

INVESTIGACIÓN

Técnica de cultivo de mioblastos autólogos humanos para trasplante clínico

Technique of culture of human autologous myoblasts for clinic transplant

Rendal E¹, Rodríguez M¹, Díaz T², Juffé A³, Domenech N², Adrio B³, Sánchez MJ², Andión C¹, Blanco FJ²

¹ Unidad de Criobiología. ² Unidad de Investigación. ³ Departamento de Cirugía Cardíaca. Complejo Hospitalario Juan Canalejo. La Coruña. España.

Resumen

Introducción: El trasplante celular para reparar o regenerar el miocardio dañado es un nuevo objetivo en la enfermedad cardiovascular. Los mioblastos esqueléticos autólogos son las células más estudiadas y constituyen la primera elección para la reparación cardíaca.

Objetivos: Puesta a punto de la técnica de cardiomioplastia celular en muestras obtenidas de donantes multiorgánicos y llevar a cabo esta técnica junto con la revascularización en dos pacientes.

Material y métodos: Se han obtenido 15 biopsias de músculo vasto lateral de donantes multiorgánicos y de dos pacientes con infarto de miocardio no reciente. Después de tres semanas de cultivo, se evaluó en todas las muestras el porcentaje de mioblastos con los anticuerpos CD56, desmin y miogenin. Los dos pacientes fueron sometidos a cirugía de revascularización e inyección intramiocárdica de mioblastos esqueléticos autólogos obtenidos tras cultivo con suero autólogo.

Resultados: Se demostró la presencia de un gran número de células positivas con los marcadores desmina y miogenin. El implante de mioblastos esqueléticos autólogos no se asoció con el desarrollo de efectos adversos.

Conclusiones: En pacientes con un infarto de miocardio no reciente, el tratamiento con mioblastos en conjunción con bypass arteria coronaria es seguro y fácil y es relativamente fácil obtener mioblastos de tejido muscular para trasplantar.

Palabras clave:

Mioblasto, fallo cardíaco, trasplante, cardiomioplastia celular.

Abstract

Introduction: Cellular transplant to repair or regenerate damaged myocardium is a new objective in cardiovascular disease. The autologous skeletal myoblasts are the most studied cells and constitute the first election for cardiac repair.

Objectives: fine adjustment of the cellular cardiomyoplasty technique with revascularization in two patients.

Material and methods: 15 biopsies were obtained from multiorganic donors and from two patients with no recent infarct. After three weeks of culture, the percentage of myoblasts were evaluated using monoclonal antibodies CD56, desmin and myogenin. The two patients were subjected to revascularization surgery and intramyocardic injection of autologous skeletal myoblasts obtained after culture with autologous serum.

Results: The presence of a great number of positive cells with desmin and myogenin markers was shown. The implantation of autologous skeletal myoblasts was not associated with the development of adverse effects.

Conclusions: In patients without a recent myocardium infarct, the treatment with myoblasts together with coronary artery bypass is sure and easy and it is straightforward to obtain myoblasts from muscle tissue for transplant.

Key words:

Myoblast, cardiac failure, transplant, cellular cardiomyoplasty.

Correspondencia

M^o E. Rendal Vázquez. Unidad de Criobiología.
Carretera del Pasaje s/n. Hospital Teresa Herrera. 15006 La Coruña
Esther_Rendal@canalejo.org

Introducción

El infarto de miocardio está asociado con la pérdida y no funcionalidad de los cardiomiocitos y lleva al fallo cardíaco y muerte como consecuencia de la pérdida celular irreversible [1]. La pérdida de cardiomiocitos después de un infarto de miocardio normalmente resulta en un adelgazamiento y dilatación de la cicatriz resultante lo que puede contribuir a la disfunción ventricular asociada. Los avances en biología celular y molecular han hecho posible el desarrollo de nuevas terapias para tratar el fallo cardíaco. Una de las más innovadoras consiste en el trasplante de células autólogas expandidas para la regeneración del músculo cardíaco [2-4]. La introducción de cardiomiocitos viables en la región de la cicatriz puede modificar el proceso de remodelado y prevenir el fallo cardíaco.

