

Mioblasto Esquelético: um justo abandono?

Skeletal Myoblast: fair abandonment?

Cristiano Freitas de Souza, Cláudia Maria Rodrigues Alves, Antonio Carlos de Camargo Carvalho

Resumo

A doença isquêmica do miocárdio é causa crescente de insuficiência cardíaca e considerada, há muito, situação irreversível devido ao fato de que os cardiomiócitos adultos são células terminalmente diferenciadas e sem capacidade proliferativa. Para a reversão da insuficiência cardíaca, seria necessário reposição dos miócitos danificados e restauração do fluxo sanguíneo. Nos últimos anos, especial atenção tem sido dada à capacidade potencial da terapia celular em reparar o miocárdio injuriado devido à sua habilidade de diferenciação *in vitro* em cardiomiócitos e células endoteliais. As células-tronco são células indiferenciadas, capazes de autorrenovação, proliferação e diferenciação em múltiplas linhagens. O objetivo final de sua utilização é a regeneração tecidual. As células-tronco hematopoiéticas foram as primeiras a serem identificadas como potencial fonte celular. Em seguida, diversos outros tipos celulares foram reconhecidos, assim como as células progenitoras parcialmente diferenciadas capazes de proliferação e diferenciação em múltiplas linhagens. O objetivo deste artigo é descrever em detalhes os mioblastos esqueléticos, células que surgiram nos anos 90 como potencial fonte celular para a regeneração cardíaca, mas que, com os resultados dos primeiros estudos, mostraram limitações proibitivas ao seu uso mais extenso, principalmente relacionadas a questões de segurança.

Palavras-chave: Transplante de células; Mioblastos esqueléticos/transplante; Infarto do miocárdio; Insuficiência cardíaca; Regeneração tecidual dirigida

Abstract

Myocardial ischemia is an increasingly frequent cause of heart failure and has long been considered irreversible, as adult cardiomyocytes are terminally differentiated cells with no proliferative capacity. In order to reverse heart failure, damaged myocytes would have to be replaced and blood flow restored. In recent years, special attention has been paid to the potential ability of cell therapy to repair an injured myocardium, due to the *in vitro* ability to distinguish between the develop of cardiomyocytes and endothelial cells. Stem cells are undifferentiated cells capable of self-renewal, proliferation and differentiation into multiple lineages. The ultimate goal of their use is tissue regeneration. Hematopoietic stem cells were the first to be identified as a potential cell source, followed by several other cell types, as well as partially differentiated progenitor cells capable of proliferation and differentiation into multiple lineages. This paper offers a detailed description of skeletal myoblasts - cells that were viewed during the 1990s as a potential cell source for cardiac regeneration but which were subject to prohibitive constraints on more extensive use, shown through the findings of early studies and related mainly to security issues.

Keywords: Cell transplantation; Myoblasts, skeletal;/transplantation; Myocardial infarction; Heart failure; Guided tissue regeneration

Departamento de Cardiologia Intervencionista - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM) - São Paulo, SP- Brasil

Correspondência: Cristiano Freitas de Souza | Departamento de Cardiologia Intervencionista - Universidade Federal de São Paulo
Rua Napoleão de Barros, 715 térreo - 04024-002 - São Paulo, SP - Brasil

E-mail: crissouza80@hotmail.com

Recebido em: 11/02/2011 | Aceito em: 29/04/2011

Introdução

As células satélites foram inicialmente descritas em 1961 como as células precursoras residentes no músculo esquelético¹. A função básica dessas células é a restauração da função do músculo esquelético em casos de injúria. Elas servem como reserva de células mononucleares musculares precursoras em estado quiescente. Após ativação, podem proliferar e diferenciar em novas fibras musculares.

Os mioblastos são precursores das células satélites, obtidos através de biópsia do músculo esquelético, seguido de cultura *in vitro*. Estas são células de pequenas dimensões, mononucleares, localizadas entre a lâmina basal e o sarcolema na periferia da fibra muscular esquelética madura. Eles permanecem ali em estado quiescente e, em caso de lesão muscular, são rapidamente mobilizados, proliferam e se fundem com as células lesadas a fim de atuar no reparo do tecido muscular.

