estrutura tridimensional capaz de transportar células-tronco com melhores propriedades de entrega e retenção, adicionando biocompatibilidade, semelhança da estrutura, resistência mecânica, grande relação área de superfície para volume e alta porosidade na ausência de reações imunológicas (100-108)

### 2.7.3 Função Ventricular

A avaliação da função do VE foi geralmente realizada com ecocardiografia, medindo a fração de ejeção (FE) e o encurtamento fracionário. Embora os resultados de Gorjipour et al. não mostraram melhora na função cardíaca avaliada por parâmetros ecocardiográficos em um modelo de IM crônico, Henry et al., usando uma abordagem semelhante, demonstraram uma melhora de quase 10% na fração de ejeção quando comparada à aguda fase do infarto (106, 109). Roy et al., usando uma curva de pressão-volume baseada em cateter para avaliar a função do VE, sugeriram que o uso de um patch hAM na área isquêmica pode prevenir a remodelação ventricular patológica, melhorando assim a função cardíaca global (103). Em outro artigo abrangente de Roy et al., a função do VE foi avaliada por meio de ressonância magnética e ecocardiografia Speckle Tracking, mostrando uma melhora significativa na fração de ejeção e taxa de deformação quando comparada aos controles, 4 semanas após o IM (102). Em 2009, Fujimoto et al. analisaram a alteração da área fracionada como medida da função do VE e evidenciaram melhora 6 semanas após a ligadura coronária em ratos quando comparados aos controles (110).

### 2.7.4 Tamanho Do Infarto

Fang et al. usando tricrômico de Masson e um analisador de imagem digital, descreveram uma redução da área infartada quatro semanas após a injeção de hAM. Três ratos em cada grupo foram usados para as análises e a área infartada foi medida como uma porcentagem da área lesada dividida por toda a área ventricular e calculada a média por cortes. A área infartada foi significativamente reduzida no grupo da membrana amniótica quando comparado aos controles (32% vs. 39,6%,  $P < 0,05$ ) (107). Da mesma

forma, Henry et al. observaram que a área de MI foi significativamente reduzida pelo uso terapêutico de hAM cinco semanas após o infarto do miocárdio (106). Por outro lado, usando metodologia semelhante, Roy et al. não encontraram diferença estatisticamente significativa na área de IM quando comparados aos controles após quatro semanas (103). Em 2015, Danieli et al. utilizando métodos imunohistoquímicos, observaram que a injeção intramiocárdica de hAM concentrada foi capaz de limitar a área do IM em 28,5% ( $P = 0,01$ ), quando comparados aos controles, 48 horas após a isquemia em modelo de reperfusão (108).

#### 2.7.5 Efeitos Parácrinos

Níveis mais elevados de angiogenina, fatores de crescimento epidérmico, interleucina 6, interleucina 8 e proteínas de quimioatração de monócitos foram encontrados em camundongos e ratos hipóxicos tratados com hAM, o que pode explicar as melhorias funcionais relacionadas aos efeitos Parácrinos por trás do uso de hAM (101, 102). Prevenção da morte celular, aumento da viabilidade celular, regulação positiva de genes antiapoptóticos, regulação negativa de fatores pró-apoptóticos e inflamação reduzida também foram associados ao uso de hAM após infarto do miocárdio. Danielli et al. em um estudo de modelo de isquemia-reperfusão, sugeriram que a hAMC pode reduzir a fragmentação nuclear e a ativação da caspase, protegendo assim a lesão celular semelhante à do coração (105, 108).

#### 2.7.6 Angiogenese

Análises *in vitro* e *in vivo* mostraram um aumento no efeito pró-angiogênico de hAM como resultado das seguintes proteínas: fator de crescimento endotelial vascular, proteína quimiotática de granulócitos, proteína ativadora de neutrófilos, interleucina 8, trombopoietina, fator de crescimento derivado do plaquetário, fibroblasto básico e fatores de crescimento semelhantes à insulina (101, 102, 104, 108). Um análise com coloração

tricroômico de Masson e imunohistoquímica também demonstraram um aumento no número e diâmetro dos vasos na área infartada em animais tratados com hAM (102). Khorramirouz et al. usando um modelo de intervenção baseado em patch, confirmaram a capacidade de angiogênese por meio de um aumento do número de células CD34 + no grupo com implante de patch quando comparado ao grupo controle (105). Resultados controversos foram encontrados por Tsuji et al. sugerindo que a neovascularização pode não ter um papel na melhora da função cardíaca, principalmente devido ao fato de que, em seu estudo, o hAM não afetou a densidade capilar (100).

#### 2.7.7 Diferenciação Celular

Tsuji et al. sugeriram que o hAM se diferencia em cardiomiócitos *in vitro* e *in vivo*, sem nenhum agente epigenético ou transferência gênica, e com maior eficiência quando comparada às células-tronco (100). Análises de imunohistoquímica usadas por Fang et al. demonstraram diferenciação de cardiomiócitos de hAM. Apesar de uma diferenciação positiva, diversos autores afirmam que o pequeno número de cardiomiócitos presentes na amostra pode ser insuficiente para explicar o processo de recuperação do IM (107). Células desmina-positivas, abundantemente presentes na área implantada e na zona de infarto, foram utilizadas por Khorra-mirouz et al. para sugerir o processo regenerativo e de diferenciação de hAMC (105, 111). Em um modelo crônico de MI, Gorjipour et al. mostraram alguma diferenciação em células que expressam marcadores cardiomióticos, mas não adquiriram a função contrátil necessária para a atividade mecânica do tecido miocárdico (109).

Em conclusão, a hAM parece ser uma terapia alternativa potencial e econômica para o IAM, sendo uma possível fonte de células-tronco com um adesivo tridimensional e propriedades antiinflamatórias. Melhorias na função VE, remodelamento VE e

diferenciação de cardiomiócitos têm sido evidenciadas, embora estudos mais homogêneos e maiores sejam necessários.

### **3. JUSTIFICATIVA**

O transplante de células-tronco mononucleares da medula óssea isoladamente sugere um benefício funcional pós infarto do miocárdio, entretanto falha na tentativa de realizar o efeito anti-remodelamento ventricular. Por outro lado, a MA apresentou a reversão da dilatação ventricular em um modelo de infarto do miocárdio, mas com falha na melhora funcional.

Desta forma, comparamos ambos os tratamentos quanto a capacidade de regeneração tecidual e melhora funcional com reversão da dilatação ventricular em um modelo de infarto do miocárdio com disfunção ventricular em ratos.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Geral**

Realizar a análise funcional e histológica do efeito do implante da membrana amniótica isolada e transplante de células-tronco mononucleares da medula óssea em um modelo de infarto do miocárdio de ratos.

#### **4.2 Específicos**

- Comparar a FEVE(%), VDFVE(ml), VSFVE(ml), entre os grupos estudados no período pré e pós implante, com trinta dias de seguimento.
- Realizar a análise histológica e imuno-histoquímica da deposição de colágeno, tamanho do infarto e remodelamento cardíaco nos grupos estudados, trinta dias após o implante.
- Identificar a presença de novos cardiomiócitos, novas fibras musculares e neoangiogênese nos grupos estudados.

- Identificar a presença ou não de GAP *junctions* nos grupos estudados.

## 5. MÉTODO

Os experimentos foram realizados seguindo as normas e princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 5.1 Amostra

Para o estudo foram utilizados ratos, Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), adultos machos, com peso entre 250 e 300 gramas, em um número de 50 animais. Os ratos não tiveram restrição hídrica e de ração. A escolha do modelo foi baseada na facilidade de obtenção e cuidado com os sujeitos de pesquisa, padronização do modelo experimental maximizando a quantidade de infartos e minimizando o número de animais utilizados.

### 5.2 Anestesia

Os animais foram pesados em balança digital e após submetidos a anestesia geral via intramuscular, com administração de Quetamina (Ketamin<sup>□</sup> / Cristalia - 50mg/kg) e Xilazina (Calmiun<sup>□</sup> / Agener União - 10mg/kg) (112, 113). Somente após a obtenção do plano anestésico, constatada através do reflexo palpebral e do relaxamento muscular, foi realizada a tricotomia.

### 5.3 Técnica cirúrgica

#### 5.3.1 Obtenção de via aérea e ventilação



Após a indução anestésica, com o relaxamento do animal, foi obtida via aérea definitiva através da intubação orotraqueal com cateter venoso periférico número 14. Após os animais foram conectados ao sistema de ventilação mecânica com volume de 2,5ml (O<sub>2</sub>/min.) e com frequência de 50 ciclos por minuto observando-se a expansão dos pulmões. Foram utilizados dois respiradores a volume (HARVARD®, Inc., respirador modelo 683, Massachusetts, USA) para animais de pequeno porte com oxigênio a 21% (ar ambiente).

### 5.3.2 Descrição do Infarto do Miocárdio

Todos os animais foram submetidos à tricotomia na região anterior do tórax, na porção ântero-lateral esquerda, imediatamente antes do procedimento cirúrgico. O animal foi posicionado em decúbito dorsal com uma leve inclinação para a direita, facilitando desta maneira a exposição da área a ser abordada, fixando os membros anteriores e posteriores com fita adesiva.

Após a anestesia e intubação orotraqueal do rato, foi realizada a antisepsia do tórax com iodopovedina tópico e a toracotomia lateral esquerda no terceiro espaço intercostal nos animais. Após a abertura da pleura esquerda, o pericárdio foi aberto para a luxação e melhor visualização da área a ser abordada. Após a exposição do coração, a aurícula esquerda foi afastada e a artéria coronária esquerda localizada entre a artéria pulmonar e o átrio esquerdo. Após, foi realizada a ligadura da coronária com fio de sutura polipropileno azul monofilamentar não absorvível 7.0. A região infartada foi visualizada pela diferença de coloração da área afetada. Em seguida, o coração foi reposicionado ao tórax, os pulmões hiperinsulflados e a parede torácica fechada por planos com fio de sutura mono-naylon monofilamentar não absorvível 4.0. Após a recuperação da anestesia,

os animais foram mantidos em gaiolas e alimentados com ração comercial padrão e livre acesso à água.

#### **5.4 Analgesia Pós-operatória**

Foi utilizado anti-inflamatório não esteroide (Carprofen), solução injetável estéril 2-5 mg/mL. (112)

#### **5.5 Avaliação Ecocardiográfica**

Os animais foram submetidos à análise por meio do equipamento de ecocardiografia bidimensional modelo HD7 (Philips, Netherland), com transdutores setoriais S12 (5-12 mHz).

Todos os animais, independente do grupo a que pertenciam, foram anestesiados com quetamina e xilazina na dose de 25mg/kg e 5mg/kg respectivamente, via intramuscular, para a realização do exame. Todos os animais foram submetidos ao ecocardiograma no sétimo e trigésimo dia pós oclusão coronária. Todos os animais foram monitorizados nas derivações periféricas com eletrodos pediátricos, obtendo-se a frequência cardíaca com visualização cardioscópica. O transdutor foi posicionado na porção ântero lateral esquerda da parede torácica, as imagens foram vistas em duas dimensões, e as câmeras ventriculares visualizadas em dois cortes, o transversal e o longitudinal. No longitudinal foi obtida uma visão axial do ventrículo esquerdo incluindo a valva mitral, a valva aórtica, a parede anterior, posterior e o ápice do ventrículo esquerdo; enquanto na corte transversal, foi observado a parede septal, anterior, lateral e posterior na região basal média e apical do ventrículo esquerdo. Os parâmetros analisados foram: fração de ejeção (FE%), volume diastólico (VDF, ml) e sistólico (VSF,ml) finais do ventrículo esquerdo. As medidas foram obtidas pelo método de Simpson, utilizando o

software do computador, tanto na sístole como na diástole. Todas as medidas foram feitas de forma “*cega*” e três vezes pelo mesmo observador, tendo como resultado final uma média das três.

