

Reducción del tamaño del infarto de miocardio mediante la transferencia génica de VEGF en ovejas

GUSTAVO L. VERA JANAVEL^{1,1,2,A}, PATRICIA M. CABEZA MECKERT^{B,3,4}, ALBERTO J. CROTTIGINI^{C,1}, ANÍBAL A. MELE³, LUIS A. CUNIBERTI^{D,1}, VERÓNICA N. MARTÍNEZ^{E,1}, CARLOS A. MELO^{F,2}, AÍDA E. PRYNC^{G,2}, MARCELO E. CRISCUOLO^{H,2}, RUBÉN P. LAGUENS^{I,1,3}

RESUMEN

La transferencia génica de plásmido codificante para VEGF (pVEGF) induce angiogénesis, incremento del índice mitótico e hiperplasia miocítica en cerdos con isquemia miocárdica crónica. El presente trabajo se realizó con el objetivo de estudiar el efecto del pVEGF sobre el tamaño del infarto de miocardio. Una hora después de la ligadura de la descendente anterior, 28 ovejas de $23 \pm 0,5$ kg se agruparon al azar para recibir 10 inyecciones intramiocárdicas de 3,8 mg de pVEGF ($n = 14$) o placebo ($n = 14$) distribuidas en la periferia del infarto. La función miocárdica se estudió con SPECT gatillado y los animales se sacrificaron 7, 10 y 15 días después del tratamiento. El tamaño del infarto fue el 34% menor en el grupo tratado que en el grupo placebo (placebo: $17,1 \pm 2,1\%$; VEGF: $11,2 \pm 1,5\%$; $p < 0,05$) a los 15 pero no a los 10 días. Aunque hubo una leve tendencia a favor del grupo tratado, la mejoría de la función miocárdica no fue diferente entre grupos (placebo: $3,3 \pm 1,4$; VEGF: $3,8 \pm 2,4$; $p = \text{NS}$). El estudio histológico mostró que los mecanismos involucrados fueron la respuesta angiogénica a los 7 días (placebo: 676 ± 31 capilares/ mm^2 ; VEGF: 1925 ± 262 ; $p < 0,05$), la menor fibrosis periinfarto a los 10 días (contenido de colágeno; placebo: $70,1 \pm 1,7\%$; VEGF: $43,5 \pm 4,4\%$; $p < 0,05$); y la proliferación de mioblastos a los 7 y 10 días. La expresión del pVEGF fue positiva a los 3 (ARNm), 7 y 10 días (proteína) posadministración. Conclusión: a los 15, días la transferencia génica de VEGF humano reduce el tamaño de infarto en ovejas mediante angiogénesis, disminución de la fibrosis e inducción de proliferación de mioblastos (miocardiogénesis).

REV ARGENT CARDIOL 2004;72:197-202.

Recibido: 3/2004

Aceptado: 5/2004

Dirección para separatas:

Gustavo Vera Janavel
Universidad y Fundación
Favaloro. Solís 453
(1078) Buenos Aires, Argentina
Tel. (011) 4378-1147;
Fax: (011) 4381-0323 - e-mail:
verajanavel@favaloro.edu.ar

Palabras clave

> Infarto de miocardio - VEGF - Angiogénesis - Miogénesis - Oveja

INTRODUCCIÓN

El infarto miocárdico y su consecuencia, la insuficiencia cardíaca, configuran una de las principales causas de muerte en el mundo occidental. (1) La prevalencia de la falla de bomba posenfermedad coronaria está en aumento debido a que la edad promedio de la población mundial es cada vez mayor. La búsqueda de estrategias para reducir del tamaño de infarto y, por lo tanto, prevenir el remodelamiento ventricular que lleva inexorablemente a la falla contráctil, es de enorme interés y actualidad. El reemplazo de las células muertas por células progenitoras autólogas provenientes de la médula ósea o de la sangre periférica, o por mioblastos del músculo esquelético, son los tres enfoques que más se están investigando en modelos en animales pequeños y grandes y en estudios clínicos en fase I. (2, 3) Si bien los resultados comunicados sugieren que estas intervenciones reducen la exten-

sión de los infartos, aún no se ha comprobado que las células implantadas establezcan conexión funcional con las células preexistentes como para brindar funcionalidad eléctrica y contráctil. (4, 5) Una aproximación más fisiológica al problema consistiría en inducir la replicación de los miocardiocitos sobrevivientes en células hijas, lo cual permitiría que se preserve la conexión funcional de los miocardiocitos hijos con los preexistentes.