Os mioblastos são obtidos após a realização de biópsia muscular, geralmente do músculo gastrocnêmio, sendo retirados cerca de 0,5-5g de fragmento. Após a biópsia, a matriz extracelular é digerida e as células lavadas e processadas. Posteriormente, elas são encubadas e cultivadas em meio específico, dando origem a aproximadamente um bilhão de células após 2-3 semanas de cultivo².

A Grande Expectativa Inicial

Inicialmente utilizadas no tratamento da distrofia muscular, os mioblastos foram testados na cardiologia por Marelli et al.³, em 1992, em modelo de crioinjúria em cães. Os resultados animadores permitiram o desenvolvimento de estudos pré-clínicos e clínicos com o objetivo de comprovar os benefícios atingidos.

Quando comparados com os outros tipos celulares utilizados no tratamento de doenças cardiovasculares, os mioblastos apresentam algumas características que os colocam como potencial fonte de substrato para a terapia celular no futuro. As principais são⁴:

- apresentam uma origem autóloga: isto evita que ocorram problemas relacionados a questões éticas, disponibilidade e imunogenicidade;
- são células facilmente multiplicadas quando em cultura, permitindo que milhões de células sejam produzidas a partir de um pequeno fragmento muscular;
- encontram-se em um estado avançado de diferenciação. Ao mesmo tempo em que isto representa vantagem (já que não há a possibilidade

da formação de tumores secundários ao processo de diferenciação), também representa desvantagem, uma vez que essas células não conseguem se diferenciar em cardiomiócitos;

- possuem grande resistência à isquemia, o que é crucial para a sua utilização, já que eles são injetados em áreas de cicatriz pós-infarto, ou seja, áreas de pouco suprimento vascular.

Mecanismo de Ação

Os mecanismos pelos quais os mioblastos atuam melhorando a performance miocárdica não estão totalmente elucidados. Ainda que, após sua injeção e adesão aos miócitos, estas células apresentem propriedades contráteis, a pequena quantidade de mioblastos que sobrevive após o transplante, associada à falta de conexões eletromecânicas com os cardiomiócitos do hospedeiro, torna improvável a ocorrência de uma contração sincronizada entre as células doadas e as do hospedeiro⁵. Por esse motivo, é sabido que os mioblastos não atuam diretamente na melhora da função sistólica global do ventrículo esquerdo.

Um mecanismo proposto para a ação dos mioblastos seria a limitação mecânica ao remodelamento do ventrículo esquerdo (VE) provocado por um efeito de contraforça causado pelas células transplantadas, que resultaria em maior elasticidade da parede infartada. A consequência da atenuação do remodelamento seria a redução no estresse sobre o miocárdio. Isto contribui para a restauração dos sinais aos mecanotransdutores de superfície a níveis próximos do normal, melhorando, assim, a função cardíaca⁶.

Outro possível mecanismo de ação seria a liberação de citocinas e fatores de crescimento por essas células, resultando em um efeito parácrino. Ainda que esse efeito seja mais pronunciado após o uso de células-tronco mesenquimais, estudos recentes obtiveram sucesso em demonstrar que os mioblastos eram capazes de liberar fatores que estimulariam a angiogênese e favoreceriam a sobrevivência dos cardiomiócitos. Além disso, há evidências que suportam a hipótese de que os mioblastos liberam fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor* – VEGF)⁷ e reduzem a expressão das metaloproteinases da matriz (*matrix metalloproteinases* – MMP) 2 e 9⁸. O *down-regulation* das MMP resulta em redução da fibrose, já que os seus produtos de degradação representam importante estímulo à síntese de colágeno, e o transplante dos mioblastos está justamente associado à redução da fibrose pós-infarto^{9,10}.

Estudos Pré-clínicos

Diversos estudos experimentais foram conduzidos, tanto em animais de pequeno quanto de grande porte, a fim de demonstrar que a injeção de mioblastos em áreas de miocárdio isquêmico poderia resultar em melhora da contratilidade do ventrículo esquerdo e limitação do processo de remodelamento ventricular¹¹.