Para avaliação ecocardiográfica pós-implante seguirá a mesma técnica descrita acima. Foram realizadas as seguintes medidas: superfície sistólica e diastólica finais, comprimento sistólico e diastólico finais do ventrículo esquerdo e frequência cardíaca para cálculos dos volumes sistólicos (VSFVE, ml) e diastólicos (VDFVE, ml) finais e da fração de ejeção (FEVE%) do ventrículo esquerdo. Todas as medidas foram realizadas de forma cega, pelo mesmo. Para o bem-estar animal após 30 dias, a eutanásia ocorrerá baseado em cálculos de perda de peso e na deterioração do estado clínico para a administração por meio de dose letal intraperitoneal da DL 50 (100mg/Kg) de tiopental.

## **6. METODOLOGIA EMPREGADA:**

### **6.1 Casuística e preparação da membrana amniótica**

As membranas amnióticas foram obtidas de parturientes (n=2, com 36 a 40 semanas de idade gestacional), após assinatura do termo de Consentimento Livre e

Esclarecido de acordo com um protocolo aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos do Hospital Pequeno Príncipe com parecer N° 659.204 – 2014 e 0948-11.

O processo descelularização das membranas, cultivo celular e caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais foi realizado no Núcleo de Regeneração Tecidual da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR).

## **6.2. Preparação da matriz amniótica humana descelularizada (MAHD)**

Todos os materiais foram utilizados em conformidade com as diretrizes éticas do Conselho Nacional de Saúde do Brasil. A membrana amniótica fresca (MAF) foi obtida após partos Cesarianos. Doadoras maternas forneceram consentimento informado e apresentaram sorologias negativas para HIV, hepatite B, hepatite C e sífilis. Os coágulos de sangue serão imediatamente removidos da placenta com solução salina tamponada com fosfato (PBS), contendo 100 u/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina. A MAHD foi preparada como Riau et al., 2010, células epiteliais amnióticas foram retiradas da membrana amniótica humana utilizando dodecil sulfato de sódio em PBS e incubado com velocidade de rotação de 100 rpm a 37° C por 24 horas e finalmente a MA foi novamente lavada 3 vezes com PBS.

A descelularização foi realizada com técnica asséptica em uma cabine de segurança biológica classe II BioSAFE (Veco®). Para esse processo, as membranas foram retiradas do meio (PBS) tampão fosfato pH 7.2 (Gibco) e tratadas com solução de SDS (duodecil sulfato de sódio) a 0,01% e SD (desoxicolato de sódio) a 0,01% por 24 horas a 37°C, com auxílio de agitador mecânico (Mesa agitadora 109 M, Nova Ética

Ltda). Depois foram conservadas em PBS a 4° C. De acordo com a metodologia descrita por (Hopper Woodhouse, 2003).

### **6.3 Punção medular**

#### **6.3.1 Obtenção do sangue da medula óssea**

Para cada animal, a obtenção do sangue da medula óssea foi realizada pelo método de punção-aspiração na medula óssea dos ratos, sempre precedido de anestesia. Os animais foram colocados em posição de decúbito lateral com a perna superior flexionada e a inferior reta. A punção-aspiração foi realizada na crista ilíaca posterior do fêmur por seringa descartável (BD-Plastipak®) de 5mL, com 0,2 mL de heparina (5.000UI/ mL), com agulha 25X8 21 mm G1 (BD- Precision Glide®); foi coletado cerca de 1mL do sangue da medula óssea de cada rato, seguida de identificação das seringas.

#### **6.3.2 Isolamento das células mononucleares**

As células mononucleares foram obtidas pela técnica de punção-aspiração, para o isolamento da fração mononuclear utilizou-se o gradiente de densidade ( $d=1,077g/m^3$ ) (Ficoll-Hypaque -Sigma, St. Louis, MO) de acordo com Böyum, em meio de Dulbecco modificado por Iscove (DMEM-GIBCO BRL) suplementado com 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e 20% de solução tampão. O material coletado de cada rato foi colocado em tubo estéril de centrífuga de plástico de 15 ml. Logo após, completado este tubo até 12 ml, com meio de cultura DMEM (Iscove's Modified Dulbecco's Media), suplementado com solução tampão 4% e antibiótico (penicilina e streptomina) 1% e homogeneizado. Em um tubo de plástico de 15 ml, foi colocado 3ml de solução de separação por gradiente densidade (Ficoll-Hypaque) e logo em seguida colocado neste

tubo o homogeneizado contendo a medula óssea do animal e meio de cultura DMEM, cuidadosamente para que esta não se misturasse.

Este tubo foi levado à centrífuga e submetido a 1500 rpm rotações por minuto durante 40 minutos a 22 °C. Logo após, foi levado a fluxo novamente, e retirado o anel formado entre o meio e o gradiente.

### 6.3.3 Estudo Anatomopatológico

Todos os animais foram submetidos à eutanásia e seus corações retirados para análise histopatológica pós-implante. Os corações foram preservados em frascos contendo formol 10% durante 24 horas. Após este período os corações serão clivados em quatro partes iguais transversais no micrótomo (Leica modelo RM 2145) com espessura de 5 µm.

Realizada a desidratação dos cortes, sendo estes submetidos a banhos sucessivos em álcool 70%, 80%, 90%, três banhos em álcool 100% no (Leica modelo TP1020), durante uma hora. Logo após, impregnada parafina líquida nos cortes através de três banhos a 65°C no mesmo aparelho. Então os cortes histológicos foram montados em lâminas e corados com solução de H&E e Picro Sirius Red. De cada fragmento foram realizadas duas lâminas com os quatro cortes e com as colorações citadas.

### 6.3.4 Avaliação do depósito de colágeno

A camada média das secções do ventrículo esquerdo (5 µm) foi hidratada com Sirius Red (0,5% em ácido pícrico aquoso saturado, Sigma) e vistos sob luz polarizada. Dez campos em cada região do coração foram selecionados aleatoriamente com três secções em séries não consecutivas, e o conteúdo de colágeno foi quantificado como áreas

Sirius Red positivas pelo uso do Microscópio Zeiss Axiovert S100 TV (Zeiss, Jena, Alemanha) 2.0 (UTHSCSA, San Antonio, TX, USA).

#### 6.3.5. Análise Imuno-histoquímica

As lâminas com cortes de 5  $\mu\text{m}$  foram preparadas, montadas em lâminas e submetidas ao processo de imuno-histoquímica. Após desparafinação com xilol e reidratação com álcool graduado, as lâminas foram colocadas em solução tampão de citrato 0,01 M (pH = 6,0) e os procedimentos de pré-tratamento para expor os antígenos que foram realizados em banho-maria a 90 ° C por 60 minutos. A seguir as lâminas foram bloqueadas com peroxidase por 30 minutos.

As seções foram incubadas com os anticorpos primários von Willebrand Factor (vWF) (ab171825, Abcam), anti-MyoD (ab203383, Abcam), anti  $\alpha$ -sarcomeric actin (A2172, Sigma-Aldrich), anti-fast myosin skeletal heavy chain (MHC) (ab75370, Abcam), anti-cx43 (ab11370, Abcam) diluídos com diluente de anticorpos Dakocytomation® a 4 ° C. Após a conjugação com anticorpos primários, as seções foram incubadas com anticorpo secundário através do complexo EnVision® + Dual Link/Peroxidase (Dakocytomation®) por 20 minutos em temperatura ambiente, o cromogênio DAB(3,3-diaminobenzidina) foi adicionado e contra corado com hematoxilina. Foram utilizados controles positivos apropriados. Para o controle negativo, o anticorpo primário não foi adicionado às seções e o resto do procedimento foi realizado como descrito acima.

#### 6.3.6 Análise Estatística

Após a organização os dados foram encaminhados a análise estatística. Os resultados foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvio padrão. Para a comparação dos grupos foi considerado o modelo de análise de variância com um fator (ANOVA) e o teste LSD (least significant difference) para as comparações múltiplas. Para a comparação dos momentos de avaliação dentro de cada grupo foi usado o teste t de Student para amostras pareadas. A condição de normalidade foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

## **7. DELINEAMENTO DO PROJETO**

No primeiro trimestre do estudo foram obtidas as membranas amnióticas e realizada a descelularização das mesmas e analisadas as suas dimensões e características. A seguir ratos machos Wistar, 2–3 meses de idade foram submetidos ao infarto agudo do miocárdio. Após a comprovação ecocardiográfica de acordo com o escore de fração de ejeção abaixo de 40%. Os animais foram acompanhados diariamente. Esta primeira fase tem por objetivo a reprodução do modelo de infarto agudo do miocárdio e conhecimento da evolução e da extensão da lesão miocárdica.

Após a comprovação por ecocardiografia do infarto, 50 ratos machos Wistar, 2–3 meses de idade, foram randomizados e divididos em 3 grupos:



Tabela 1 – Randomização dos grupos

<b>GRUPOS</b>		
Controle (somente infarto) <b>(C)</b>	Membrana Amniótica <b>(MA)</b>	Células-Tronco <b>(CT)</b>

No trigésimo dia após infarto do miocárdio, os animais foram submetidos a nova avaliação ecocardiográfica e posteriormente foram eutanasiados e seguidos de análises histopatológicas do infarto transmural na região comprometida. Buscou-se alcançar um número mínimo de 10 animais para o término de cada grupo de estudo para a viabilização de uma análise estatística adequada.

A seguir foi realizada a análise estatística de acordo com o teste de ANOVA para dados não paramétricos, seguido do teste do Bonferroni sendo o valor de  $p < 0,05$  considerado significativo.

## 8. RESULTADO E DISCUSSÃO

*Blume, G.G.; Machado-Junior, P.A.B.; Simeoni, R.B.; Bertinato, G.P.; Tonial, M.S.; Nagashima, S.; Pinho, R.A.; de Noronha, L.; Olandoski, M.; de Carvalho, K.A.T.; Francisco, J.C.; Guarita-Souza, L.C. Bone-Marrow Stem Cells and Acellular Human Amniotic Membrane in a Rat Model of Heart Failure. Life* **2021**, *11*, 958.