Recientemente hemos demostrado que la transferencia génica del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) en la isquemia miocárdica crónica porcina no sólo induce angiogénesis (6) y arteriogénesis, (7) sino también mitosis e hiperplasia de los miocardiocitos. (8, 9) Esto permite formular la hipótesis de que en un modelo de infarto de miocardio este tratamiento reducirá el área necrótica. En el presente trabajo nos hemos propuesto investigar si la inyección intramiocárdica directa de un plásmido codi-

[†] Para optar a Miembro Titular SAC

^A Médico, ^B Profesora de Biología, ^C Doctor en Medicina, ^D Bioquímico, ^E Bióloga, Doctora UBA, ^F Doctor en Química, ^G Licenciada en Biología,

^H Bioquímico, ^I Doctor en Medicina

¹ Departamentos de Fisiología y Patología de la Universidad Favaloro

² Bio Sidus

³ Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular de la Fundación Favaloro

⁴ Comisión de Investigaciones Científicas (CIC)

ficante para VEGF reduce el tamaño del infarto en ovejas sometidas a ligadura aguda de la arteria descendente anterior.

MATERIAL Y MÉTODOS

Plásmido

El vector de expresión eucariótica que contiene el gen codificante para el VEGF humano de 165 aminoácidos (pVEGF) se ha descrito en detalle anteriormente. (6-8) El producto purificado cumple con los estándares internacionales GMP (Bio Sidus, Buenos Aires). La conservación del plásmido en solución se realiza a -70°C .

Preparación quirúrgica

Se operaron ovejas raza Corriedale de sexo masculino y de aproximadamente de $23 \pm 0,5$ kg de peso. Todos los animales se trataron de acuerdo con la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio publicada por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (*NIH publication N° 85-23, revised 1996*). La premedicación anestésica se realizó con maleato de acepromazina (0,5 mg/kg), la inducción con tiopental sódico (10 mg/kg) y el mantenimiento con halotano al 3% en oxígeno. El acceso empleado fue la minitoracotomía izquierda estéril a nivel del cuarto espacio intercostal. Luego de la pericardiotomía, se efectuó la disección y la ligadura de la arteria descendente anterior (en su tercio distal) y de su segunda rama diagonal. (10) Para disminuir la incidencia de arritmias ventriculares se infundieron por vía endovenosa lidocaína (2 mg/kg), amiodarona (150 mg/2 h) y atenolol (2 mg). Una hora después de realizadas las ligaduras, los animales se distribuyeron en dos grupos al azar. A continuación se administraron 2 ml de solución que contenía 1,9 mg/ml de pVEGF (dosis total: 3,8 mg) o placebo (plásmido vacío). La solución se administró mediante 10 inyecciones intramiocárdicas (de 200 μl cada una) distribuidas en la periferia del miocardio isquémico, fácilmente identificable por la cianosis y el comportamiento discinético. Finalmente se cerró la toracotomía por planos.

Protocolo experimental

Las ovejas que cumplieron con el criterio de inclusión (supervivencia al infarto transmural de aproximadamente un 20% del ventrículo izquierdo) ingresaron al estudio (grupo placebo: $n = 14$, grupo tratado: $n = 14$). Los animales se sacrificaron diferidamente (7 días, $n = 6$; 10 días, $n = 10$; 15 días, $n = 12$) mediante una sobredosis de tiopental sódico seguida de un bolo letal de cloruro de potasio. Se extrajo el corazón para su estudio macroscópico e histológico. Además, en 8 animales del subgrupo de 15 días, se estudió la función miocárdica (véase más adelante) en condiciones normales (2 días antes de la operación), a las 24 horas del infarto y al finalizar el protocolo. Al inicio del estudio, un investigador no relacionado con el protocolo realizó la asignación al azar de los animales en grupos y mantuvo oculta la clave hasta finalizados la recolección y el análisis de los datos (diseño con enmascaramiento).

Tamaño del infarto

El corazón se abrió mediante una incisión paralela al surco interventricular posterior, con el fin de poder observar claramente la totalidad del ventrículo izquierdo. Se obtuvieron fotos digitales de la superficie endocárdica y se cuantificó el área total ventricular y el área infartada mediante un *software* de morfometría (Image-Pro Plus 4.1, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE.UU.). El tamaño del infarto se calculó por obtención de la fracción porcentual de ventrículo izquierdo infartado.