O primeiro estudo publicado¹² utilizou um modelo de cães com isquemia crônica, provocada por repetidas microembolizações coronarianas. Após a injeção de 2.7×10^8 a 8.3×10^8 células e um seguimento de 10 semanas, os pesquisadores demonstraram, através de ecocardiograma, significativa melhora na relação pressão sistólica final x volume sistólico final. Em coelhos submetidos à crioinjúria e avaliados por ressonância nuclear magnética após injeção de 2×10^8 células¹³, pesquisadores também puderam demonstrar melhorias no espessamento regional da parede do VE (porém sem diferenças na fração de ejeção global) e uma atenuação no processo de remodelamento. Esse efeito benéfico no remodelamento pode ser demonstrado em um modelo de isquemia crônica em ovelhas após a injeção de 3×10^8 células⁶. O grupo tratado, seis semanas após o transplante, apresentou atenuação do processo de remodelamento que foi diretamente relacionado à sobrevivência dos mioblastos.

Em estudo recente¹⁴, compararam-se os métodos de injeção por via intramiocárdica e por via percutânea em modelo animal de doença arterial coronariana crônica. Em 10 modelos animais (*mini-pigs*) foi realizada injeção de mioblastos autólogos percutânea através do sistema NOGA[®] ou por via cirúrgica. Após avaliação por ressonância nuclear magnética, em seis meses de seguimento, foi observada melhora na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) (15,8-28,4%; $p=0,03$), não havendo diferença quanto à via de administração das células¹⁴.

Uma questão discutida recentemente foi a possibilidade de que múltiplas injeções de mioblastos autólogos pudessem resultar em melhores resultados a longo prazo quando comparado com injeção única. Em estudo com 20 modelos de porco foi comparado o esquema com uma, duas ou três injeções, além de um grupo-controle. Após o seguimento de sete meses, constatou-se que o grupo transplantado com mioblasto autólogo apresentava melhora importante na função ventricular esquerda e que o grupo que recebeu três injeções evoluiu com melhora significativa quando comparado com o grupo transplantado com apenas uma injeção¹⁵.

Esses dados, quando analisados em conjunto, demonstraram que o efeito primário dos mioblastos é reduzir o remodelamento do VE. Entretanto, esses mesmos dados revelaram que a ação dos mioblastos sobre a função sistólica global é menos consistente e de menor representatividade, evidenciando assim a escassez de benefícios clínicos com seu uso.

Estudos clínicos

Apesar da demonstração de poucos benefícios nos estudos pré-clínicos, os mioblastos foram utilizados em estudos clínicos. O primeiro estudo realizado¹⁶, em junho 2000, incluiu 10 pacientes com isquemia crônica que preenchiam os seguintes critérios: disfunção grave de VE (fração de ejeção <35%), história prévia de infarto agudo do miocárdio (IAM) com fibrose e ausência de viabilidade (documentada por ecocardiograma com dobutamina) e indicação de *bypass* cirúrgico em áreas que não seriam transplantadas. Após seguimento de 52 meses (18-58 meses), os pacientes apresentaram melhora sintomática, com baixa incidência de hospitalização por insuficiência cardíaca (0,13 pacientes/ano). A fração de ejeção, avaliada pelo ecocardiograma, aumentou de $24,3 \pm 4\%$ para $31 \pm 4,1\%$ ($p=0,001$). Esse mesmo estudo, por ser o primeiro estudo clínico com mioblastos, demonstrou o potencial arritmogênico dessas células. Dos 10 pacientes transplantados, 5 apresentaram episódios recorrentes de taquicardia ventricular e necessitaram de um cardiodesfibrilador implantável (CDI).

Outros estudos¹⁷⁻²⁰ realizados posteriormente também obtiveram sucesso em demonstrar benefícios clínicos dos mioblastos, porém o potencial arritmogênico era constante no relato dos eventos adversos.

Em estudo conduzido por Gavira et al.¹⁷, 12 pacientes receberam, em média, 221 milhões de mioblastos e após um ano, eles apresentaram significativa melhora na fração de ejeção (de $35,5 \pm 2,3\%$ para $55,1 \pm 8,2\%$, $p<0,01$) e importante melhora na contratilidade regional do VE (redução do índice de mobilidade da parede induzido por estresse de $3,02 \pm 0,17$ para $1,36 \pm 0,14$, $p<0,0001$). O PET Scan também revelou melhoras na viabilidade e perfusão dos segmentos miocárdicos transplantados. Além disso, é importante ressaltar que, diferentemente dos estudos anteriores, nesses 12 pacientes, os pesquisadores não detectaram a ocorrência de qualquer tipo de arritmia.