Las primeras células contráctiles usadas fueron cardiomiocitos fetales. Pero, a causa de los problemas derivados de su utilización, tales como problemas éticos, cuestiones inmunológicas o por ejemplo dificultades para su obtención, se ha hecho de los mioblastos esqueléticos autólogos el objetivo de varias líneas de investigación [5]. Otros tipos celulares que están siendo investigados incluyen células de médula ósea, células CD34+ de sangre periférica y células progenitoras endoteliales. Estudios animales preclínicos y resultados alentadores a partir de ensayos clínicos sugieren que la terapia con *stem-cell* podría también ser una herramienta importante en el tratamiento del fallo cardíaco [6].

La inyección de mioblastos esqueléticos en modelos animales de infarto de miocardio y más recientemente en humanos se ha asociado con el injerto con éxito de fibras musculares esqueléticas, supervivencia del injerto y beneficio funcional [7-10]. Aunque controvertido, alguna evidencia sugiere que los progenitores de músculo esquelético pueden adquirir ciertas características de músculo cardíaco tanto *in vitro* como *in vivo*. La cardiomioplastia celular usando mioblastos obtenidos de músculo pretende reparar el tejido miocárdico no contráctil siendo un complemento a la cirugía de revascularización permitiendo una mayor recuperación de la función cardíaca [11-15]. La realización de cardiomioplastia celular en el mismo acto quirúrgico que la revascularización no aumenta la morbilidad del procedimiento quirúrgico [1].

El trasplante de mioblastos autólogos, unido a cirugía de revascularización, parece mejorar la contractibilidad del corazón que sufre un infarto no reciente.

Los objetivos principales de nuestro estudio se resumen de la siguiente forma: puesta a punto de la técnica para el cultivo de mioblastos esqueléticos autólogos en muestras de donantes multiorgánicos y ensayo clínico de dos pacientes con trasplante de mioblastos esqueléticos autólogos en el miocardio.

Material y métodos

La puesta a punto del procedimiento de cultivo celular se realizó utilizando muestras de tejido muscular obtenido del músculo vasto externo, procedentes de donaciones multiorgánicas (n=15) obtenidas tras un consentimiento informado. Se obtuvo un fragmento de músculo esquelético de 2-3 cm² (10-15 g) en condiciones estériles, mantenidas durante todo el proceso de manipulación y transporte.

Para realizar el ensayo clínico, tres semanas antes de realizar el procedimiento de cardiomioplastia celular se obtienen muestras del músculo vasto externo en dos pacientes tras anestesia local (2% hidrocloruro de lidocaína), para cultivo autólogo tras consentimiento informado: un hombre de 53 años, hipertenso, con hipercolesterolemia y exfumador. Tuvo una cardiomiopatía isquémica en 1998 con un infarto anterior amplio y con un resultado severo de disfunción ventricular izquierda y en consecuencia la fracción de eyección (EF) era del 20%. El otro paciente era un hombre de 66 años con una historia de fumador como único factor de riesgo cardiovascular. Su cardiomioplastia isquémica fue primero diagnosticada en 1982 cuando tuvo un infarto posterior.

Desde el momento de la disección hasta el momento de la recepción en el laboratorio, es decir el período de isquemia fría, el tejido fue conservado a 4°C en PBS. El tejido fue conservado de esta forma hasta su transporte al laboratorio de cultivo (3-6 horas).

Brevemente, se retiró el tejido adiposo y fibroso de la biopsia muscular, se troceó y se lavó con PBS (100g, 5 min). A continuación se realizó digestión mecánica y enzimática. Incubación con colagenasa tipo I liofilizada (GIBCO, España, Barcelona) (1.5mgr/ml/gr de tejido) a 37°C durante 1 hora y a continuación incubación con tripsina-EDTA (1x) a 37°C durante 1 hora. Después del filtrado, se incubaron las células en 79% de medio Ham-F12 media suplementado con 20% de suero bovino fetal (suero autólogo en el caso de los dos pacientes) y 1% de penicilina-streptomina.