<https://doi.org/10.3390/life11090958>

### BONE-MARROW STEM CELLS AND ACELLULAR HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE IN A RAT MODEL OF HEART FAILURE

**Gustavo Gavazzoni Blume, MD<sup>1</sup>** – [gustavoblume@gmail.com](mailto:gustavoblume@gmail.com)  
**Paulo André Bispo Machado-Júnior, MD<sup>1</sup>** – [machadojrpb@gmail.com](mailto:machadojrpb@gmail.com)  
**Rossana Baggio Simeoni, PhD<sup>1</sup>** - [rossanabaggio@gmail.com](mailto:rossanabaggio@gmail.com)  
**Giovana Paludo Bertinato, MD<sup>1</sup>** – [gigibertinato@gmail.com](mailto:gigibertinato@gmail.com)  
**Murilo Sgarbossa Tonial, MD<sup>1</sup>** - [murilotonial@gmail.com](mailto:murilotonial@gmail.com)  
**Seigo Nagashima<sup>1</sup>** – [seigocap@gmail.com](mailto:seigocap@gmail.com)  
**Lucia de Noronha, MD, PhD<sup>1</sup>** - [lnno.noronha@gmail.com](mailto:lnno.noronha@gmail.com)  
**Marcia Olandoski, PhD<sup>1</sup>** - [bio.estadistica@pucpr.br](mailto:bio.estadistica@pucpr.br)  
**Katherine Athayde Teixeira de Carvalho, MD, PhD<sup>2</sup>** - [katherinecarv@gmail.com](mailto:katherinecarv@gmail.com)  
**Julio César Francisco, PhD<sup>2</sup>** - [julio.apfr@gmail.com](mailto:julio.apfr@gmail.com)  
**Luiz César Guarita-Souza, MD, PhD<sup>1</sup>** - [guaritasouzalc@hotmail.com](mailto: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. Cell Therapy and Biotechnology in Regenerative Medicine Department, The Pelé Pequeno Príncipe Institute, Child and Adolescent Health Research & Pequeno Príncipe Faculties, Ave. Silva Jardim, no. 1632, Box 80240-020, Curitiba, Paraná,

#### Corresponding author:

Gustavo Gavazzoni Blume  
 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: [gustavoblume@gmail.com](mailto:gustavoblume@gmail.com)

**FUNDING SOURCE:** This work was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ) [grant number 405670/2018-4].

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

## ABSTRACT

Acute myocardial infarction (AMI) remains as the leading cause of cardiovascular death worldwide, and a major cause of heart failure. Recent experimental studies have suggested that cell-based therapies with bone marrow stem cells (BMSC) and human amniotic membrane (hAM) would recover the ventricular function after an ischemic injury in the heart; however, the mechanisms underlying these effects are still controversial. In the present study, we aimed to compare the effects of BMSC and hAM in a rat model of heart failure. Rats were subjected to myocardial ischemia through left-coronary occlusion; after seven days, the animals were subjected to echocardiographic evaluation and those with ejection fraction < 50% were included and randomized into three groups: control (n=8), BMSC (n=11) and hAM (n= 8). The BMSC and hAM were injected and implanted, respectively, on the anterior ventricular wall seven days after the procedure. A new echocardiographic analysis was performed on the 30<sup>th</sup> day evaluating left ventricular ejection fraction (EF), left ventricular-end systolic (LVESV) and diastolic (LVEDV) volume, followed by euthanasia and histopathological analysis of the transmural infarction area. Statistical significance was accepted when  $p < 0.05$ . The echocardiographic results showed that the groups were homogeneous on the 7<sup>th</sup> day. After 30 days, both BMSC and hAM groups showed significant improvements on EF in comparison to control group ( $p = 0.03$  and  $0.006$  respectively), without significant difference when compared to each other. The intragroup analysis showed that both LVESV and LVEDV were significantly reduced in BMSC and hAM groups in comparison to baseline, without significant beneficial in the control group. The infarct size was similar between the 3 groups, the control group had higher levels of type 1 collagen, and the hAM expressed higher levels of type 3 collagen. New blood vessels, desmine positive cells and connexin-43 expression were elevated in both BMSC and hAM groups in comparison to control group. Thus, our study suggests a recovery of global cardiac function with the use of both BMSC and hAM, associated with angiogenesis and cardiomyocyte regeneration after 30 days.

**Keywords:** Myocardial Infarction. Tissue Regeneration. Stem Cells. Human Amniotic Membrane.

## 1. INTRODUCTION

Acute Myocardial Infarction (AMI) is the most common cause of death globally, accounting for 32% of deaths worldwide in 2013 (114) . The majority of the events are related to a fissure and consequent rupture of atherosclerotic plaque, with consequent thrombus formation and obstruction of the coronary artery (115).

In patients who survive, significant modifications occur in the electrical, biochemical, and structural architecture of the ventricular wall, mainly related to the action of pro-inflammatory cytokines, macrophages, and neutrophils in the infarct area (116). The cellular hypoxia leads to oxidative stress and formation of free radicals, which are able to damage crucial proteins necessary for myocardial excitation and contraction, such as ion channels and calcium pumps, with consequent loss of contractile function, resulting in cardiac remodeling and ventricular dysfunction (116-118).

The ventricular dysfunction is a major cause of heart failure (HF). Data from the American Heart Association estimated the prevalence of 5.1 million individuals with HF in the United States in 2012, with projections of a 46% increase by 2030, resulting in more than 8 million people affected by this complication (119, 120). HF is also the main cause of hospitalization worldwide in individuals older than 65 years, generating an annual cost of \$26 billion in the United States (119, 120).

These numbers are mostly related to the limitations of the current therapeutic approaches after coronary occlusion, which are able to treat only the consequences of AMI, not being able to restore the contractility of the necrotic cells. Thus, the evolution to HF is inevitable in most of the cases, which turns heart transplantation as the last effective therapy for these patients. This procedure, even though it is considered as the gold-standard treatment for HF is not always an option due to the scarcity of donors and comorbidities that usually contraindicate the transplant (104).

In this scenario, new therapeutic options, such as cell-based therapies, emerge as an alternative for the treatment of HF, due to the potential of restoring cardiac function, reducing infarct size and preventing cardiac remodeling (99, 116). Previous animal studies have demonstrated improvements in ventricular function with the use of bone marrow stem cells (BMSC) after AMI, showing potential of angiogenesis, formation of undifferentiated cells and new cardiomyocytes (5, 6). Despite this, its ability to reverse ventricular remodeling is still controversial in the literature (108, 121).

On the other hand, the human amniotic membrane (hAM), previously used in skin wounds, ophthalmological and gynecological conditions, has been shown to prevent cardiac remodeling in animals submitted to ischemic events (103, 122, 123), with anti-inflammatory and antimicrobial properties. Moreover, it is a matrix that does not trigger an immune response in the host on its decellularized form, making it even more attractive for grafting models in tissue engineering (8, 10, 124, 125).

Despite this, the mechanisms involving the action of both hAM and BMSC and the interaction with the resident cardiac cells are still not well-established in the literature. In this way, understanding the histopathological processes that occur in the presence of these materials after AMI is highly relevant in choosing an effective therapeutic approach. In this sense, the present study aimed to evaluate the functional and histopathological effects of BMSC and hAM in a rat model of myocardial infarction.

## **2. METHODS**

The experiments were performed following the ethical standards and principles of the Brazilian College of Animal Experimentation - COBEA, with approval from the Research Ethics Committee on the use of animals at PUCPR - CEUA/PUCPR, under approval protocol 1273/2018.

Briefly, a total of 50 male Wistar rats, 2-3 months, were submitted to AMI. After proof by echocardiography of the infarction after 07 days, the animals were randomized and divided into 3 groups: Control; Human Amniotic Membrane (hAM); Bone-marrow Mononuclear Stem Cells (BMSC). On the 30th day after myocardial infarction, the animals were submitted to a new echocardiographic evaluation and subsequently euthanized, followed by histopathological analysis of the transmural infarction in the compromised region.

## **2.1 SAMPLE**

For the study, 50 adult male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*) weighing between 250 and 300 grams were used. The animals were housed in cages and kept under constant environmental conditions, with a 12-hour day/night cycle, room temperature, and water and feed for free consumption.

## **2.2 MYOCARDIAL INFARCTION INDUCTION**

The animals were submitted to intramuscular general anesthesia, with administration of Ketamine (Ketamin®/ Cristalia - 50mg/kg) and Xylazine (Calmiun®/ Agener União - 10mg/kg). After reaching the anesthetic plane, verified through the eyelid reflex and muscle relaxation, a definitive airway was obtained through orotracheal intubation with a number 14 peripheral venous catheter. After that, the animals were connected to the mechanical ventilation system with a volume of 2.5ml (O<sub>2</sub>/min) and a frequency of 50 cycles per minute, observing lung expansion. Two volume respirators were used (HARVARD®, Inc., respirator model 683, Massachusetts, USA) for small animals with oxygen at 21% (room air).

With the rat anesthetized and ventilated, the animal was positioned in dorsal decubitus with a slight inclination to the right, facilitating the exposure of the area. The

forelimbs and hind limbs were fixed with adhesive tape. After adequate positioning, antisepsis of the thorax was performed with topical iodopovidine and left lateral thoracotomy was performed on the third intercostal space. After opening the left pleura, the pericardium was opened for dislocation and better visualization of the area to be approached. Followed by exposure of the heart, the left auricle was retracted, and the left coronary artery located between the pulmonary artery and the left atrium. The ligation of the coronary artery was performed with non-absorbable 7-0 monofilament polypropylene suture thread (126). The infarcted area was immediately visualized by the difference in coloration of the affected area. After that, the heart was repositioned to the thorax, the lungs were hyperinflated, and the chest wall was closed by planes with 4-0 non-absorbable monofilament mono-nylon suture thread. For postoperative analgesia, non-steroidal anti-inflammatory drug (Carprofen), sterile injectable solution 2-5 mg/mL was used.

### **2.3 ECHOCARDIOGRAPHY (7<sup>th</sup> DAY)**

The animals were submitted to echocardiographic analysis using two-dimensional echocardiography equipment model HD7 (Philips Medical Systems, Andover, MA), with S12 sectorial (5-12 mHz) transducer.

All animals, regardless of the group, were submitted to an echocardiographic evaluation on the seventh day after coronary occlusion, anesthetized with ketamine and xylazine at a dose of 25mg/kg and 5mg/kg respectively, intramuscularly. All measurements were made blindly and three times by the same observer, and the final result was an average of the three measurements. The main objective of the echocardiogram was to evaluate the Ejection Fraction (EF) and end-systolic and end-

diastolic volumes of the left ventricle of the animals. Those with EF > 50% were excluded from the study.

## **2.4 PREPARATION OF HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE**

The amniotic membranes were obtained from parturient women (n=2, at 36 to 40 weeks of gestational age), after signing the Free and Informed Consent form according to a protocol approved by the ethics committee for research on human beings of the Hospital Pequeno Príncipe - protocol number 659.204/2014 and 0948-11.

The amniotic membranes were obtained after cesarean deliveries. Maternal donors were serologically negative for HIV, hepatitis B, hepatitis C, and syphilis. Possible blood clots were immediately removed from the placenta with phosphate buffered saline solution (PBS) containing 100 u/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. Amniotic epithelial cells were removed from the human amniotic membrane using SDS (sodium dodecyl sulfate) solution in PBS and incubated with a rotation speed of 100 rpm at 37° C for 24 hours, and finally it was washed more 3 times with PBS.

Decellularization was performed aseptically in a BioSAFE class II biological safety cabinet (Veco®). For this process, the membranes were removed from the solution (PBS) buffer phosphate pH 7.2 (Gibco) and treated with 0.01% SDS and 0.01% SD (sodium deoxycholate) solution for 24 hours at 37°C with the aid of mechanical shaker (Mesa Agitadora 109 M, Nova Ética Ltda). Then, the membranes were preserved in PBS at 4° C, according to the methodology described in previous studies (127).

## **2.5 ISOLATION OF BONE MARROW STEM CELLS**



Bone marrow blood was obtained by the puncture-aspiration method in the bone marrow of the animals themselves, always preceded by anesthesia. The animals were placed in lateral decubitus position with the upper leg flexed and the lower leg straight. The puncture-aspiration was performed in the posterior iliac crest of the femur using a 5mL disposable syringe (BD-Plastipak®) with 0.2 mL of heparin (5.000 IU/mL) with a 25X8 21 mm G1 needle (BD- Precision Glide®); about 1mL of blood was collected from the bone marrow of each rat, followed by identification of the syringes.

For isolation of the mononuclear fraction, density gradient ( $d=1.077\text{g/m}^3$ ) (26) in Iscove's modified Dulbecco's medium (DMEM-GIBCO BRL) supplemented with 1% antibiotic (penicillin and streptomycin) and 20% buffer solution. The material collected from each mouse was placed in a sterile 15 ml plastic centrifuge tube, and this tube was then completed to 12 ml with DMEM culture medium supplemented with 4% buffer solution and 1% antibiotic (penicillin and streptomycin) and homogenized. In a 15 ml plastic tube, 3 ml of density gradient separation solution (Ficoll-Hypaque) was placed with the homogenized content containing the animal's bone marrow and DMEM culture medium. This tube was taken to the centrifuge and submitted to 1500 rpm rotations per minute for 40 minutes at 22 °C. After that, it was brought to flow again, and the ring formed between the medium and the gradient was removed.