Além dos estudos baseados na injeção intramiocárdica, três estudos clínicos contemplaram a injeção por cateter. Um deles utilizou a injeção através do seio coronariano em 10 pacientes, sendo bem-sucedido em demonstrar a segurança e confiabilidade do dispositivo

utilizado (foi adotado um cateter que continha uma agulha expansível em sua ponta utilizada para perfurar a parede venosa e através do qual era ultrapassado um microcateter responsável pela injeção das células na área-alvo)¹⁸. Os outros dois estudos^{19,20} utilizaram a injeção guiada por um sistema de mapeamento eletromecânico e também conseguiram demonstrar benefícios com a terapia celular.

Magic Trial

Após a realização dos estudos clínicos citados, ficou clara a necessidade da melhor documentação dos benefícios clínicos dos mioblastos e dos riscos associados. Foi então desenhado o estudo MAGIC (*Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy*)²¹, que incluiu pacientes com os mesmos critérios de inclusão daqueles anteriormente estudados, a saber: (1) idade entre 18-80 anos; (2) indicação de revascularização miocárdica cirúrgica; (3) disfunção sistólica do VE definida por uma fração de ejeção entre 15-35% pelo ecocardiograma; (4) história prévia de IAM pelo menos quatro semanas antes do *screening* com acinesia residual afetando dois segmentos contíguos do VE sem viabilidade após estímulo com baixa dose de dobutamina; e (5) insuficiência cardíaca congestiva classes I-III em vigência de terapia medicamentosa otimizada, incluindo IECA e betabloqueadores. Nesse estudo, foram incluídos 97 pacientes, submetidos à biopsia muscular e randomizados da seguinte maneira: 33 receberam 400 milhões de células, 34 receberam 800 milhões e 30 receberam placebo.

Os desfechos primários do estudo baseavam-se em segurança (ocorrência de eventos adversos cardíacos e arritmias ventriculares nos primeiros seis meses) e eficácia (melhora na função global e segmentar do VE avaliada pelo ecocardiograma). Todos os pacientes incluídos receberam o implante de um CDI, tanto por razões de segurança como para melhor documentação da ocorrência de arritmia. Após o seguimento de seis meses, foi possível demonstrar a segurança do uso dos mioblastos, uma vez que o grupo tratado não apresentou incidência de eventos adversos e/ou arritmias maior do que o grupo-controle. Entretanto, não foi possível demonstrar qualquer benefício em relação à eficácia dos mioblastos já que os pacientes tratados não apresentaram melhores resultados do que aqueles do grupo-controle. A mudança absoluta da fração de ejeção entre os valores basais e aqueles obtidos após seis meses foi 4,4%, 3,4% e 5,2% no grupo-placebo, no de baixa dose e no de alta dose, respectivamente (p=0,95).

Mioblastos e o Potencial Arritmogênico

Uma das desvantagens dos mioblastos em relação aos outros tipos celulares utilizados em cardiologia é que essas células são diferentes eletromecanicamente dos cardiomiócitos²². Na arquitetura do miocárdio, os cardiomiócitos se encontram interligados através de junções celulares denominadas discos intercalares. Essas estruturas, juntamente com as proteínas de adesão conexina-43 e N-caderina são as responsáveis pela ligação elétrica e mecânica dos cardiomiócitos²³. Não se deve esperar, entretanto, que os mioblastos transplantados sejam capazes de desenvolver os discos intercalares com as células do hospedeiro, pois ainda que essas células possuam tal capacidade, sofrem um *down-regulation* durante o processo de diferenciação²². Assim, os mioblastos maduros que são utilizados durante o transplante celular não serão capazes de desenvolver junções eletromecânicas com o miocárdio do hospedeiro. Isso resulta em isolamento elétrico dos mioblastos transplantados com conseqüente redução na velocidade de condução, favorecendo assim o fenômeno da reentrada e o surgimento de arritmias^{23,24}.

Na tentativa de contornar tal situação, tentou-se provocar uma superexpressão da proteína conexina-43 através da transfecção do gene dessa proteína para o mioblasto²⁴. Feito isso, os clones produzidos foram capazes de demonstrar uma maior capacidade de formar discos intercalares com os cardiomiócitos. Além disso, tais clones também apresentaram benefícios na propagação do impulso elétrico e redução do potencial arritmogênico²⁵.