El cultivo celular se realizó a 37°C y 5% CO₂ y el subcultivo fue realizado cuando este era casi confluyente para prevenir la formación de miotubos. Durante el primer subcultivo, se realizó *pre-plating* para eliminar la contaminación de mioblastos con fibroblastos. La pureza de los mioblastos se midió mediante citometría de flujo utilizando N-CAM (CD56) (DAKO, España, Barcelona), y tinción inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales frente a la desmina humana (BioGenex, España, Barcelona) y mio-genin (Becton Dickinson, España, Madrid). Mioblastos y células progenitoras de músculo son CD56, desmin y mio-genin positivas.



Los mioblastos necesarios para implantar se obtuvieron después de 3-4 pases. Se realizaron controles de esterilidad durante todo el cultivo (bacterias, virus, hongos y micoplasmas).

En el caso de los dos pacientes, cuando se obtuvieron el número de células necesarias (200-400 millones) la suspensión celular se diluyó en PBS, 1% penicilina/estreptomicina y 1% albúmina humana (GRIFOLS, España, Barcelona), 48 horas antes del trasplante y se guardó a 4°C y se llevó a cabo la valoración del porcentaje de viabilidad con azul tripán y del porcentaje de mioblastos con CD56 y anticuerpos desmin y miogenin así como controles microbiológicos (aerobios, anaerobios, hongos y micoplasmas).

Previo al implante de células, los pacientes fueron sometidos a cirugía convencional de *bypass* aorto coronario. Durante la cirugía de *bypass*, antes de retirar la circulación extracorpórea y mientras el corazón estaba realizando el latido espontáneo, las células musculares progenitoras (mioblastos) fueron inyectadas subepicárdicamente por medio de múltiples inyecciones con una aguja que permitía la inyección tangencial de las células bajo el epicardio. Los mioblastos fueron inyectados en aquellos segmentos previamente identificados mediante ecocardiografía como acinético o discinético en y alrededor del infarto. Las áreas que recibieron células fueron identificadas antes de la cirugía por ecocardiograma y estas mismas áreas fueron analizadas durante el seguimiento para determinar cambios en la contractibilidad regional.

Para estudiar la función cardíaca se realizaron distintas técnicas: 1. Resonancia magnética: además de definir el mapa vascular coronario, también era capaz de evaluar la función del miocardio y de medir el grado de perfusión del mismo.

Se obtuvo una imagen que pudo detectar cualquier tipo de lesión con excelente definición. 2. Tomografía de emisión de positrones (PET): Es un examen diagnóstico que comprendía la adquisición de imágenes fisiológicas basadas en la detección de la radiación a partir de la emisión de positrones. Los positrones eran partículas diminutas emitidas a partir de una sustancia radioactiva administrada al paciente. El PET del corazón pudo ser utilizado para determinar el flujo sanguíneo al músculo del corazón y ayuda a evaluar signos de enfermedad arteria coronaria. El PET del corazón también pudo ser útil para determinar si áreas del corazón que mostraban función disminuida estaban vivas como resultado de un infarto previo. Combinado con un estudio de perfusión miocárdica, las imágenes del PET permitieron la diferenciación de músculo del corazón no funcionando de músculo del corazón que se beneficiaría de un procedimiento tal como angioplastia o cirugía de *bypass* arteria coronaria, la

cual restablecería el flujo sanguíneo adecuado y mejoraría la función del corazón. 3. Ecocardiograma basal: Es un procedimiento no invasivo que se utilizó para evaluar la función y las estructuras de corazón. Un transductor enviaba ondas sonoras ultrasónicas de una frecuencia demasiado alta para ser oídas. Cuando el transductor se colocaba en el pecho del paciente en ciertos lugares y con determinados ángulos, las ondas sonoras ultrasónicas atravesaban la piel y otros tejidos del cuerpo hasta llegar a los tejidos del corazón, donde las ondas rebotaban en las estructuras cardíacas. El transductor recogía las ondas rebotadas y las enviaba a una computadora. El ordenador interpretaba los ecos y creaba una imagen de las paredes y las válvulas del corazón.