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de la varianza
GMP	Good Manufacturing Practice
IHQ	Inmunohistoquímica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pVEGF	Plásmido codificante para VEGF humano de 165 aminoácidos
RT-PCR	PCR con transcripción reversa
SEM	Error estándar de la media
SPECT	Single photon emission computed tomography
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular

Histología

El corazón se fijó por inmersión en solución tamponada de formol al 10%. Se obtuvieron muestras de tejido miocárdico de la zona periinfarto y de la zona alejada que luego se incluyeron en parafina. Las secciones de 4 μm de espesor se tiñeron con rojo Sirio (para identificar colágeno) y con tricrómico. Además se realizó inmunohistoquímica (IHQ) con anticuerpos monoclonales contra diferentes marcadores: actina de músculo liso, antígeno Ki67 (ciclo celular, véase ref. 8), lectina Ulex (células endoteliales), α -actina sarcomérica y conexina 43 (cardiomocitos) y CD68 (monocitos/macrófagos). Para el revelado se emplearon técnicas de biotina-avidina y peroxidasa (BioGenex, San Ramon, CA, EE.UU.). Luego, dos observadores independientes estudiaron las secciones miocárdicas con microscopía óptica convencional y de Nomarski.

El análisis morfométrico se realizó con la ayuda de un sistema de análisis digital de imágenes (Image-Pro Plus). En las secciones teñidas con tricrómico y con IHQ contra lectina Ulex se contaron los capilares en una superficie de 5 mm^2 por muestra y luego se calculó la densidad de capilares (número por mm^2). En las secciones teñidas con rojo Sirio se estimó la fibrosis miocárdica mediante la cuantificación de la fracción porcentual de superficie ocupada por colágeno. Las células en ciclo celular se caracterizaron fenotípicamente según el patrón de doble inmunomarcación.

Función ventricular

La perfusión miocárdica se estudió con tomografía computarizada da por emisión de fotón único (G-SPECT). Los estudios se realizaron en una cámara gamma marca ADAC, modelo Pegasys de doble cabezal y de ángulo variable (ADAC, Milpitas, CA, EE.UU.). Como agente de contraste para perfusión miocárdica se utilizó sestamibi marcado con tecnecio-99m. La función ventricular izquierda se calculó mediante la obtención de imágenes gatilladas con la onda R, por lo cual se utilizó el software de cuantificación QGS de Guido Germano. El análisis de motilidad parietal regional lo realizaron visualmente dos observadores, en forma semicuantitativa, utilizando el modelo de 20 segmentos de Berman (11) y un puntaje (*score*) de motilidad que asignó un valor de 0 a la motilidad normal, 1 a la hipocinesia leve, 2 a la hipocinesia moderada y 3 a la acinesia y a la discinesia.

Expresión génica

En un grupo separado de animales ($n = 6$) se estudió la presencia miocárdica de ARNm (RT-PCR) y proteína (IHQ). Los animales se operaron para recibir 3,8 mg de pVEGF (véase "Preparación quirúrgica"). Se realizaron sacrificios a los 3, 7 y 10 días (dos ovejas por tiempo). Dos animales adicionales recibieron plásmido vacío y se sacrificaron a los 3 días. Para la RT-PCR se realizó la extracción, la cuantificación y la transcripción reversa del ARN (Gibco BRL, Grand Island, NY, EE.UU.) y el tratamiento con DNAsa I (Promega, Madison,

WI, EE.UU.). El cDNA se sintetizó por reacción de RT a partir de 1 µg de ARN total. La reacción de PCR para VEGF humano se realizó con primers específicos. (8) A fin de valorar la integridad y carga de ARN se realizó la amplificación no competitiva de GAPDH. Para el estudio de la histolocalización del VEGF proteico se realizó IHQ con un anticuerpo policlonal contra VEGF humano (BioGenex) revelado con técnica de biotina-avidina-peroxidasa.

Análisis estadístico

Las comparaciones intergrupo se realizaron con el la prueba de la t de Student para datos no apareados. El puntaje de motilidad parietal se analizó con ANOVA no paramétrico de 2 vías (prueba de Friedman). La significación estadística se estableció con valores de p menores de 0,05. Los resultados se expresan como media ± SEM (error estándar de la media).