A questão da segurança relacionada ao uso dos mioblastos surgiu após a ocorrência de episódios de taquicardia ventricular sustentada no pós-operatório dos pacientes transplantados¹⁶. Desde então, os experimentos *in vivo* apresentaram resultados divergentes quanto a esse assunto. Enquanto alguns demonstram a ocorrência de arritmias ventriculares relacionadas ao transplante dos mioblastos²⁶, outro estudo²⁷ demonstrou que tal evento está relacionado primariamente ao infarto, não havendo acentuação após a injeção das células. Menasché²⁸ sugere que a discrepância nos dados observados surgiu uma vez que a prevalência e gravidade das arritmias ventriculares podem ser justificadas por dois fatores de difícil controle. O primeiro seria o tamanho do enxerto²⁴ e a localização da injeção do mioblasto (aqueles realizados no centro da cicatriz parecem ser menos arritmogênicos do que os realizados no limite com o miocárdio não fibrótico²⁹). O autor cita ainda o fato de que durante o intraoperatório, os locais infartados apresentam áreas entremeadas de miocárdio normal e de miocárdio fibrótico. Devido a isso, ocorre a injeção de células em tecido fibrótico e também em

Artigo de Revisão

tecido viável, resultando assim em potencial arritmogênico. O segundo fator que justificaria os dados discrepantes seria o estágio avançado de disfunção ventricular esquerda que os pacientes estudados apresentavam. Esse fato, somado à ausência de grupo-controle, tornou praticamente impossível determinar se as arritmias encontradas eram secundárias à injeção dos mioblastos ou ao substrato arritmogênico inerente à isquemia miocárdica.

Limitações

Apesar dos resultados positivos (apenas em relação à segurança) obtidos com o estudo MAGIC e com os estudos prévios, há evidências de que o uso dos mioblastos apresenta desvantagens importantes quando comparado com outros tipos celulares. Entretanto, alguns aspectos relacionados ao seu uso, se avaliados e decifrados, podem recolocar esta célula no arsenal terapêutico da terapia celular em cardiologia. Entre eles temos:

1. Limitação da diferenciação dos mioblastos

Uma das principais limitações dos mioblastos é a sua incapacidade de se diferenciar e dar origem a novos cardiomiócitos ou até mesmo de se ligar às células do hospedeiro através das junções celulares³⁰. Ainda que a superexpressão da conexina-43 possa ser realizada com segurança, isto não garante que a distribuição do gene será feita de maneira suficientemente homogênea a fim de permitir a contração sincronizada entre a célula transplantada e os cardiomiócitos do hospedeiro. Além disso, também não é possível afirmar que a função cardíaca será melhorada sem o aumento no risco de arritmias.

Essa questão suscita dúvida sobre qual o verdadeiro mecanismo de ação que se espera observar com o transplante celular. Se, primordialmente, objetiva-se que as células exerçam seu efeito através de uma ação parácrina, então os mioblastos surgem como uma boa opção para serem as células de escolha, bastando para isso que se prove sua capacidade de produzir e liberar os devidos fatores parácrinos. Entretanto, acreditando que os benefícios da terapia celular sejam secundários a alterações estruturais, ou seja, devido à transdiferenciação das células transplantadas em novos cardiomiócitos com conseqüente melhora da função ventricular, então os mioblastos não seriam as células de primeira linha.

2. Baixo índice de fixação

Um achado consistente com a maioria dos estudos em terapia celular é o baixo índice de fixação das células transplantadas ao tecido do hospedeiro. Até 90% dos mioblastos transplantados morrem durante os

primeiros dias pós-transplante³¹. Diferentemente das células mononucleares autólogas da medula óssea em que a quantidade de células infundidas não altera o resultado final, com os mioblastos já está provado que o maior número de células resulta em melhores resultados finais em termos de fixação celular³².