Resultados

Muestras para puesta a punto de la técnica de cardiomioplastia celular.

En las muestras de tejido muscular procedentes de donantes multiorgánicos (n=15), el tamaño medio de la biopsia muscular fue de 10gr y el volumen medio de suero humano utilizado fue de 1800ml. Después de una media de 30 días en cultivo, se obtuvo una media de 300x106 (Desviación estándar SD=17.8x106) mioblastos. Todos los cultivos mostraron una viabilidad de un 99% (SD=1%) por medio de tinción con azul tripán.

Además el cultivo de células de músculo esquelético contenía sobre un 85% (SD=1,2%) de mioblastos identificados con los marcadores desmina, miogenin ó CD56 (Figura 1).

Muestras para el ensayo clínico

Dos pacientes fueron sometidos a cirugía de *bypass* y recibieron al mismo tiempo trasplante de mioblastos esqueléticos.

El primer paciente, un hombre de 53 años, diagnosticado con hipertensión, hipercolesterolemia y ex fumador (factores de riesgo cardiovasculares). Había tenido una cardiopatía isquémica en 1998 con un infarto anterior amplio y como resultado una disfunción ventricular izquierda severa (función contráctil disminuida) y como consecuencia la fracción de eyección era del (EF) 20% (la función normal era del 50% o más). Después del infarto, las zonas de la cicatriz no contraían, comprometiendo la parte anterior del ventrículo izquierdo. Los tests previos llevados a cabo fueron: ecocardiograma, PET y cateterismo. Anterior a la cirugía de implante celular, (cateterismo) mostró: 70% estenosis en Dam (anterior descendente), 75% en OMI (primera marginal), y 100% en CDp (proximal coronaria derecha). Ecocardiografía mostró una EF de 20%, akinesia septoapical e inferior (el *apex* del corazón y cara inferior no se movían) y

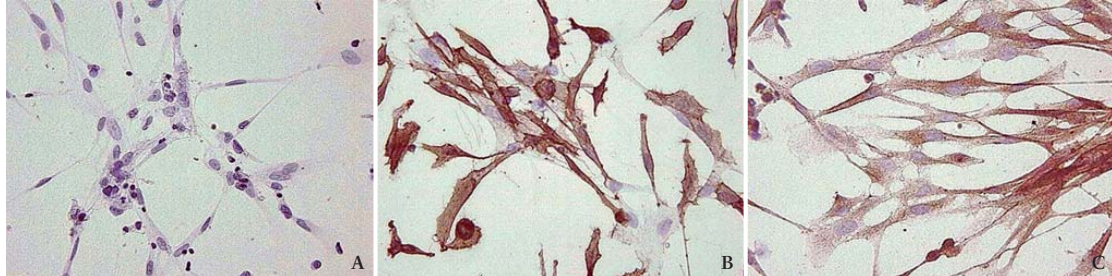


Fig. 1. Inmunohistoquímica de mioblastos en una muestra representativa de donante: Control sin anticuerpo primario (A); anticuerpo primario desmina (B) anticuerpo primario miosina (C) (Tinción con Peroxidasa 20x).