RESULTADOS

Expresión génica

En los animales tratados con pVEGF, la expresión de ARNm fue positiva a los 3 días postratamiento (n = 2 de 2) y negativa a los 7 y 10 días. La histolocalización de la proteína demostró su presencia en la túnica media de los vasos intramiocárdicos de los animales tratados, a los 7 y 10 días (n = 4; Figura 1). En las ovejas

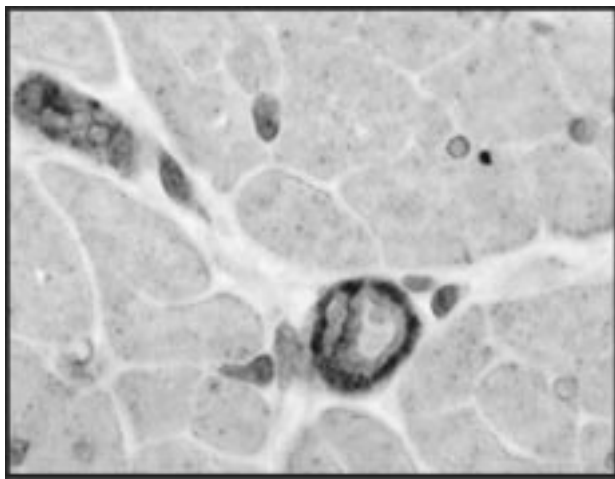
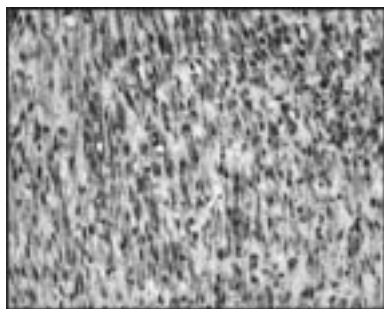


Fig. 1. Expresión de VEGF humano en tejido miocárdico ovino. Mediante inmunohistoquímica se detectó la presencia de la proteína VEGF₁₆₅ en la túnica media de los vasos intramiocárdicos a los 7 y 10 días de la transfección.

Fig. 3. Panel izquierdo: respuesta angiogénica intensa en un animal tratado con plásmido codificante para VEGF₁₆₅ humano. Obsérvense los capilares coloreados en marrón claro. Tinción inmunohistoquímica para lectina Ulex (marcador endotelial). Magnificación original: × 50. Panel derecho: la densidad de estos capilares en animales tratados es casi 3 veces mayor que en los animales placebo.



que recibieron plásmido vacío (n = 2) ambas reacciones fueron negativas.

Tamaño del infarto

El tamaño del infarto fue similar para ambos grupos a los 10 días (placebo: 17,8 ± 2%; VEGF: 18,1 ± 4,5% del total de la superficie ventricular izquierda; p = NS). Sin embargo, a los 15 días, el grupo tratado presentó un infarto significativamente menor que el grupo placebo (placebo: 17,1 ± 2,1%; VEGF: 11,2 ± 1,5%; p < 0,05) (véase Figura 2). La comparación de los valores absolutos de las áreas infartadas arrojó los mismos resultados, tanto a los 10 días (placebo: 10,2 ± 1 cm²; VEGF: 11,1 ± 1,9 cm²; p = NS) como a los 15 días (placebo: 9 ± 1,2 cm²; VEGF: 6 ± 0,9 cm²; p < 0,05).

Histología

Siete días después del infarto, el estudio histológico demostró una densidad de capilares significativamente mayor en el grupo tratado con pVEGF en comparación con el grupo placebo (placebo: 676 ± 31 capilares por mm²; VEGF: 1925 ± 262; p < 0,05). Esta respuesta angiogénica se observó en áreas que se extendían desde el miocardio sano hasta la zona infartada (Figura 3).

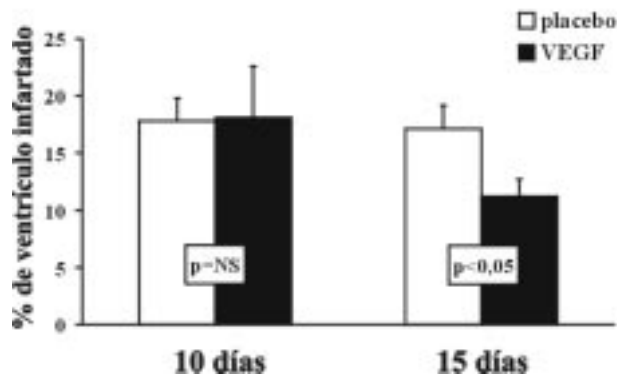
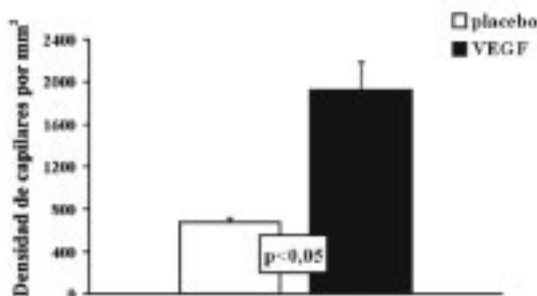