Esse baixo índice de fixação dos mioblastos pode ser explicado por dois eventos sequenciais: inicialmente ocorre uma perda mecânica de células e, em seguida, uma perda "biológica". A perda mecânica pode representar até 30% do total de células, dependendo basicamente do estado do miocárdio no momento da injeção (quando a injeção é feita com o coração contraído, como durante a cirurgia de revascularização, a perda é até duas vezes maior do que quando realizada pós-IAM, com o miocárdio "parado"³³). Essa perda mecânica, além de reduzir o *pool* de células disponíveis para o tecido-alvo, permite a disseminação sistêmica desse material. Ainda que essa disseminação sistêmica não tenha resultado em efeitos adversos no caso dos mioblastos, este não é o caso quando a célula injetada é a célula mesenquimal e, por esse motivo, permanece sendo um assunto a ser equacionado.

Já a perda "biológica" dos mioblastos, que ocorre após a sua fixação ao tecido do hospedeiro, pode ser explicada pela ocorrência de fatores como inflamação, apoptose, hipóxia e a ausência de sinais necessários para a sobrevivência celular disparados pela interação célula-célula³⁴.

Conclusão

Após o exposto, com análise minuciosa dos principais estudos avaliando o uso dos mioblastos, fica fácil entender os motivos pelos quais esta célula tem sido gradualmente abandonada na cardiologia. Certamente os resultados desanimadores quanto à segurança de seu uso foram determinantes para essa situação. Além disso, o fato de os mioblastos não apresentarem capacidade de diferenciação em cardiomiócitos compromete consideravelmente seus benefícios sobre a função ventricular. Por isso, os resultados mais promissores dos estudos já realizados foram discretos quando comparados àqueles obtidos com outros tipos celulares.

Fica claro que muito ainda deve ser feito a fim de que os mioblastos representem, definitivamente, uma opção para a terapia celular na cardiologia. Nesse sentido, a terapia gênica surge como possível solução para as questões levantadas. Porém, é evidente que se o seu potencial arritmogênico não

for contornado, seu uso tornar-se-á proibitivo e seu esquecimento progressivamente maior, chegando em pouco tempo, ao abandono definitivo.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflitos de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

Vinculação Universitária

O presente estudo não está vinculado a qualquer programa de pós-graduação.

Referências

1. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961;9:493-5.
2. Murry CE, Reinecke H, Pabon LM. Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(9):1777-85.
3. Marelli D, Ma F, Chiu RC. Satellite cell implantation for neomyocardial regeneration. [Abstract]. *Transplant Proc.* 1992;24(6):2995.
4. Reinecke H, Poppa V, Murry CE. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(2):241-9.
5. Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E, Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(13):7808-11.
6. McConnell PI, del Rio CL, Jacoby DB, Pavlicova M, Kwiatkowski P, Zawadzka A, et al. Correlation of autologous skeletal myoblast survival with changes in left ventricular remodeling in dilated ischemic heart failure. [Abstract]. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;130(4):1001.
7. Payne T, Oshima H, Okada M, Momoi N, Tobita K, Keller BB, et al. A relationship between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and cardiac repair after muscle stem cell transplantation into ischemic hearts. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(17):1677-84.
8. Murtuza B, Suzuki K, Bou-Gharios G, Beauchamp JR, Smolenski RT, Partridge TA, et al. Transplantation of skeletal myoblasts secreting an IL-1 inhibitor modulates adverse remodeling in infarcted murine myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(12):4216-21.
9. Ghostine S, Carrion C, Souza LC, Richard P, Bruneval P, Vilquin JT, et al. Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation.* 2002;106(12 Suppl 1): I131-6.
10. Gavira JJ, Perez-Ilzarbe M, Abizanda G, Garcia-Rodriguez A, Orbe J, Páramo JA, et al. A comparison between percutaneous and surgical transplantation of autologous skeletal myoblasts in a swine model of chronic myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2006;71(4):744-53.
11. Dowell JD, Rubart M, Pasumarthi KB, Soonpaa MH, Field LJ. Myocyte and myogenic stem cell transplantation in the heart. *Cardiovasc Res.* 2003;58(2):336-50.
12. He KL, Yi GH, Sherman W, Zhou H, Zhang GP, Gu A, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation improved hemodynamics and left ventricular function in chronic heart failure dogs. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24(11):1940-9.
13. van den Bos EJ, Thompson RB, Wagner A, Mahrholdt H, Morimoto Y, Thomson LE, et al. Functional assessment of myoblast transplantation for cardiac repair with magnetic resonance imaging. *Eur J Heart Fail.* 2005;7(4):435-43.
14. Larose E, Proulx G, Voisine P, Rodés-Cabau J, De Larochelière R, Rossignol G, et al. Percutaneous versus surgical delivery of autologous myoblasts after chronic myocardial infarction: an in vivo cardiovascular magnetic resonance study. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2010;75(1):120-7.
15. Gavira JJ, Nasarre E, Abizanda G, Pérez-Ilzarbe M, de Martino-Rodriguez A, García de Jalón JA, et al. Repeated implantation of skeletal myoblast in a swine model of chronic myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2010;31(8):1013-21.
16. Menasché P, Haggège AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet.* 2001;357(9252):279-80.
17. Haggège AA, Marolleau JP, Vilquin JT, Alhéritière A, Peyrard S, Duboc D, et al. Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation.* 2006;114(1 Suppl):I108-13.
18. Gavira JJ, Herreros J, Perez A, Garcia-Velloso MJ, Barba J, Martin-Herrero F, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation in patients with nonacute myocardial infarction: 1-year follow-up. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;131(4):799-804.
19. Siminiak T, Fiszer D, Jerzykowska O, Grygielska B, Rozwadowska N, Kalmucki P, et al. Percutaneous transcatheter transplantation of autologous skeletal myoblasts in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment: the POZNAN trial. *Eur Heart J.* 2005;26(12):1188-95.
20. Biagini E, Valgimigli M, Smits PC, Poldermans D, Schinkel AF, Rizzello V, et al. Stress and tissue Doppler echocardiographic evidence of effectiveness of myoblast transplantation in patients with ischaemic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2006;8(6):641-8.