global hipokinesia (el resto del corazón se movía poco). El PET mostró hipometabolismo extendido a la región septoapical (el *apex* del corazón y el *septum* no consumían estos metabolitos y no se movían). El peso de la biopsia fue de 10.5 gr. Y el volumen medio de suero humano utilizado fue de 1800ml. La duración del cultivo de 3 semanas. El número de células obtenidas de 250 millones. Los niveles de CD56 fueron de 63% y el de desmina era de 41% (Figura 2). La técnica quirúrgica fue revascularización e implante celular. La revascularización fue llevada a cabo con la arteria mamaria doble esquelética, utilizando la derecha como un injerto libre anastomosado a la izquierda en Y ó T (técnica Tector), sin circulación extracorpórea. Los *bypass* llevados a cabo fueron: LIMA (arteria mamaria interna izquierda) a DA (descendente anterior) y RIMA (arteria mamaria interna derecha) a RM (territorio de la rama media) y DM2 (segunda marginal). NOTA : La rama de la coronaria derecha estaba sin revascularización pero no obstante se realizó implante de células en esta zona. Para el implante de estas células, fueron implantadas en la cara inferior (territorio de la coronaria derecha sin revascularización).

Después de tres meses, los test postimplante llevados a cabo fueron un ecocardiograma donde la EF fue de 45% y se pudo observar akinesia septoapical e inferior y hipokinesia postinferior. Un PET postimplante mostró un pequeño aumento en la captación de 18F-FDG en el área infartada, sugiriendo viabilidad miocárdica aumentada en esta área.

El segundo paciente, era un hombre de 66 años con una historia de fumador como único factor de riesgo cardiovascular. Su cardiomiopatía isquémica fue primero diagnosticada en 1982 cuando tuvo otro infarto. Más tarde, en 1985, sufrió otro infarto, esta vez un infarto inferior y en 1989 fue admitido en el hospital debido a una angina inestable. En 1990 fue llevado a cabo una angiografía coronaria y mostró enfermedad multivaso con enfermedad significativa en arte-

ria coronaria circunfleja y arteria coronaria derecha, sus médicos en este momento decidieron continuar con tratamiento médico. En julio del 2003 fue admitido nuevamente con un nuevo infarto de miocardio sin onda Q; un ecocardiograma mostró severa disfunción del ventrículo izquierdo, con una fracción de eyección de 28% y presencia de pequeño aneurisma de la pared ventricular inferior. Es en este momento cuando se consideró que tendría más beneficios con un tratamiento quirúrgico: CABG + cardioplastia celular.

Cateterismo mostró : 90% estenosis en la porción proximal y 100% estenosis en la porción media de la arteria anterior descendente; oclusión total de la circunfleja en su origen y un 93% de estenosis en la arteria coronaria derecha. El ecocardiograma mostró una fracción de eyección disminuida del 23% con acinesia en las paredes septoapical y posterior del ventrículo izquierdo. El PET mostró hipometabolismo extendido en la región septoapical (el *apex* del corazón y el *septum* no consumen estos metabolitos y no se mueven). La CRM mostró una fracción de eyección del 16% con acinesia difusa y discinesia septoapical.

El peso de la biopsia era de 10gr. El volumen medio de suero humano utilizado 2000ml. La duración del cultivo 3 semanas. El número de células obtenidas 300 millones. El nivel de CD656 fue 86% (Figura 2). La cardiomioplastia celular fue llevada a cabo en las paredes anterior e inferior del ventrículo izquierdo con varias inyecciones epicárdicas ambas en las áreas infarto y preinfarto.

La cirugía CABG consistió de tres *bypass* usando las dos arterias torácicas internas, la derecha utilizada como conducto libre anastomosada a la izquierda (técnica Tector), sin circulación extracorpórea. Los *bypass* fueron: LIMA (arteria mamaria interna izquierda) a LAD (arteria anterior descendente izquierda); RIMA (arteria mamaria interna derecha) a la primera diagonal y a la primera rama marginal de la arteria circunfleja.

Después de un mes, los tests postimplante llevados a cabo fueron únicamente un ecocardiograma donde la EF era de 39% y con las mismas áreas acinéticas.