Fig. 2. Tamaño de infarto como porcentaje de la superficie ventricular izquierda a los 10 y a los 15 días de la transfección con plásmido codificante para VEGF₁₆₅ humano. Se observa que a los 10 días los tamaños de los infartos no difieren entre grupos, pero que a los 15 días el grupo tratado tiene un tamaño de infarto el 34% menor que el grupo placebo.



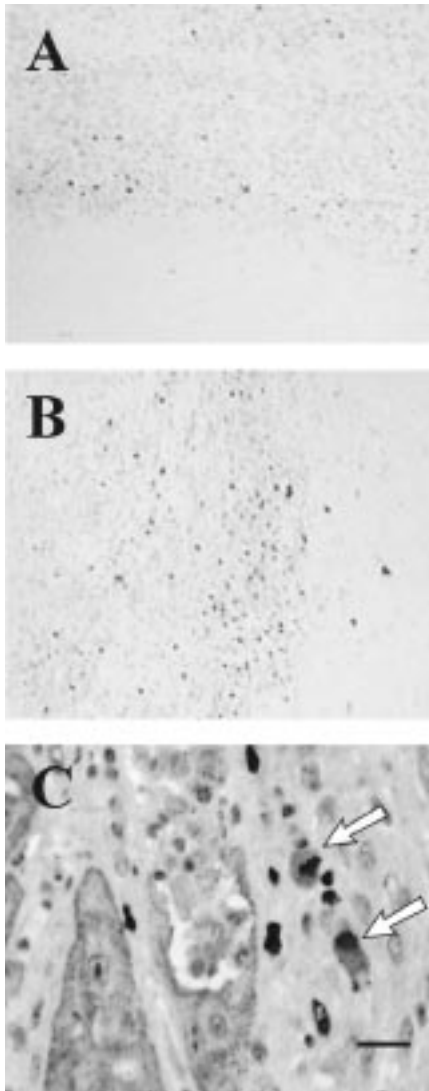


Fig. 4. Células Ki67 positivas en el borde del infarto. Panel A: animal placebo. Panel B: animal transfectado con plásmido codificante para VEGF₁₆₅ humano. Se observa en éste una cantidad tres veces mayor de células en ciclo celular (Ki67 positivas). Magnificación original: $\times 25$. Panel C: las flechas muestran dos células pequeñas en mitosis (cromosomas Ki67 positivos) y positivas para alfa-actina sarcomérica, lo cual indica que se trata de mioblastos. A la izquierda de ellos, se observan dos cardiomiocitos (alfa-actina sarcomérica positivos) adultos en proceso de fagocitosis por macrófagos. Barra = 10 μ m.

Tanto a los 7 como a los 10 días posinfarto, las ovejas tratadas con pVEGF mostraron, en la zona adyacente al área necrótica, una cantidad abundante de células pequeñas (6 a 10 μ m) que se teñían positivamente para Ki67, α -actina sarcomérica y conexina 43, y negativamente para actina de músculo liso y CD68. Muchas de estas células presentaron figuras mitóticas (Figura 4) y ocasionalmente citocinesis, por lo que se caracterizaron como mioblastos. (12) En los animales tratados, estas células fueron 3 veces más abundantes que en las ovejas del grupo placebo. Además, a los 10 días las ovejas tratadas presentaron un contenido menor de colágeno en la zona periinfarto que las ovejas placebo (placebo: $70,1 \pm 1,7\%$; VEGF: $43,5 \pm 4,4\%$; $p < 0,05$) (véase Figura 5). A los 15 días no se observó una diferencia significativa en el índice mitótico de miocardiocitos adultos entre el grupo tratado y el grupo placebo.

Función ventricular

El puntaje de motilidad parietal al día siguiente del infarto fue muy similar en todos los animales (placebo: $10,3 \pm 2$; VEGF: $10,5 \pm 2,6$; $p = \text{NS}$). A los 15 días, el puntaje tampoco mostró diferencias significativas entre grupos (placebo: $7 \pm 1,3$; VEGF: $6,7 \pm 1,2$; $p = \text{NS}$). En ambos grupos, las comparaciones apareadas (resultados obtenidos al día siguiente del infarto *versus* resultados finales) mostraron una tendencia a la mejoría, que *no* alcanzó la significación estadística. Aunque existió una leve tendencia a favor del grupo tratado con pVEGF, el delta de mejoría (función ventricular a los 10 días menos función ventricular a los 15 días) tampoco difirió entre grupos (placebo: $3,3 \pm 1,4$; VEGF: $3,8 \pm 2,4$; $p = \text{NS}$).