Artigo de Revisão

21. Ince H, Petzsch M, Rehders TC, Chatterjee T, Nienaber CA. Transcatheter transplantation of autologous skeletal myoblasts in postinfarction patients with severe left ventricular dysfunction. *J Endovasc Ther.* 2004;11(6):695-704.
22. Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, et al. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation.* 2008;117(9):1189-200.
23. Reinecke H, McDonald GH, Hauschka SD, Murry CE. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol.* 2000;149(3):731-40.
24. Verheule S, van Kempen MJ, Welscher PH, Kwak BR, Jongasma HJ. Characterization of gap junction channels in adult rabbit atrial and ventricular myocardium. *Circ Res.* 1997;80(5):673-81.
25. 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.
26. Abraham MR, Henrikson CA, Tung L, Chang MG, Aon M, Xue T, et al. Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation. *Circ Res.* 2005;97(2):159-67.
27. Fernandes S, Amirault JC, Lande G, Nguyen JM, Forest V, Bignolais O, et al. Autologous myoblast transplantation after myocardial infarction increases the inducibility of ventricular arrhythmias. *Cardiovasc Res.* 2006;69(2):348-58.
28. Fouts K, Fernandes B, Mal N, Liu J, Laurita KR. Electrophysiological consequence of skeletal myoblast transplantation in normal and infarcted canine myocardium. *Heart Rhythm.* 2006;3(4):452-61.
29. Menasché P. Skeletal myoblasts and cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45(4):545-53.
30. Soliman AM, Krucoff MW, Crater S, Morimoto Y, Taylor DA. Cell location may be a primary determinant of safety after myoblast transplantation into the infarcted heart. [Abstract]. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(1 Suppl):15A.
31. Rubart M, Soonpaa MH, Nakajima H, Field LJ. Spontaneous and evoked intracellular calcium transients in donor-derived myocytes following intracardiac myoblast transplantation. *J Clin Invest.* 2004;114(6):775-83.
32. Hagège AA, Carrion C, Menasché P, Vilquin JT, Duboc D, Marolleau JP, et al. Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet.* 2003;361(9356):491-2.
33. Tambara K, Sakakibara Y, Sakaguchi G, Lu F, Premaratne GU, Lin X, et al. Transplanted skeletal myoblasts can fully replace the infarcted myocardium when they survive in the host in large numbers. *Circulation.* 2003;108 Suppl 1:II259-63.
34. Teng CJ, Luo J, Chiu RC, Shum-Tim D. Massive mechanical loss of microspheres with direct intramyocardial injection in the beating heart: implications for cellular cardiomyoplasty. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;132(3):628-32.