Discusión

El trasplante de mioblastos demostró una posible mejoría de la función cardíaca y de la viabilidad del tejido necrótico. El uso de *stem cells* y en particular de mioblastos esqueléticos para reparación cardíaca en pacientes con infarto de miocardio constituyó un campo de investigación muy activo durante los últimos años. Se demostró en modelos animales que estas células injertadas, se diferenciaban en fibras esqueléticas, adquiriendo ciertas características de músculo cardíaco y contribuyendo a mejorar la función cardíaca y la supervivencia del animal. Trabajos muy recientes en pacientes con infarto de miocardio mostraron que los mioblastos autólogos esqueléticos podían sobrevivir después del trasplante y formaban injertos viables en tejido miocárdico humano cicatrizado duramente [9,10,14,16,17]. La combinación de *bypass* aorto coronario e inyección de mioblastos era una técnica factible y segura para el tratamiento de pacientes con infarto de miocardio.

Aunque los mioblastos esqueléticos podían ser trasplantados con éxito, el porcentaje de células que sobrevivían y se diferenciaban en tejido funcional era normalmente desconocido y algunos trabajos sugerían que podía ser incluso menor al 1%.

Uno de los primeros problemas que debía ser solventado era el diseño de protocolos de cultivo disponibles para el crecimiento selectivo de mioblastos.

Los principales objetivos de este estudio se podían resumir en: la puesta a punto de la técnica de cultivo de mioblastos esqueléticos autólogos en muestras de donantes multiorgánicos y trasplante de mioblastos esqueléticos autólogos directamente en el miocardio en dos pacientes.

La pureza de nuestros cultivos de mioblastos de donantes multiorgánicos fue determinada usando diferentes marcadores tales como N-CAM (CD-56), desmina y miogenin. Los mioblastos y células progenitoras de músculo eran CD56 positivas, desmin y miogenin positivas y esto pudo ser observado en nuestros cultivos.

Debido a que la disfunción miocárdica después del infarto era a menudo debida a la pérdida de cardiomiocitos y a la distensión gradual del tejido cicatrizado, el implante en este tejido de células musculares demostró experimentalmente mejorar la función del corazón.

Varios estudios clínicos piloto demostraron el efecto beneficioso de la inyección transepicárdica de mioblastos sobre la función ventricular izquierda en la insuficiencia cardíaca crónica tras un infarto de miocardio. La interpretación de los resultados de este estudio se veía comprometida por ciertos factores de confusión como la revascularización concomitante. El número de células inyectadas en nuestros pacientes (250 millones de células fueron inyectadas subepicárdicamente) fue significativamente más baja que el número de células inyectadas en el estudio de Menasche et al [14] y similar al número de células inyectadas en otros estudios [1,17]. El pequeño aumento en la absorción de F18-FDG en el área donde las células fueron implantadas sugería que algún tejido viable estaba presente en el área del infarto donde previamente no se pudo observar ningún tejido viable. Sin embargo, nosotros no pudimos demostrar directamente la contribución a la contractilidad de las células implantadas, también debido a que el período de seguimiento post implante era muy corto.

Nuestros pacientes recibieron tanto células como revascularización en la misma área, así la mejora observada pudo ser atribuida al menos en parte a la revascularización. El hecho de que aquellos segmentos del corazón tratados con células y revascularización experimentaran una mejoría mayor, indicaba, que se desconocía si la única razón para la mejoría cardíaca era la cirugía (mayor que aquellos segmentos cardíacos revascularizados pero donde ningún trasplante de células fue hecho). Además, fue bien demostrado que la reperfusión de tejido no-viable y fibrótico no mejoraba la función cardíaca o la viabilidad [18].

Un interesante descubrimiento en nuestros pacientes fue la ausencia de arritmias cardíacas como había sido observado en el estudio de Herreros et al [1], lo que estaba en oposi-

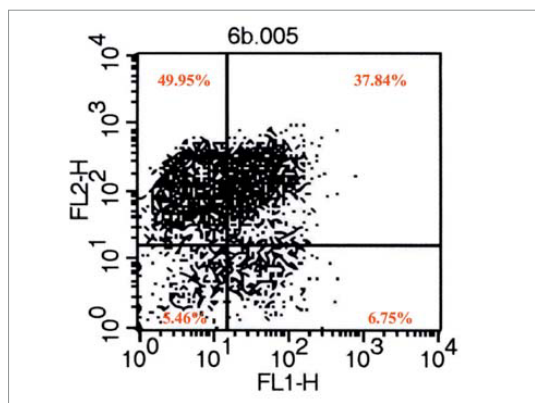


Fig. 2. Cuantificación fenotípica por citometría de flujo de los mioblastos antes del implante al segundo paciente. La figura representa un doble marcaje con CD56 (mioblastos) y CD106 (fibroblastos).



ción con otros estudios recientes [17,19]. Nuestros pacientes recibieron mioblastos cultivados sin suero bovino fetal.