DISCUSIÓN

Nuestro trabajo muestra que la inyección intramiocárdica directa de un plásmido codificante para VEGF humano de 165 aminoácidos reduce el tamaño del infarto en un modelo ovino de ligadura aguda de la arteria descendente anterior. El efecto (observado a los 15 días del infarto) consistió en una disminución del área necrótica de aproximadamente un 34% respecto del grupo placebo. Los mecanismos involucrados serían

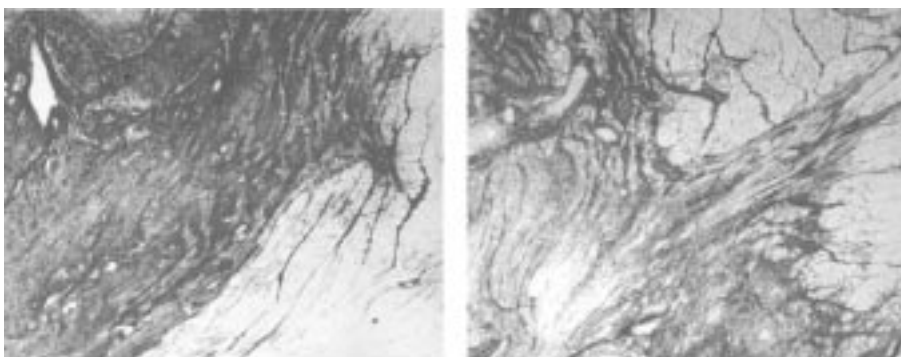


Fig. 5. Vista panorámica del borde del infarto teñido con rojo Sirio. El colágeno del tejido viable periinfarto se observa color rojo. Panel izquierdo: oveja placebo. Panel derecho: oveja tratada con plásmido codificante para VEGF₁₆₅ humano. Nótese en esta oveja la cantidad menor de colágeno. Magnificación original: $\times 25$.

por lo menos tres: una respuesta angiogénica mayor presente a los 7 días del tratamiento, menor fibrosis periinfarto por disminución de la producción de colágeno y la proliferación de mioblastos en la zona vecina al infarto.

En estudios previos hemos demostrado que en un modelo de isquemia miocárdica crónica la transferencia génica de VEGF induce, además de arteriogénesis, mitosis e hiperplasia de los cardiomiocitos. (6-9) En el presente trabajo, las mitosis observadas en miocardiocitos adultos no fueron significativamente más numerosas en el grupo tratado, por lo cual no puede atribuirse a la división de estas células la reducción del área necrótica. Sin embargo, en la zona periinfarto de los animales tratados hallamos focos de pequeños mioblastos que exhibían figuras mitóticas e incluso citocinesis. Con las técnicas disponibles, no podemos discriminar si se trata de mioblastos residentes (12) o de células progenitoras circulantes provenientes de, por ejemplo, la médula ósea, (13) que hicieron nidación en el foco inflamatorio periinfarto y que se diferenciaron hacia la estirpe miocárdica. De cualquier manera, esta observación representa incuestionablemente una respuesta miocardiogénica al VEGF que amerita más estudios.

En cuanto a la proliferación vascular, no es sorprendente haber hallado significativamente más capilares en los animales tratados con pVEGF, ya que el VEGF se considera el mitógeno paradigmático de las células endoteliales. (14) El hecho relevante de esta respuesta fue su precocidad, ya que se ha demostrado que en el infarto agudo de miocardio humano la activación de la angiogénesis es una respuesta tardía y por lo tanto poco eficiente como mecanismo limitador del tamaño del infarto. (15)

La tercera observación realizada en nuestros animales fue un porcentaje menor de colágeno en el tejido periinfarto de los animales tratados. La explicación a este hallazgo no es sencilla, pero sería razonable asumir que las células progenitoras nidadas en la zona del infarto evolucionaron hacia una estirpe fibroblástica en ausencia de VEGF y a mioblastos y células endoteliales en presencia del mismo. (13, 16) Esto explicaría no sólo la mayor cantidad de mioblastos en nuestros animales tratados, sino también la mayor fibrosis observada en el grupo placebo.