## **2.6 BMSC TRANSPLANTATION AND hAM IMPLANTATION**

Animals with EF < 50% were randomly assigned into three groups 07 days after AMI: control group, BMSC group and hAM group. The animals were again anesthetized (50 mg/kg Ketamine and 10 mg/kg Xylazine) and subjected to median transsternal sternotomy. The BMSC group received  $5 \times 10^6$  mononuclear cells injected directly on the

infarcted area and transition zone, as previously described (27), and the hAM group received the patch on the anterior surface of the heart, sutured with 7-0 polypropylene. The control group received only saline solution by transsternal sternotomy.

## **2.7 ECHOCARDIOGRAPHY (30<sup>th</sup> DAY)**

On the 30th day after coronary occlusion, all the animals were submitted to a new echocardiographic analysis, under the same conditions as described on the 7<sup>th</sup> day. The main objective was to compare EF, LVESV and LVEDV between pre- and post-application of hAM and BMSC periods. After the echocardiographic evaluation, euthanasia was performed with an overdose of the anesthetic drugs.

## **2.8 ANATOMOPATHOLOGICAL STUDIES**

All animals were euthanized and their hearts were removed for histopathological analysis 30 days after implantation. The hearts were preserved in flasks containing 10% formaldehyde for 24 hours. After this period, they were cleaved in four equal transversal parts in a microtome (Leica model RM 2145) with a thickness of 5  $\mu\text{m}$ .

Once the sections were dehydrated, the pieces were submitted to successive baths in 70%, 80%, 90% alcohol and three baths in 100% alcohol (Leica model TP1020) for one hour. Immediately thereafter, there was impregnation of liquid paraffin on the sections through three baths at 65°C in the same device. Subsequently, the histological sections were mounted on slides and stained with H&E solution and Picro Sirius Red. From each fragment, two slides were made with the four sections and the mentioned stains.

### *2.8.1 Collagen Deposition Assessment*

The middle layer of the left ventricular sections (5  $\mu\text{m}$ ) was hydrated with Sirius Red (0.5% in saturated aqueous picric acid, Sigma) and viewed under polarized light. Ten fields in each region of the heart were randomly selected with three sections in non-consecutive series, and collagen content was quantified as Sirius Red positive areas by use of a Zeiss Axiovert S100 TV Microscope (Zeiss, Jena, Germany) 2.0 (UTHSCSA, San Antonio, TX, USA).

### *2.8.2 Immunohistochemical Analysis*

Histological slides were prepared with hematoxylin-eosin (HE) stain and were used to mark areas of interest for performing tissue sample array arrangement or Tissue Microarray (TMA). Next, two 4  $\mu\text{m}$ -thick paraffin-embedded sections of the TMA blocks were transferred to electrically charged Star Frost™ (Braunschweig, Germany) slides and incubated with an anti-Desmine (ab8592; Abcam, Cambridge, UK), anti-connexin 43 (ab217676; Abcam, Cambridge, UK) and anti-factor VIII (275376; Abcam, Cambridge, UK) overnight in a humidified chamber at a temperature between 2-8 °C (28).

Immunoreactivity was developed by adding DAB chromogen-substrate solution (Spring) to the slides. Harris hematoxylin was used for counterstaining. Positive and negative controls were performed in parallel with all reactions. The slides were scanned using the Axio Scan.Z1 scanner (Carl Zeiss, Germany). The generated files were fragmented into single images and approximately 25 images were selected for analysis. The areas of immunopositive markings for the antiprotein antibodies were quantified

using Image-Pro Plus version 4.5 software (Media Cybernetics, USA). The immunopositive objects were selected using a "mask" to standardize and automate the process. Numerical data of the immunopositive marking area were generated and subsequently exported to an Excel spreadsheet.

## **2.9 STATISTICAL ANALYSIS**

Quantitative variables were described by means, medians, minimum values, maximum values and standard deviation. For comparison of the groups in the echocardiographic analysis at 07 days was considered the model of analysis of variance with one factor (ANOVA) and the test of covariance (ANCOVA) to evaluate after 30 days and compare with the results of baseline levels. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used for the histopathological analyses. Values of  $p < 0.05$  indicated statistical significance. The data were analyzed with the Statistica v.8.0 computer program.

## **3. RESULTS**

Of the 50 animals initially included in the study, 11 died hours or days after infarction induction (mortality rate of 22%), and 07 were excluded for having an ejection fraction higher than 50%. Thus, 32 animals were included and randomized into three groups: control (n=10), BMSC (n=11) and hAM (n=11). After applying the membranes, 03 animals of hAM group and 2 animals of control group died, related to postoperative complications, leaving 27 animals that were included in the final analysis: control (n=8), BMSC (n=11) and hAM (n=8).

### 3.1 ECHOCARDIOGRAPHIC ANALYSIS

#### 3.1.1 Ejection Fraction (EF)

The intergroup analysis showed no statistical difference ( $p= 0.122$ ) between the groups on the 7<sup>th</sup> day after AMI, with values of 38.73% (control group), 33.21% (hAM group) and 30.67% (BMSC group); thus, the groups were homogeneous (Table 01, Figure 01). After 30 days, significant difference was identified between the hAM and BMSC groups in comparison to the control group ( $p=0.006$  e  $p=0.034$ , respectively). There was no significant difference in EF after 30 days when the hAM and BMSC groups were compared to each other ( $p=0.326$ ) (Table 02).

In the intragroup analysis after 30 days, the EF varied from 33.21% to 49.77% in the hAM group ( $p=0.001$ ) and from 30.67% to 46.49% in the BMSC ( $p<0.001$ ). No significant variation in EF was observed in the control group, (Table 02).

Variable	Group	7th day	30th day	p* (7 <sup>th</sup> x 30 <sup>th</sup> day echo)
EF (%)	Control (n=8)	38,73 ± 7,68	39,13 ± 6,54	0,896
	hAM (n=8)	33,21 ± 7,62	49,77 ± 9,91	0,001
	BMSC (n=11)	30,67 ± 8,80	46,49 ± 6,68	<0,001

LVESV (mL)	Control (n=8)	0,182 ± 0,052	0,146 ± 0,056	0,118
	hAM (n=8)	0,229 ± 0,104	0,096 ± 0,047	0,001
	BMSC (n=11)	0,220 ± 0,078	0,127 ± 0,058	0,004
LVEDV (mL)	Control (n=8)	0,294 ± 0,053	0,231 ± 0,073	0,053
	hAM (n=8)	0,330 ± 0,118	0,183 ± 0,051	0,002
	BMSC (n=11)	0,312 ± 0,080	0,225 ± 0,069	0,011

*Table 02: Intragroup analysis of pre- and post-implantation of hAM and BMSC. 7<sup>th</sup> day: echocardiographic evaluation before the amniotic membrane and stem cells implantation; 30<sup>th</sup> day: echocardiographic evaluation after 30 days of coronary occlusion; Data are shown as mean ± standard deviation. Values of  $p < 0.05$  denote statistical significance.*

Intergroup comparison	30th day EF
	p
Control x hAM	0,006
Control x BMSC	0,034
hAM x BMSC	0,326

*Table 03: Comparison of groups two by two regarding ejection fraction 30 days after coronary occlusion. 30<sup>th</sup> day EF: EF after 30 days of coronary occlusion; hAM: amniotic membrane; BMSC: bone marrow mononuclear stem cells; Values of  $p < 0.05$  denote statistical significance.*

### *3.1.2 Left ventricular end-systolic volume (LVESV)*

Regarding the LVESV, the intergroup analysis after 07 days showed values of 0.182 mL in the control group, 0.229 mL in hAM group and 0.220 mL in BMSC group, ( $p=0.471$ ). After 30 days, we identified values of 0.146 mL in control group, 0.096 mL in the hAM group, and 0.127 mL in BMSC group ( $p=0.056$ ). Thus, the groups were considered homogeneous in both pre- and postoperative periods (Table 01, Figure 01).

In the intragroup analysis (Table 01) between the pre- and postoperative periods, a significant reduction from 0.229 mL to 0.096 mL in the hAM group ( $p=0.001$ ) and from 0.220 mL to 0.127 mL in the BMSC group ( $p=0.004$ ) was identified. In the control group, there was a non-significant reduction from 0.182 mL to 0.146 mL ( $p=0.118$ ).

### *3.1.3 Left ventricular end-diastolic volume (LVEDV)*

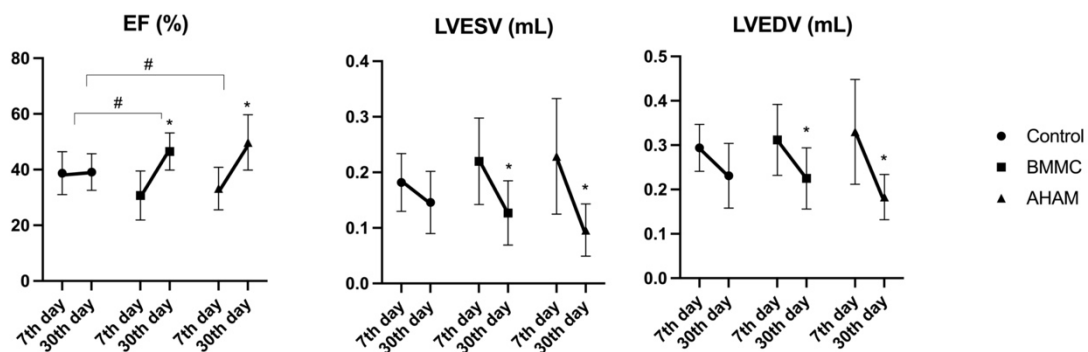
The intergroup analysis showed values of 0.294 mL for the control group, 0.330 mL for the hAM group, and 0.312 mL for the BMSC group during the preoperative evaluation ( $p=0.706$ ). After 30 days, the control group presented values of 0.231 mL, 0.183 mL for the hAM group, and 0.225 mL for the BMSC group ( $p=0.150$ ).

During the intragroup analysis between the 7<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> days, we identified an improvement of LVEDV in both the hAM and BMSC groups (0.330 mL to 0.183 mL, with  $p=0.002$  and, 0.312 mL to 0.225 mL with  $p=0.011$ , respectively) (Table 01, Figure 03).

*Figure 03: Echocardiographic results of the analyzed groups. Results are shown as mean  $\pm$  standard deviation.  $p<0,05$  denoted statistical significance in comparison to control group (#) or intragroup 7<sup>th</sup> day analysis (\*). EF (ejection fraction); LVESV (left ventricle end-systolic volume); LVEDV (left ventricle end-diastolic volume); BMSC (bone marrow mononuclear stem cells); hAM (human amniotic membrane).*

### 3.2 ANALYSIS OF THE INFARCT AREA AND COLLAGEN

For the analysis of the infarct area, sections stained with Masson's Trichrome were



analyzed, and the infarct area was denoted according to the percentage of stain in the sample (Figure 04). During histopathological analysis, we observed no difference in the infarct area between the 3 groups after 30 days of analysis ( $p=0.383$ ). Type I collagen levels were higher in the control group ( $p=0.014$ ), while type III collagen levels were higher in the hAM group, with a statistically significant difference in comparison to the



control group ( $p=0.002$ ). The BMSC group showed no significant difference in collagen type I and III levels when compared to each other (Tables 04 and 05).

