

Inducción de arteriogénesis mediante la transferencia génica de factor de crecimiento de endotelio vascular de 165 aminoácidos en cerdos crónicamente isquémicos

GUSTAVO VERA JANAVEL¹, RUBEN LAGUENS^{1,2}, PATRICIA CABEZA MECKERT^{2,3}, HECTOR DEL VALLE¹, JORGE NEGRONI¹, ELENA LASCANO¹, PABLO WERBA^{1,2}, LUIS CUNIBERTI¹, VERONICA MARTINEZ¹, ANDREA DE LORENZI^{2,†}, JUAN M. TELAYNA², JOSE L. FERNANDEZ⁴, LAURA MARANGUNICH⁴, ALBERTO CROTTIGINI¹

RESUMEN

El factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), un angiígeno considerado específico de los endotelios, mejora la perfusión miocárdica en animales y en seres humanos con cardiopatía isquémica. Dado que la perfusión tisular depende principalmente de la irrigación arterial y de que los receptores para VEGF se encontraron recientemente en células musculares lisas, la administración de VEGF debería promover también la arteriogénesis. Nuestro objetivo fue el de estudiar el probable efecto arteriogénico de la administración de un nuevo plásmido codificante para VEGF recombinante humano (pCMVrhVEGF₁₆₅), desarrollado y producido en la Argentina, en cerdos con isquemia miocárdica crónica. Tres semanas después de la colocación de un oclusor Ameroid en la arteria circunfleja, 16 cerdos fueron sometidos a estudios de función miocárdica (ecocardiografía estrés con dobutamina) y distribuidos al azar en un grupo tratado (n = 8) que recibió 10 inyecciones intramiocárdicas de pCMVrhVEGF₁₆₅ (3,8 mg) y un grupo placebo (n = 8) que recibió el plásmido desprovisto del gen. A las 5 semanas se repitió la ecocardiografía, se realizó una cinecoronariografía y se extrajeron el corazón y los tejidos remotos para su análisis histopatológico. La clave se ocultó hasta el fin del análisis estadístico. El grupo tratado presentó, con respecto al placebo, mayor densidad de longitud ($2,4 \pm 0,4$ versus $1,3 \pm 0,3$ mm/mm³; $p < 0,02$) y numérica ($1 \pm 0,1$ versus $0,6 \pm 0,1$ mm⁻², $p < 0,02$) de vasos pequeños (< 50 μm) provistos de túnica muscular lisa evidenciable mediante inmunohistoquímica. No se halló proliferación vascular indeseada en tejidos remotos. Concluimos que en cerdos crónicamente isquémicos la inyección intramiocárdica directa de pCMVrhVEGF₁₆₅ es segura e induce arteriogénesis en el miocardio isquémico.

REV ARGENT CARDIOL 2003; 71: 23-30.

Recibido: 4/2002

Aceptado: 10/2002

Dirección para separatas:

Alberto J. Crottogini -

Universidad Favaloro - Solís 453

(1078) Buenos Aires, Argentina.

Tel. (011) 4378-1164;

Fax: (011) 4381-4959 -

e-mail: crottogini@favaloro.edu.ar

Palabras clave

> Cardiopatía isquémica - VEGF - Angiogénesis - Arteriogénesis - Músculo liso - Cerdos

INTRODUCCIÓN

La angiogénesis terapéutica ha surgido como una alternativa prometedora para el tratamiento de la cardiopatía isquémica. (1) En múltiples trabajos se ha demostrado la capacidad angiogénica de factores de crecimiento (GF) como el FGF (GF fibroblástico) y el VEGF (GF de endotelio vascular). (1, 2) Durante una década, el VEGF se ha considerado el mitógeno más específico de los endotelios, (3) propiedad que lo distinguió clásicamente de los FGF y otros GF. Diferentes estudios demostraron que la administración de VEGF, o del gen codificante para VEGF, induce angiogénesis y mejora la perfusión del miocardio

isquémico, tanto en grandes animales (4-10) como en seres humanos. (11-14) Basados en la especificidad descripta y en el análisis histológico del miocardio de cerdos y perros, esta mejoría se ha atribuido al incremento en el número de vasos colaterales constituidos sólo por una delgada capa de endotelio. (4, 6)

Dado que la perfusión tisular depende principalmente del árbol arteriolar, un incremento de vasos sin capa muscular lisa no necesariamente debería resultar en un incremento del flujo sanguíneo. Muchos autores han enfatizado que las estrategias de revascularización mediante GF deberían estar dirigidas a promover arteriogénesis. (15, 16) Los vasos con capa muscular lisa responden al control del tono vascular

[†] Para optar a Miembro Titular SAC

¹ Departamentos de Fisiología y Patología de la Universidad Favaloro

² Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular de la Fundación Favaloro

³ Comisión de Investigaciones Científicas (CIC)

⁴ Bio Sidus

y por lo tanto participan de la autorregulación coronaria. Además, son más estables y menos compresibles.