En conclusión, nuestra técnica permitía la obtención de mioblastos de tejido muscular de un alto nivel de pureza para su posterior implante en pacientes.

Agradecimientos

Al personal del Servicio de Radiología de nuestro hospital y del Sanatorio Modelo así como al Banco de Sangre del Hospital Juan Canalejo. Asimismo también querríamos dar las gracias a la Fundación MAPFRE por su financiación. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Herreros J, Prosper F, Perez A, Gavira JJ, García-veloso MJ, Barba J, et al. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *European Heart Journal* 2003; 24: 2012-20.
- Kedes L, Kloner RA and Starnes VA. Can a few cells now mend a broken heart? *J Clin Invest* 1993; 92: 1115-6.
- Li RK, Yau TM, Sakai T, Mickle DAG and Weisel RD. Cell therapy to repair broken hearts. *Can J Cardiol* 1998; 14: 735-44.
- Chacques JC, Salanson-Lajos C, Lajos P, Shafy A, Alshamry A, Carpentier A. Cellular cardiomyoplasty for myocardial regeneration. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2005; 13: 287-96.
- Hutcheson KA, Atkins BZ, Hueman MT, Hopkins MB, Glower DD and Taylor DA. Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts. *Cell Transplant* 2000; 9: 359-68.
- Rosentrauch D, Poglajen G, Zidar N, Gregoric ID. Stem cell therapy for ischemic heart failure. *Tex Heart Inst J* 2005; 32:339-47.
- Koh GY, Soonpaa MH, Klug MG, Field LJ. Long-term survival of AT-1 cardiomyocyte grafts in syngeneic myocardium. *Am J Physiol* 1993; 264 (5Pt2): H1727-33.
- Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG and Field LJ. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 1994; 264: 98-101.
- Steendijk P, Smits PC, Valgimigli M, Van der Giessen WJ, Onderwater EE, Serruys PW. Intramyocardial injection of skeletal myoblasts: long-term follow-up with pressure-volume loops. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; 3: S94-S100.
- Siminiak T, Burchardt P, Kurpisz M. Postinfarction heart failure: surgical and trans-coronary-venous transplantation of autologous myoblasts. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; 3: S46-51.
- Atkins BZ, Hueman MT, Meuchel JM, Cottman MJ, Hutcheson KA and Taylor DA. Myogenic cell transplantation improves in vivo regional performance in infarcted rabbit myocardium. *J Heart Lung Transplant* 1999; 18: 1173-80.
- Chiu RC, Zibaitis A and Kao RL. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg* 1996; 61(2): 772-3.
- Sakai T, Li RK, Weisel RD, Mickle DAG, Kim EJ, Tomita S, et al. Autologous heart cell transplantation improves cardiac function after myocardial injury. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 2074-81.
- Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357: 279-80.
- Rajnoch C, Chacques JC, Berrebi A, Bruneval P, Benoit MO and Carpentier A. Cellular therapy reverses myocardial dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 121: 871-8.
- Hagege AA, Carrion C and Menasche P. Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003; 361: 491-2.
- Pagani FD, DerSimonian H and Zawadzka A. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 879-88.
- Allman KC, Shaw LJ and Hachamovitch R. Myocardial viability testing and impact of revascularization on prognosis in patients with coronary artery disease and left ventricular dysfunction: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 1151-8.
- Menasche P, Hagege AA and Vilquin JT. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1078-83.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.