Variable	Group	Mean	Standard Deviation	p* (comparison of 3 groups)
Infarct area (%)	Control (n=8)	2111209	1419393	
	hAM (n=8)	3555715	2373125	
	BMSC (n=11)	2809873	1713152	0,383
Type I	Control (n=8)	98,6	1	
Collagen (%)	hAM (n=8)	95,8	1,1	0,014
	BMSC (n=11)	97	2,2	
	Control (n=8)	1,45	1,04	
Type III	hAM (n=8)	4,22	1,13	0,014
	BMSC (n=11)	2,96	2,25	
	Control (n=8)			

*Table 04: Intergroup analysis of infarct area and collagen types after 30 days after infarct induction. Values expressed in  $\mu\text{m}^2$ . hAM: amniotic membrane; BMSC: bone marrow mononuclear stem cells; Values of  $p < 0.05$  denote statistical significance.*

Comparison Groups	p*
-------------------	----

Control x BMSC	0,084
Control x hAM	0,002
BMSC x hAM	0,070

Table 05: For collagen I and III a significant difference was found between the groups. Therefore, these were compared two by two. The table above shows the *p* values of these comparisons. hAM: amniotic membrane; BMSC: bone marrow mononuclear stem cells; The *p* values for collagen I and III are the same because collagen I + collagen III = 100%.

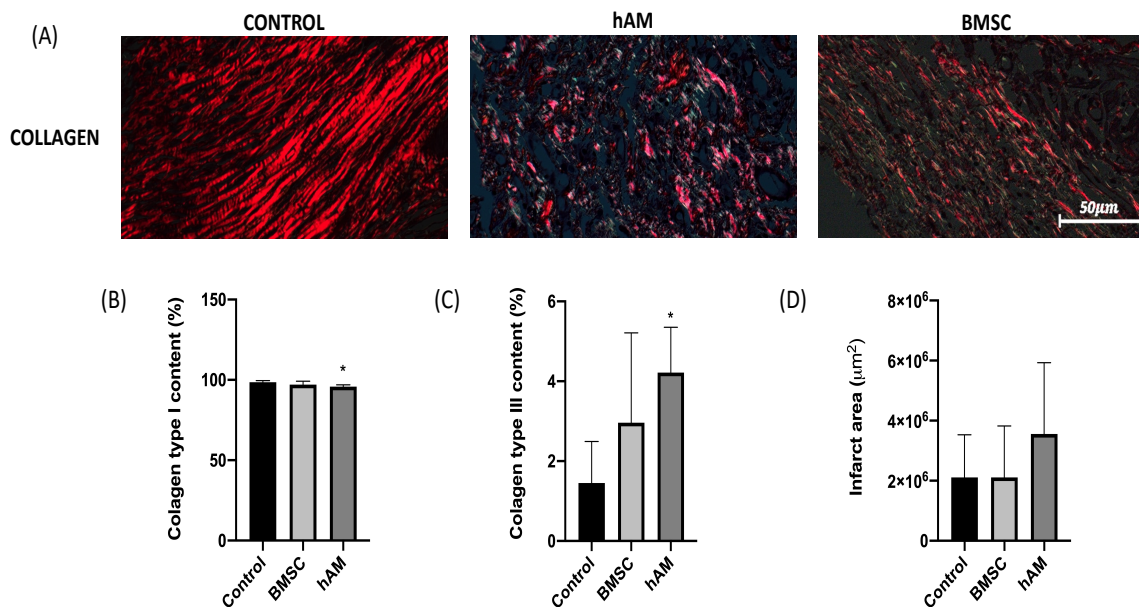


Figure 04: Collagen content analysis and infarct area after 30 days. (A) Collagen deposition quantified as Sirius Red positive areas; Images 40x, scale bar = 50 μm. (B) Collagen type I content. (C) Collagen type III content. (D) Infarct area. Results are shown as mean ± standard deviation. *p* < 0,05 denoted statistical significance in

*comparison to control group (\*) .BMSC (bone marrow mononuclear stem cells); hAM (human amniotic membrane).*

### **3.3 FACTOR VIII**

In order to evaluate the angiogenic potential of stem cells and amniotic membrane, the levels of factor VIII in the infarct area were evaluated by immunohistochemistry 30 days after AMI. The results (Table 05) showed a significant increase of factor VIII in both BMSC and hAM groups compared to the control group, but without significant difference when compared to each other (BMSC x hAM) (Table 06).

### **3.4 DESMINE**

The presence of Desmine in the cardiac tissue was evaluated in order to identify cardiac muscle cells in the infarct region. There was a significant increase of desmine in the BMSC and hAM groups compared to the control group (Table 05, Figure 05). Despite this, there was no significant difference when the stem cell and amniotic membrane groups were compared among themselves (Table 06).

### **3.5 CONNEXIN**

The levels of Connexin-43 were evaluated in order to identify GAP-Junctions in the infarct region. The results (Table 05) showed a higher presence of Connexin-43 in the BMSC and hAM groups, with only the BMSC group showing a significant difference in relation to the control group. There was no significant difference when the stem cell and amniotic membrane groups were compared among themselves (Table 06).

Variable	Group	Mean	Median	Standard Deviation	p* (comparison of 3 groups)
Connexin (%)	Control (n=4)	9,51	9,39	0,73	
	hAM (n=4)	12,44	12,04	2,03	0,034
	BMSC (n=4)	12,27	12,28	0,62	
Desmine (%)	Control (n=4)	4,41	3,61	1,98	
	hAM (n=4)	25,01	26,60	8,19	0,015
	BMSC (n=4)	17,74	18,41	4,12	
Factor VIII (%)	Control (n=4)	3,23	3,47	0,71	
	hAM (n=4)	9,95	7,23	6,04	0,018
	BMSC (n=4)	6,63	6,48	1,04	

*Table 06: Intergroup analysis of the evaluation of Connexin-43, Desmine and Factor VIII in the infarct area 30 days after infarct induction. hAM: amniotic membrane; BMSC: bone marrow mononuclear stem cells; Values of  $p < 0.05$  denote statistical significance.*

Comparison	p		
	CONNEXIN	DESMINE	FACTOR VIII
Groups			

Control x BMSC	0,018	0,022	0,024
Control x hAM	0,058	0,002	0,003
BMSC x hAM	1,000	0,313	0,622

Table 07: Two by two comparison of the groups. hAM: amniotic membrane; BMSC: bone marrow mononuclear stem cells; Values of  $p < 0.05$  denote statistical significance.

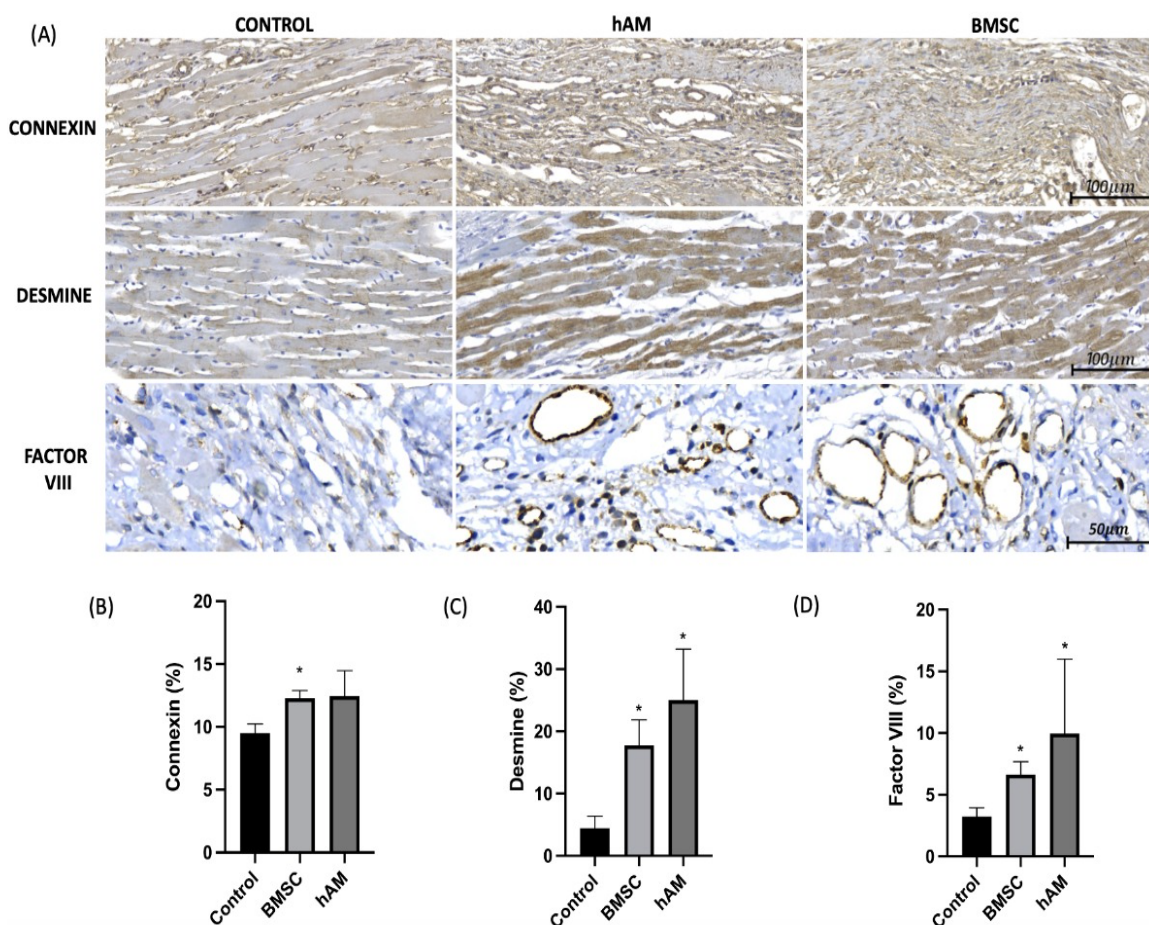


Figure 05: Representative areas of Connexin, Desmine and Factor VIII after 30 days.

(A) Immunohistochemical representative images for Connexin, Desmine and Factor VIII; Connexin and Desmine images 10x, scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ; Factor VIII images 20x, scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . (B) Connexin intergroup analysis after 30 days. (C) Desmine intergroup

*analysis after 30 days (D) Factor VIII intergroup analysis after 30 days; Results are shown as mean  $\pm$  standard deviation.  $p < 0,05$  denoted statistical significance in comparison to control group (\*). BMSC (bone marrow mononuclear stem cells); hAM (human amniotic membrane).*

#### **4. DISCUSSION**

The recovery of the contractile function of the heart after an ischemic event that evolved to transmural fibrosis is still a challenge in medical practice. Thus, the evolution to heart failure is inevitable in most cases, mainly due to the extent of the infarct area and the pathological cardiac remodeling (128). In this scenario, the use of compatible biomaterials with cell-regeneration potential emerges as a therapeutic alternative after AMI (99).

Bone marrow stem cells have already been used since 2001 for the treatment of cardiovascular diseases, due to their potential for self-regeneration, proliferation and differentiation into other cell-lines (129). Nevertheless, the mechanisms of interaction and functional consequences after an ischemic event are still controversial. Animal studies (7, 121, 130) and clinical trials (56, 131) have already demonstrated improvements in cardiac function after bone marrow stem cell therapy following AMI. On the other hand, results of randomized studies such as the HEBE trial, TIME trial, and REGENT trial have not demonstrated the same potential (62, 66, 132).

In the present study, we observed a significant benefit in cardiac function with the therapeutic use of stem cells on the 30th day after AMI, with an EF ranging from 30.67% to 46.49% during the follow-up. Moreover, there was significant improvement on ventricular remodeling, with significant reduction of end-systolic (0.220mL to 0.127mL)

and end-diastolic (0.312 mL to 0.225 mL) volumes (Figure 01). This anti-remodeling effect has already been observed using a co-culture of mononuclear cells and skeletal myoblasts in a model of Chagas' cardiomyopathy (133) but it was not observed in a model of transmural myocardial infarction with the same co-culture of cells (134) This consideration suggests that the mechanisms of action of stem cells may be potentiated when the mononuclear cells are injected into the area of fibrosis and the transition zone between fibrosis and intact myocardium, as used in the present study.