Hasta el momento, la mayoría de los estudios dirigidos a sustituir la masa necrótica posinfarto por tejido funcional se han basado en el trasplante de precursores de la médula ósea, de la sangre periférica o del músculo esquelético. (2-5) Si bien se han comunicado resultados alentadores con estas terapéuticas, no se ha podido demostrar aún la existencia de un vínculo entre las células implantadas y el miocardio preexistente, lo cual pone en duda la posibilidad de que ellas participen funcionalmente tanto desde el punto de vista de la conducción eléctrica como de la contracción. (4, 5, 17) Por ejemplo, en un modelo de infarto agudo de miocardio en ratas se comprobó que los mioblastos esqueléticos

implantados en el tejido miocárdico están funcionalmente aislados de las células del huésped. (18) Más aún, ciertos estudios en pacientes comunicaron la incidencia de arritmias ventriculares malignas que exigieron la colocación de cardiodesfibriladores implantables. (19-21) A tal punto se considera relevante esta complicación, que en nuevos protocolos de trasplante de mioblastos esqueléticos es requisito obligatorio que el paciente tenga implantado de antemano un cardiodesfibrilador. (22, 23) Nuestra aproximación conlleva la posibilidad de asegurar una conexión fisiológica (eléctrica y contráctil) entre las células neoformadas y las preexistentes, ya que apunta directamente a la división de células propias del corazón. La falta de cambios significativos en la función ventricular no sorprende, ya que en nuestro modelo experimental ni el tamaño de los infartos ni el tiempo de evolución son compatibles con el desarrollo de remodelación ventricular.

Como ya señalamos, las mitosis de miocardiocitos adultos a 15 días no fueron más numerosas en el grupo tratado. No obstante, la presencia de mioblastos no artificialmente implantados sino nidados en el miocardio, por ejemplo, por un probable efecto quimiotáctico del VEGF, permite pensar que evolucionarán hacia miocardiocitos funcionalmente fisiológicos en su diferenciación ulterior. (12, 13) Ésta es, sin embargo, una presunción especulativa que debe demostrarse a través de un exhaustivo estudio de la función ventricular a más largos plazos.

En conclusión, nuestro trabajo demuestra que la inyección intramiocárdica de un plásmido codificante para VEGF humano de 165 aminoácidos reduce el tamaño del infarto en ovejas sometidas a ligadura de la arteria descendente anterior y propone así a la terapia génica como una alternativa en el tratamiento de enfermedades miocárdicas caracterizadas por la pérdida de masa contráctil.

SUMMARY

Myocardial infarct size reduction after VEGF gene transfer in sheep

In pigs with chronic myocardial ischemia, plasmid-mediated VEGF gene transfer induces, in addition to angiogenesis, an increase of the mitotic index and cardiomyocyte hyperplasia. In the present work, we studied the effect of a VEGF plasmid encoder (pVEGF) on infarct size. One hour after left anterior descending artery ligation, 28 sheep (23±0.5 kg) were randomized to receive 10 intramyocardial injections of pVEGF, total dose 3.8 mg (n=14), or placebo (n=14) surrounding the infarcted zone. Myocardial function was assessed at the onset and end of the study (gated SPECT) and the animals were killed 7, 10 and 15 days after infarction. Infarct size was 34% smaller in the treated group than the in the placebo group (placebo: 17.1±2.1%; VEGF: 11.2±1.5%; p<0.05) at day 15, but not at day 10. The myocardial function improvement tended to be somewhat higher in the treated group than in the placebo group, but the comparison did not yield statistical significance (placebo: 3.3±1.4; VEGF: 3.8±2.4; p=NS). The mechanisms involved in the effect were an angiogenic response observed at day 7

(placebo: 676 ± 31 capillaries per mm^2 ; VEGF: 1925 ± 262 ; $p < 0.05$), a lesser degree of peri-infarct fibrosis (collagen content; placebo: $70.1 \pm 1.7\%$; VEGF: $43.5 \pm 4.4\%$; $p < 0.05$) observed at day 10, and myoblast proliferation observed both at day 7 and 10. VEGF gene expression was positive 3 (mRNA), 7 and 10 days (protein) post-administration. Conclusion: 15 days after transfection, human VEGF gene transfer reduces infarct size in sheep by inducing angiogenesis, decreased fibrosis and myoblast proliferation (cardiomyogenesis).