Our results also demonstrated significant benefits in angiogenesis and cellular regeneration in the BMSC group, confirmed on immunohistochemistry by high levels of factor VIII, Connexin and Desmine, in comparison to the control group (Figure 03). This fact reinforces the hypothesis that the mechanism of action of stem cells involves mainly autocrine and paracrine actions in the cellular microenvironment, and not the direct differentiation into cardiomyocytes as previously considered (99)

The therapeutic efficacy of stem cells on the myocardium depends on their survival after delivery to the myocardium, since these cells need to survive, multiply and differentiate in the hypoxic microenvironment after AMI (135). The delivery of the cells can be performed by the venous system, intracoronary, venous sinus and endocavitary intramuscular (136). In our study, we chose the intramuscular method because of its easy and highly efficacy due to precise delivery of the cells into the ischemic area (137, 138).

In relation to the hAM group, our results showed a recovery in global cardiac function measured through the variation in EF, from 33.21% to 49.77% ( $p < 0.001$ ) after 30 days, associated with a significant reduction in pathological ventricular (figures 06 and 07), similar outcomes to those exposed by Henry et al. (106) Kim et al. (104) and Fang et al. (107) in their studies. These processes occurred without significant modification of the

infarct area during histopathological analysis in 30 days, similarly to the study conducted by Roy et al. (102, 103) the same fact in the infarcted area was observed in the BMSC group (table 05).

The histopathological analysis also showed that the hAM group had higher levels of type III collagen in comparison to type I collagen. Type III collagen is the immature form of type I collagen, possessing mechanical properties of elasticity that confers a better blood pumping capacity to the heart (139, 140), with previous studies already demonstrating that the increase in the collagen III/I ratio was related to a better cardiac function in patients with previous diastolic dysfunction (141). Therefore, this increase in type III collagen observed on the hAM group suggests the potential immunomodulatory effect of hAM after AMI; this effect, however, was not observed in the stem cell group (tables 07 and 08).

In our study a higher angiogenesis potential was observed on the area of the amniotic membrane application in the ischemic tissue, through elevated levels of Factor VIII. Previous studies have been able to corroborate to this finding. For example, Francisco et al. (142, 143) detected an increase in the proliferation of capillaries in site of the implantation of amniotic membrane, and Gorjipour et al. (109) Song et al. (101) and Roy et al. (102) had suggested this property of vascular regeneration of amniotic membrane, through the proliferation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in their analysis. Khorramirouz et al., by detecting CD34+ cells in infarcted tissue, corroborated the result of angiogenic property of amniotic membrane (111) and Danieli et



al., evaluating the relationship of the amniotic membrane with endothelial progenitor cells in vitro, detected that it has a strong impact on the formation of new vessels (108).

Moreover, in our study it was possible to evaluate the presence of cardiac regeneration in the hAM group through the quantification of Desmine and Connexin in the infarcted tissue, variables with similar outcomes also analyzed by Khorramirouz et al. (105, 111) and Tsuji et al. (53). Gorjipour et al. demonstrated potential cardiac cell proliferation with the use of amniotic membrane through the presence of cardiac Troponin T (109), and Fang et al., in order to detect the potential for cell differentiation of amniotic membrane, observed the presence of myosin heavy chain after its application in ischemic tissue (107) corroborating the results of our study.

In our study, we chose to use the acellular form of human amniotic membrane, because the absence of the epithelium can contribute to the improvement of biocompatibility of the material, reducing the immunogenic response of the host (99) without losing collagen proteins and growth factors, which are preserved during the decellularization process (10). Furthermore, the presence of connexin-43 observed in the hAM group demonstrated its ability to incorporate into the myocardium, making the use of amniotic membrane as an attractive biomaterial after AMI, as well as serving as a suitable three-dimensional support matrix for diverse cell populations, stimulating cell immigration and possible differentiation of neighboring cells (8, 124, 125, 144). To our knowledge, this is the first study to compare in the same model the use of bone marrow mononuclear stem cells and human amniotic membrane in the context of heart failure,

confirming the therapeutic potential of these agents in the recovery of heart function and reduction of pathological remodeling.

Despite this, limitations such as the animal model and the lack of follow-up in a longer period should be pointed out.

## **5. CONCLUSION**

We evaluated the effects of human acellular amniotic membrane and stem cells after myocardial infarction in rats. The results suggest the therapeutic potential of these agents, with improved ejection fraction and ventricular anti-remodeling effect, associated with a potential for angiogenesis and cardiomyocyte regeneration in a 30-day follow-up analysis.

## 9. REFERÊNCIAS

1. Mendez GF, Cowie MR. The epidemiological features of heart failure in developing countries: a review of the literature. *Int J Cardiol.* 2001;80(2-3):213-9.
2. Burchfield JS, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation.* 2013;128(4):388-400.
3. Surder D, Manka R, Lo Cicero V, Moccetti T, Rufibach K, Soncin S, et al. Intracoronary injection of bone marrow-derived mononuclear cells early or late after acute myocardial infarction: effects on global left ventricular function. *Circulation.* 2013;127(19):1968-79.
4. Grinstein J, Burkhoff D. Innovative devices for advanced heart failure: exploring the current state and future direction of device therapies. *Curr Opin Cardiol.* 2015;30(3):267-76.
5. Tseng CC, Ramjankhan FZ, de Jonge N, Chamuleau SA. Advanced Strategies for End-Stage Heart Failure: Combining Regenerative Approaches with LVAD, a New Horizon? *Front Surg.* 2015;2:10.
6. Jakus AE, Laronda MM, Rashedi AS, Robinson CM, Lee C, Jordan SW, et al. "Tissue Papers" from Organ-Specific Decellularized Extracellular Matrices. *Adv Funct Mater.* 2017;27(3).
7. Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Simeone BR, Francisco JC, Miyague N, Olandoski M. Functional outcome of bone marrow stem cells: mononuclear versus mesenchymal stem cells after cellular therapy in myocardial scar in Wistar rats. *Transplant Proc.* 2006;38(6):1953-4.
8. Wang JS, Xie HT, Zhang MC. Characterization of Ex Vivo Expanded Oral Mucosal Epithelium Cells on Acellular Porcine Corneal Stroma for Ocular Surface Reconstruction. *J Ophthalmol.* 2017;2017:6761714.
9. Satake Y, Higa K, Tsubota K, Shimazaki J. Long-term outcome of cultivated oral mucosal epithelial sheet transplantation in treatment of total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology.* 2011;118(8):1524-30.
10. 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;12(3):e1525-e30.
11. Miller LW, Missov ED. Epidemiology of heart failure. *Cardiol Clin.* 2001;19(4):547-55.
12. Cohn JN, Francis GS. Cardiac failure: a revised paradigm. *J Card Fail.* 1995;1(4):261-6.
13. Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, Klein H, Wilber DJ, Cannom DS, et al. Prophylactic implantation of a defibrillator in patients with myocardial infarction and reduced ejection fraction. *N Engl J Med.* 2002;346(12):877-83.
14. Moss AJ, Hall WJ, Cannom DS, Daubert JP, Higgins SL, Klein H, et al. Improved survival with an implanted defibrillator in patients with coronary disease at high risk for ventricular arrhythmia. Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial Investigators. *N Engl J Med.* 1996;335(26):1933-40.
15. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(3):569-82.

16. Hertz MI, Taylor DO, Trulock EP, Boucek MM, Mohacsi PJ, Edwards LB, et al. The registry of the international society for heart and lung transplantation: nineteenth official report-2002. *J Heart Lung Transplant*. 2002;21(9):950-70.
17. Miller LW, Guglin M. Patient selection for ventricular assist devices: a moving target. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(12):1209-21.
18. Lietz K, Miller LW. Will left-ventricular assist device therapy replace heart transplantation in the foreseeable future? *Curr Opin Cardiol*. 2005;20(2):132-7.
19. Bank AJ, Mir SH, Nguyen DQ, Bolman RM, 3rd, Shumway SJ, Miller LW, et al. Effects of left ventricular assist devices on outcomes in patients undergoing heart transplantation. *Ann Thorac Surg*. 2000;69(5):1369-74; discussion 75.
20. Stevenson LW, Miller LW, Desvigne-Nickens P, Ascheim DD, Parides MK, Renlund DG, et al. Left ventricular assist device as destination for patients undergoing intravenous inotropic therapy: a subset analysis from REMATCH (Randomized Evaluation of Mechanical Assistance in Treatment of Chronic Heart Failure). *Circulation*. 2004;110(8):975-81.
21. Mancini DM, Beniaminovitz A, Levin H, Catanese K, Flannery M, DiTullio M, et al. Low incidence of myocardial recovery after left ventricular assist device implantation in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 1998;98(22):2383-9.
22. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*. 1961;9:493-5.
23. Zibaitis A, Greentree D, Ma F, Marelli D, Duong M, Chiu RC. Myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Transplant Proc*. 1994;26(6):3294.
24. Atkins BZ, Lewis CW, Kraus WE, Hutcheson KA, Glower DD, Taylor DA. Intracardiac transplantation of skeletal myoblasts yields two populations of striated cells in situ. *Ann Thorac Surg*. 1999;67(1):124-9.
25. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest*. 1996;98(11):2512-23.
26. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(7):1078-83.
27. Suzuki K, Brand NJ, Allen S, Khan MA, Farrell AO, Murtuza B, et al. Overexpression of connexin 43 in skeletal myoblasts: Relevance to cell transplantation to the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;122(4):759-66.
28. Yeh ET, Zhang S, Wu HD, Korbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation*. 2003;108(17):2070-3.
29. 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;428(6983):664-8.
30. Deten A, Volz HC, Clamors S, Leiblein S, Briest W, Marx G, et al. Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart. *Cardiovasc Res*. 2005;65(1):52-63.
31. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2002:369-91.
32. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-9.
33. Hu Y, Wang QY, Ma L, Ma GJ, Jiang XY, Zhao CH. [Identification and isolation of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2002;24(1):45-9.

34. Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood*. 2004;104(12):3581-7.
35. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002;106(15):1913-8.
36. Thompson RB, van den Bos EJ, Davis BH, Morimoto Y, Craig D, Sutton BS, et al. Intracardiac transplantation of a mixed population of bone marrow cells improves both regional systolic contractility and diastolic relaxation. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(2):205-14.
37. Schuster MD, Kocher AA, Seki T, Martens TP, Xiang G, Homma S, et al. Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(2):H525-32.
38. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*. 2001;7(4):430-6.
39. Bittira B, Shum-Tim D, Al-Khalidi A, Chiu RC. Mobilization and homing of bone marrow stromal cells in myocardial infarction. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003;24(3):393-8.
40. Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD. Intracoronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet*. 2004;363(9411):783-4.
41. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005;105(10):4120-6.
42. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(7):3422-7.
43. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001;103(23):2776-9.
44. Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, Badorff C, Massoudi S, Assmus B, et al. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation*. 2003;107(16):2134-9.
45. Masuda H, Kalka C, Asahara T. Endothelial progenitor cells for regeneration. *Hum Cell*. 2000;13(4):153-60.
46. Urbich C, Knau A, Fichtlscherer S, Walter DH, Bruhl T, Potente M, et al. FOXO-dependent expression of the proapoptotic protein Bim: pivotal role for apoptosis signaling in endothelial progenitor cells. *FASEB J*. 2005;19(8):974-6.
47. Henning RJ, Abu-Ali H, Balis JU, Morgan MB, Willing AE, Sanberg PR. Human umbilical cord blood mononuclear cells for the treatment of acute myocardial infarction. *Cell Transplant*. 2004;13(7-8):729-39.
48. Ma N, Stamm C, Kaminski A, Li W, Kleine HD, Muller-Hilke B, et al. Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/scid-mice. *Cardiovasc Res*. 2005;66(1):45-54.
49. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(21):12313-8.

50. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, et al. Postnatal *Isl1*<sup>+</sup> cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*. 2005;433(7026):647-53.
51. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114(6):763-76.
52. Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature*. 2002;415(6868):240-3.
53. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(24):8692-7.
54. Oh H, Chi X, Bradfute SB, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, et al. Cardiac muscle plasticity in adult and embryo by heart-derived progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1015:182-9.
55. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002;106(24):3009-17.
56. 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;364(9429):141-8.
57. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation*. 2006;113(10):1287-94.
58. 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;355(12):1199-209.
59. Schachinger V, Assmus B, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells abrogates adverse left ventricular remodelling post-acute myocardial infarction: insights from the reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodelling in acute myocardial infarction (REPAIR-AMI) trial. *Eur J Heart Fail*. 2009;11(10):973-9.
60. Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(8):1690-9.
61. Assmus B, Tonn T, Seeger FH, Yoon CH, Leistner D, Klotsche J, et al. Red blood cell contamination of the final cell product impairs the efficacy of autologous bone marrow mononuclear cell therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(13):1385-94.
62. Tendera M, Wojakowski W, Ruzyllo W, Chojnowska L, Kepka C, Tracz W, et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial. *Eur Heart J*. 2009;30(11):1313-21.
63. Gyongyosi M, Lang I, Dettke M, Beran G, Graf S, Sochor H, et al. Combined delivery approach of bone marrow mononuclear stem cells early and late after myocardial infarction: the MYSTAR prospective, randomized study. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2009;6(1):70-81.

64. Traverse JH, McKenna DH, Harvey K, Jorgenso BC, Olson RE, Bostrom N, et al. Results of a phase 1, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of bone marrow mononuclear stem cell administration in patients following ST-elevation myocardial infarction. *Am Heart J.* 2010;160(3):428-34.
65. Traverse JH, Henry TD, Vaughan DE, Ellis SG, Pepine CJ, Willerson JT, et al. LateTIME: a phase-II, randomized, double-blinded, placebo-controlled, pilot trial evaluating the safety and effect of administration of bone marrow mononuclear cells 2 to 3 weeks after acute myocardial infarction. *Tex Heart Inst J.* 2010;37(4):412-20.
66. Traverse JH, Henry TD, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, Ellis SG, et al. Effect of the use and timing of bone marrow mononuclear cell delivery on left ventricular function after acute myocardial infarction: the TIME randomized trial. *JAMA.* 2012;308(22):2380-9.
67. Traverse JH, Henry TD, Ellis SG, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, et al. Effect of intracoronary delivery of autologous bone marrow mononuclear cells 2 to 3 weeks following acute myocardial infarction on left ventricular function: the LateTIME randomized trial. *JAMA.* 2011;306(19):2110-9.
68. Siu CW, Tse HF. Cardiac regeneration: messages from CADUCEUS. *Lancet.* 2012;379(9819):870-1.
69. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet.* 2012;379(9819):895-904.
70. Perin EC, Sanz-Ruiz R, Sanchez PL, Lasso J, Perez-Cano R, Alonso-Farto JC, et al. Adipose-derived regenerative cells in patients with ischemic cardiomyopathy: The PRECISE Trial. *Am Heart J.* 2014;168(1):88-95 e2.
71. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Silva GV, et al. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation.* 2004;110(11 Suppl 1):II213-8.
72. Assmus B, Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger FH, Fichtlscherer S, Tonn T, et al. Transcoronary transplantation of functionally competent BMCs is associated with a decrease in natriuretic peptide serum levels and improved survival of patients with chronic postinfarction heart failure: results of the TOPCARE-CHD Registry. *Circ Res.* 2007;100(8):1234-41.
73. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA.* 2012;308(22):2369-79.
74. Strauer BE, Yousef M, Schannwell CM. The acute and long-term effects of intracoronary Stem cell Transplantation in 191 patients with chronic heart failure: the STAR-heart study. *Eur J Heart Fail.* 2010;12(7):721-9.
75. Yacoub MH, Terrovitis J. CADUCEUS, SCIPIO, ALCADIA: Cell therapy trials using cardiac-derived cells for patients with post myocardial infarction LV dysfunction, still evolving. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2013;2013(1):5-8.
76. The Lancet E. Retraction-Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet.* 2019;393(10176):1084.
77. Heusch G. SCIPIO brings new momentum to cardiac cell therapy. *Lancet.* 2011;378(9806):1827-8.

78. Chugh AR, Beache GM, Loughran JH, Mewton N, Elmore JB, Kajstura J, et al. Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance. *Circulation*. 2012;126(11 Suppl 1):S54-64.
79. Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2011;378(9806):1847-57.
80. Menasche 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.
81. 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;367(9505):113-21.
82. Templin C, Kotlarz D, Marquart F, Faulhaber J, Brendecke V, Schaefer A, et al. Transcoronary delivery of bone marrow cells to the infarcted murine myocardium: feasibility, cellular kinetics, and improvement in cardiac function. *Basic Res Cardiol*. 2006;101(4):301-10.
83. 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;111(17):2198-202.
84. Blocklet D, Toungouz M, Berkenboom G, Lambermont M, Unger P, Preumont N, et al. Myocardial homing of nonmobilized peripheral-blood CD34+ cells after intracoronary injection. *Stem Cells*. 2006;24(2):333-6.
85. Hou D, Youssef EA, Brinton TJ, Zhang P, Rogers P, Price ET, et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation*. 2005;112(9 Suppl):I150-6.
86. Passier R, Mummery C. Cardiomyocyte differentiation from embryonic and adult stem cells. *Curr Opin Biotechnol*. 2005;16(5):498-502.
87. Smart N, Riley PR. The stem cell movement. *Circ Res*. 2008;102(10):1155-68.
88. Pijnappels DA, Gregoire S, Wu SM. The integrative aspects of cardiac physiology and their implications for cell-based therapy. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1188:7-14.
89. Afzal MR, Samanta A, Shah ZI, Jeevanantham V, Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK, et al. Adult Bone Marrow Cell Therapy for Ischemic Heart Disease: Evidence and Insights From Randomized Controlled Trials. *Circ Res*. 2015;117(6):558-75.
90. Lecour S, Botker HE, Condorelli G, Davidson SM, Garcia-Dorado D, Engel FB, et al. ESC working group cellular biology of the heart: position paper: improving the preclinical assessment of novel cardioprotective therapies. *Cardiovasc Res*. 2014;104(3):399-411.
91. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2008;15:88-99.
92. Navas A, Magana-Guerrero FS, Dominguez-Lopez A, Chavez-Garcia C, Partido G, Graue-Hernandez EO, et al. Anti-Inflammatory and Anti-Fibrotic Effects of Human Amniotic Membrane Mesenchymal Stem Cells and Their Potential in Corneal Repair. *Stem Cells Transl Med*. 2018;7(12):906-17.
93. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. 2005;23(10):1549-59.



94. Miki T. Stem cell characteristics and the therapeutic potential of amniotic epithelial cells. *Am J Reprod Immunol*. 2018;80(4):e13003.
95. Hashim SNM, Yusof MFH, Zahari W, Noordin K, Kannan TP, Hamid SSA, et al. Angiogenic potential of extracellular matrix of human amniotic membrane. *Tissue Eng Regen Med*. 2016;13(3):211-7.
96. Hariya T, Tanaka Y, Yokokura S, Nakazawa T. Transparent, resilient human amniotic membrane laminates for corneal transplantation. *Biomaterials*. 2016;101:76-85.
97. Despeyroux A, Duret C, Gondeau C, Perez-Gracia E, Chuttoo L, de Boussac H, et al. Mesenchymal stem cells seeded on a human amniotic membrane improve liver regeneration and mouse survival after extended hepatectomy. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(4):1062-73.
98. Ben M'Barek K, Habeler W, Plancheron A, Jarraya M, Regent F, Terray A, et al. Human ESC-derived retinal epithelial cell sheets potentiate rescue of photoreceptor cell loss in rats with retinal degeneration. *Sci Transl Med*. 2017;9(421).
99. Machado-Junior PAB, Blume GG, Francisco JC, Guarita-Souza LC. Cell-Based Therapies for Myocardial Regeneration in Heart Failure: 20 Years of Debate. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2020;35(4):VIII-XI.
100. 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;106(10):1613-23.
101. 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;24(10):2055-64.
102. Roy R, Kukucka M, Messroghli D, Kunkel D, Brodarac A, Klose K, et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Enhances the Cardioprotective Capacity of Human Amniotic Epithelial Cells. *Cell Transplant*. 2015;24(6):985-1002.
103. 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;200(2):409-19.
104. 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;168(2):1062-9.
105. 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):113-26.
106. 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;9(2):e1900544.
107. 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.
108. 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;4(5):448-58.
109. Gorjipour F, Hosseini-Gohari L, Alizadeh Ghavidel A, Hajimiresmaiel 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;11(1):35-42.

110. 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.
111. Khorramirouz R, Go JL, Noble C, Morse D, Lerman A, Young MD. In Vivo Response of Acellular Porcine Pericardial for Tissue Engineered Transcatheter Aortic Valves. *Sci Rep*. 2019;9(1):1094.
112. Miller AL, Richardson CA. Rodent analgesia. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*. 2011;14(1):81-92.
113. Flecknell P. Rodent analgesia: Assessment and therapeutics. *Vet J*. 2018;232:70-7.
114. 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. *Circulation*. 2017;135(10):e146-e603.
115. Anderson JL, Morrow DA. Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2017;376(21):2053-64.
116. Xie M, Burchfield JS, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: therapies: part 2 of 2. *Circulation*. 2013;128(9):1021-30.
117. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81(4):1161-72.
118. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SA, Zornoff LA. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol*. 2016;106(1):62-9.
119. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129(3):e28-e292.
120. Albuquerque DC, Neto JD, Bacal F, Rohde LE, Bernardez-Pereira S, Berwanger O, et al. I Brazilian Registry of Heart Failure - Clinical Aspects, Care Quality and Hospitalization Outcomes. *Arq Bras Cardiol*. 2015;104(6):433-42.
121. Guarita-Souza LC, Francisco JC, Simeoni R, Faria-Neto JR, de Carvalho KA. Benefit of stem cells and skeletal myoblast cells in dilated cardiomyopathies. *World J Cardiol*. 2011;3(3):93-7.
122. Cargnoni A, Di Marcello M, Campagnol M, Nassuato C, Albertini A, Parolini O. Amniotic membrane patching promotes ischemic rat heart repair. *Cell Transplant*. 2009;18(10):1147-59.
123. Blume GG, Machado-Junior PAB, Paludo Bertinato G, Simeoni RB, Francisco JC, Guarita-Souza LC. Tissue-engineered amniotic membrane in the treatment of myocardial infarction: a systematic review of experimental studies. *Am J Cardiovasc Dis*. 2021;11(1):1-11.
124. Wang J, Peng L, Lu GX. [Stem cell characteristics and islet differentiation potential of human amniotic epithelial cells]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2011;31(9):1484-7.
125. Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials*. 2010;31(2):216-25.
126. Carvalho KA, Guarita-Souza LC, Hansen P, Rebelatto CL, 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;38(5):1596-602.