Key words: Myocardial infarction - VEGF - Angiogenesis - Myogenesis - Sheep

Agradecimientos

Agradecemos a Julio Martínez y Fabián Gauna por la asistencia en las cirugías; a María Besansón, Pedro Iguain y Marta Tealdo por el manejo anestésico; a los técnicos de medicina nuclear Horacio Tallone y Sandro Serafini; y a Juan Ocampo, Juan Mansilla y Osvaldo Sosa por el cuidado de los animales.

Declaración de conflicto de intereses

Cuatro autores (GVJ, CM, AP y MEC) son investigadores de Bio Sidus, la empresa biotecnológica a cargo del desarrollo y producción del plásmido codificante para VEGF utilizado en este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Jessup M, Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med* 2003;348:2007-18.
- Hassink RJ, Brutel de la Riviere A, Mummery CL, Doevendans PA. Transplantation of cells for cardiac repair. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:711-7.
- Chachques JC, Herreros González J, Trainini JC. Cardiomioplastia celular. *Rev Argent Cardiol* 2003;71:138-45.
- Menasché P. Skeletal muscle satellite cell transplantation. *Cardiovasc Res* 2003;58:351-7.
- Bel A, Messas E, Agbulut O, Richard P, Samuel JL, Bruneval P, Hagege AA, Menasché P. Transplantation of autologous fresh bone marrow into infarcted myocardium: a word of caution. *Circulation* 2003;108:II247-52.
- Crottogini A, Cabeza Meckert P, Vera Janavel G, Lascano E, Negroni J, del Valle H, et al. Arteriogenesis induced by intramyocardial vascular endothelial growth factor 165 gene transfer in chronically ischemic pigs. *Hum Gene Ther* 2003;14:1307-18.
- Vera Janavel G, Laguens R, Cabeza Meckert P, del Valle H, Negroni J, Lascano E, et al. Inducción de arteriogenesis mediante la transferencia génica de factor de crecimiento de endotelio vascular de 165 aminoácidos en cerdos crónicamente isquémicos. *Rev Argent Cardiol* 2003;71:23-30.
- Laguens R, Cabeza Meckert P, Vera Janavel G, del Valle H, Lascano E, Negroni J, et al. Entrance in mitosis of adult cardiomyocytes in ischemic pig hearts after plasmid-mediated rhVEGF₁₆₅ gene transfer. *Gene Ther* 2002;9:1676-81.
- Laguens R, Cabeza Meckert P, Vera Janavel G, De Lorenzi A, Lascano E, Negroni J, et al. Cardiomyocyte hyperplasia after plasmid-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer in pigs with chronic myocardial ischemia. *J Gene Med* 2004;6:222-7.
- Millner RW, Mann JM, Pearson I, Pepper JR. Experimental model of left ventricular failure. *Ann Thorac Surg* 1991;52:78-83.
- Hachamovitch R, Berman DS, Kiat H, Cohen I, Cabico JA, Friedman J, et al. Exercise myocardial perfusion SPECT in patients without known coronary artery disease. *Circulation* 1996;93:905-14.
- Urbanek J, Quaini F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B, et al. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10440-5.
- Rafii S, Meeus S, Dias S, Hattori K, Heissig B, Shmelkov S, et al. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:61-7.
- Vera Janavel GL, del Valle HF, Lascano EC, Negroni JA, Linares Casas JC, Crottogini AJ. Angiogenesis terapéutica en la cardiopatía isquémica. *Rev Fed Arg Cardiol* 2001;30:245-61.
- Chung NA, Lydakis C, Belgore F, Blann AD, Lip GY. Angiogenesis in myocardial infarction. An acute or chronic process? *Eur Heart J* 2002;23:1604-8.
- Chintalgattu V, Nair DM, Katwa LC. Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:277-86.
- Laham RJ, Oettgen P. Bone marrow transplantation for the heart: fact or fiction? *Lancet* 2003;361:11-2.
- Léobon B, Garcin I, Menasché P, Vilquin JT, Audinat E, Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7808-11.
- Menasché P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001;357:279-80.
- Menasché 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;41:1078-83.
- Minami E, Reinecke H, Murry CE. Skeletal muscle meets cardiac muscle. Friends or foes? *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1084-6.
- MYOHEART (Myogenesis Heart Efficiency and Regeneration Trial). National Institutes of Health. <http://www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00054678?order=2>
- Autologous Cultured Myoblasts (BioWhittaker) Transplanted via Myocardial Injection. National Institutes of Health. <http://www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00050765?order=1>