127. Hopper RA, Woodhouse K, Semple JL. Acellularization of human placenta with preservation of the basement membrane: a potential matrix for tissue engineering. *Ann Plast Surg.* 2003;51(6):598-602.
128. Tanai E, Frantz S. Pathophysiology of Heart Failure. *Compr Physiol.* 2015;6(1):187-214.
129. 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;119(1):95-104.
130. Guarita-Souza LC, Carvalho KA, 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;114(1 Suppl):I120-4.
131. Mills JS, Rao SV. REPAIR-AMI: stem cells for acute myocardial infarction. *Future Cardiol.* 2007;3(2):137-40.
132. Hirsch A, Nijveldt R, van der Vleuten PA, Biemond BJ, Doevendans PA, van Rossum AC, et al. Intracoronary infusion of autologous mononuclear bone marrow cells or peripheral mononuclear blood cells after primary percutaneous coronary intervention: rationale and design of the HEBE trial--a prospective, multicenter, randomized trial. *Am Heart J.* 2006;152(3):434-41.
133. Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, Furuta M, et al. Cell transplantation: differential effects of myoblasts and mesenchymal stem cells. *Int J Cardiol.* 2006;111(3):423-9.
134. Souza LC, Carvalho KA, Rebelatto C, Senegaglia A, Furuta M, Miyague N, et al. Combined transplantation of skeletal myoblasts and mesenchymal cells (cocultivation) in ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol.* 2004;83(4):294-9; 88-93.
135. Duelen R, Sampaolesi M. Stem Cell Technology in Cardiac Regeneration: A Pluripotent Stem Cell Promise. *EBioMedicine.* 2017;16:30-40.
136. Sheng CC, Zhou L, Hao J. Current stem cell delivery methods for myocardial repair. *Biomed Res Int.* 2013;2013:547902.
137. Nakamuta JS, Danoviz ME, Marques FL, dos Santos L, Becker C, Goncalves GA, et al. Cell therapy attenuates cardiac dysfunction post myocardial infarction: effect of timing, routes of injection and a fibrin scaffold. *PLoS One.* 2009;4(6):e6005.
138. Muller-Ehmsen J, Whittaker P, Kloner RA, Dow JS, Sakoda T, Long TI, et al. Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(2):107-16.
139. Yang Y, Ma Y, Han W, Li J, Xiang Y, Liu F, et al. Age-related differences in postinfarct left ventricular rupture and remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294(4):H1815-22.
140. Jugdutt BI. Left ventricular rupture threshold during the healing phase after myocardial infarction in the dog. *Can J Physiol Pharmacol.* 1987;65(3):307-16.
141. Soufen HN, Salemi VM, Aneas IM, Ramires FJ, Benicio AM, Benvenuti LA, et al. Collagen content, but not the ratios of collagen type III/I mRNAs, differs among hypertensive, alcoholic, and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Braz J Med Biol Res.* 2008;41(12):1098-104.
142. 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 Postinfarct Rat Model. *Tissue Eng Part A.* 2020;26(21-22):1128-37.

143. Francisco JC, Correa Cunha R, Cardoso MA, Baggio Simeoni R, Mogharbel BF, Picharski GL, et al. Decellularized Amniotic Membrane Scaffold as a Pericardial Substitute: An In Vivo Study. *Transplant Proc.* 2016;48(8):2845-9.
144. Mamede AC, Carvalho MJ, Abrantes AM, Laranjo M, Maia CJ, Botelho MF. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell Tissue Res.* 2012;349(2):447-58.

## 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 AMNÍOTICA 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, Laécio 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	Rattus norvegicus	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 (R)	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 à 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 Rocha

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



Article

## Bone-Marrow Stem Cells and Acellular Human Amniotic Membrane in a Rat Model of Heart Failure

Gustavo Gavazzoni Blume <sup>1,\*</sup>, Paulo André Bispo Machado-Junior <sup>1</sup>, Rossana Baggio Simeoni <sup>1</sup>, Giovana Paludo Bertinato <sup>1</sup>, Murilo Sgarbossa Toniai <sup>1</sup>, Seigo Nagashima <sup>1</sup>, Ricardo Aurino Pinho <sup>2</sup>, Lucia de Noronha <sup>1</sup>, Marcia Olandoski <sup>1</sup>, Katherine Athayde Teixeira de Carvalho <sup>3</sup>, Julio Cesar Francisco <sup>3</sup> and Luiz Cesar Guarita-Souza <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Experimental Laboratory of Institute of Biological and Health Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba 80215-901, Brazil; machadojrpb@gmail.com (P.A.B.M.-J.); rossanabaggio@gmail.com (R.B.S.); gigitbertinato@gmail.com (G.P.B.); murilotoniai@gmail.com (M.S.T.); seigocap@gmail.com (S.N.); lnno.noronha@gmail.com (L.d.N.); bio.estadistica@pucpr.br (M.O.); guaritasouza@hotmail.com (L.C.G.-S.)
- <sup>2</sup> Laboratory of Exercise Biochemistry in Health, Graduate Program in Health Sciences, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba 80215-901, Brazil; rapinho12@gmail.com
- <sup>3</sup> Advanced Therapy and Cellular Biotechnology in Regenerative Medicine Department, The Pelé Pequeno Príncipe Institute, Child and Adolescent Health Research & Pequeno Príncipe Faculties, Curitiba 80215-901, Brazil; katherinecarvalho@gmail.com (K.A.T.d.C.); julio.apfr@gmail.com (J.C.F.)
- \* Correspondence: gustavoblume@gmail.com; Tel.: +55-41-99818-5969



**Citation:** Blume, G.G.; Machado-Junior, P.A.B.; Simeoni, R.B.; Bertinato, G.P.; Toniai, M.S.; Nagashima, S.; Pinho, R.A.; de Noronha, L.; Olandoski, M.; de Carvalho, K.A.T.; et al. Bone-Marrow Stem Cells and Acellular Human Amniotic Membrane in a Rat Model of Heart Failure. *Life* **2021**, *11*, 958. <https://doi.org/10.3390/life11090958>

Academic Editor: Friedrich Jung

Received: 16 August 2021  
Accepted: 9 September 2021  
Published: 13 September 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Myocardial infarction (MI) remains the leading cause of cardiovascular death worldwide and a major cause of heart failure. Recent studies have suggested that cell-based therapies with bone marrow stem cells (BMSC) and human amniotic membrane (hAM) would recover the ventricular function after MI; however, the mechanisms underlying these effects are still controversial. Herein, we aimed to compare the effects of BMSC and hAM in a rat model of heart failure. MI was induced through coronary occlusion, and animals with an ejection fraction (EF) < 50% were included and randomized into three groups: control, BMSC, and hAM. The BMSC and hAM groups were implanted on the anterior ventricular wall seven days after MI, and a new echocardiographic analysis was performed on the 30th day, followed by euthanasia. The echocardiographic results after 30 days showed significant improvements on EF and left-ventricular end-systolic and end-diastolic volumes in both BMSC and hAM groups, without significant benefits in the control group. New blood vessels, desmine-positive cells and connexin-43 expression were also elevated in both BMSC and hAM groups. These results suggest a recovery of global cardiac function with the therapeutic use of both BMSC and hAM, associated with angiogenesis and cardiomyocyte regeneration after 30 days.

**Keywords:** myocardial infarction; tissue regeneration; stem cells; human amniotic membrane

### 1. Introduction

Acute myocardial infarction (AMI) is the most common cause of death globally, accounting for 32% of deaths worldwide in 2013 [1]. The majority of the events are related to a fissure and consequent rupture of atherosclerotic plaque, with consequent thrombus formation and obstruction of the coronary artery [2].

In patients who survive, significant modifications occur in the electrical, biochemical, and structural architecture of the ventricular wall, mainly related to the action of pro-inflammatory cytokines, macrophages, and neutrophils in the infarct area [3,4]. The cellular hypoxia leads to oxidative stress and formation of free radicals, which are able to damage crucial proteins necessary for myocardial excitation and contraction, such as ion channels and calcium pumps, with consequent loss of contractile function, resulting in cardiac remodeling and ventricular dysfunction [3,5,6].

Am J Cardiovasc Dis 2021;11(1):1-11  
[www.AJCD.us](http://www.AJCD.us) /ISSN:2160-200X/AJCD0127507

## Review Article

# Tissue-engineered amniotic membrane in the treatment of myocardial infarction: a systematic review of experimental studies

Gustavo Gavazzoni Blume, Paulo André Bispo Machado-Júnior, Giovana Paludo Bertinato, Rossana Baggio Simeoni, Julio César Francisco, Luiz César Guarita-Souza

Division of Cardiovascular Diseases, School of Medicine, Catholic University, Curitiba, Paraná, Brazil

Received December 2, 2020; Accepted January 25, 2021; Epub February 15, 2021; Published February 28, 2021

**Abstract:** Objective: myocardial infarction (MI) remains the leading cause of death worldwide. Cell-based therapies have become potential therapeutic approaches, attempting to recover the contractility of necrotic cardiomyocytes. In the present study, we aimed to systematically evaluate experimental studies on the use of tissue-engineered amniotic membrane (hAMC) in MI treatment. Methods: a systematic review of literature published in PubMed, Embase and CENTRAL databases was conducted, until March 31, 2020, for experimental studies reporting on hAMC cell-therapy performed on LV function, MI size, paracrine effects, angiogenesis, and cell differentiation. Two reviewers selected the articles that met the inclusion criteria and disagreements were solved through a consensus. Results: a total of 11 studies were included for data extraction. For the acute scenario, therapeutic use of hAMC after MI was capable of improving LV function in rats, mainly due to its paracrine effects (anti-apoptotic and anti-inflammatory) and associated with cardiomyocyte differentiation, MI size reduction and neo-angiogenesis. Conclusion: tissue engineered hAMC following MI provided clinically relevant benefits on cardiac function and ventricular remodeling.

**Keywords:** Myocardial infarction, tissue regeneration, human amniotic membrane, stem cells, heart function

## Introduction

Myocardial infarction (MI) and heart failure (HF) are the leading cause of death worldwide [1-3]. Current therapeutic strategies are aimed at preventing progression of left ventricular (LV) pathological remodeling after MI, with little evidence of improvement in cardiac regeneration and ventricular function [4, 5].

As an alternative, tissue engineering using human amniotic membrane (hAMC) started to be extensively used in regenerative medicine, with the aim of regenerating the injured tissue. The main hypothesis for its use is that it could serve as a possible scaffold for stem cells proliferation and differentiation, with an added potential of anti-inflammatory, antifibrotic and pro-angiogenic effects [6-13].

Previous studies have investigated the potential use of hAMC after myocardial ischemia, evaluating its consequences in global cardiac

function. Despite this, the exact mechanisms underlying this association and its capacity to improve cardiac function and reduce LV remodeling are still controversial. This study set out to systematically review experimental studies appraising the impact of hAMC in the post-infarcted heart.

## Materials and methods

### Information sources

We searched for experimental studies that aimed to evaluate the use of hAMC in the treatment of MI. Electronic searches were conducted, without language restrictions, through PubMed, Embase, and The Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL), from September 1, 2019 until March 31, 2020. Combinations of words related to "human amniotic membrane" and "amniotic fluid" were included as search terms in all databases with each of the following words: "myocardial infar-



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

Paulo André Bispo Machado-Júnior<sup>1</sup>; Gustavo Gavazzoni Blume<sup>1</sup>, MD; Julio César Francisco<sup>2</sup>, PhD; Luiz César Guarita-Souza<sup>1</sup>, MD, PhD

DOI: 10.21470/1678-9741-2020-0562

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 Christiana 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<sup>1</sup>.

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<sup>2</sup>.

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.<sup>3</sup> 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<sup>4</sup>.

Other studies evaluated the association of skeletal myoblasts and adult SC (cell coculture), based on the hypothesis that adult SC could stimulate neovascularization 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

<sup>1</sup>Post-Graduation program in Health Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR, Brazil.  
<sup>2</sup>Universidade Positivo (UP), Curitiba, PR, Brazil.

Correspondence Address:  
**Luiz César Guarita-Souza**  
https://orcid.org/0000-0003-2781-9725  
E-mail: cesar.souza@pucpr.br