Al mismo tiempo, se han evidenciado receptores para VEGF en otros tipos celulares e incluso se han descrito nuevas acciones de este GF sobre otras células. (17-21) Más específicamente, se han encontrado receptores para VEGF en células del músculo liso vascular y se ha demostrado el efecto quimiotáctico del VEGF sobre estas células. (19-21) Es, por lo tanto, razonable presumir que la mejoría en la perfusión inducida por el VEGF y comunicada por otros autores podría no sólo deberse a la proliferación de vasos endoteliales simples (angiogénesis) sino también a la proliferación de vasos con túnica media muscular (arteriogénesis). El fracaso de otros estudios para evidenciar claramente este efecto potencial puede haberse debido, al menos en parte, al uso de técnicas que no permiten la identificación de células musculares lisas en la pared vascular.

En el presente trabajo estudiamos el efecto de la administración intramiocárdica directa de un nuevo plásmido codificante para VEGF₁₆₅ recombinante humano en un modelo porcino de isquemia miocárdica crónica, centrándonos en la neoformación de vasos con capa muscular mediante inmunotinción de la α -actina del músculo liso vascular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Plásmido

El vector de expresión eucariótica consistió en un plásmido de 4.8 Kb que incluye el gen codificante para VEGF₁₆₅, regulado transcripcionalmente por el promotor/enhancer del citomegalovirus. En posición 3' al gen codificante, se encuentra una señal de terminación poli-A (SV40). La preparación, la purificación y los análisis de control de calidad del plásmido, obtenido a partir de cultivos de cepas transformadas de *Escherichia coli*, se realizaron en condiciones GMP (Bio Sidus, Buenos Aires, Argentina). El plásmido purificado (pCMVrhVEGF₁₆₅) se conservó a -70°C.

Preparación quirúrgica

Se operaron cerdos Landrace de ambos sexos y de 27 ± 2 kg. Todos los animales fueron tratados de acuerdo con la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio publicada por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (*NIH publication N° 85-23, revised 1996*). La premedicación anestésica se realizó con maleato de acepromacina (0,3 mg/kg), la inducción con tiopental sódico (20 mg/kg) y el mantenimiento con enflurano al 3%. Se realizó una minitoracotomía izquierda estéril a nivel del 4^{to} espacio intercostal. Se disecó la arteria coronaria circunfleja (Cx) en su porción proximal y se colocó un ocluser coronario progresivo (Ameroid Constrictor, Research Instruments). Finalmente se cerró el tórax por planos.

Protocolo experimental

A las 3 semanas de la primera operación, tiempo en que los oclusores Ameroid se ocluyen completamente, los cerdos fueron sometidos a estudios pretratamiento de función miocárdica (ecocardiografía) en reposo y bajo apremio farmacológico (véase Función miocárdica). Los animales que cum-

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Cx	Arteria coronaria circunfleja
FC	Frecuencia cardíaca
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GF	Factores de crecimiento
IMP	Índice de motilidad parietal
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
VI	Ventrículo izquierdo

plieron con el criterio de inclusión (disfunción sistólica de al menos un segmento del territorio miocárdico correspondiente a la Cx) fueron distribuidos al azar en dos grupos y reoperados. Cada grupo experimental estuvo conformado por 4 machos y 4 hembras. Se empleó el mismo protocolo de anestesia general de la primera cirugía y se reabrió la toracotomía anterior en condiciones de asepsia. Los cerdos del grupo tratado (n = 8) recibieron 2 ml de solución que contenía 1,9 mg/ml de pCMVrhVEGF₁₆₅ (dosis total 3,8 mg) repartidos en 10 inyecciones intramiocárdicas de 200 μ l cada una. Los cerdos del grupo placebo (n = 8) recibieron inyecciones de la misma cantidad de solución que contenía el plásmido desprovisto del gen. Las inyecciones se distribuyeron en la cara anterolateral de ventrículo izquierdo (VI).

Cinco semanas más tarde se estudió nuevamente la función miocárdica y se realizó una cinecoronariografía. Luego los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de tiopental sódico seguida de un bolo endovenoso de cloruro de potasio. El contenido de la solución inyectada y el grupo asignado a cada cerdo no estuvieron en conocimiento de los investigadores involucrados en todas las etapas experimentales, incluidos la recolección y el análisis de los datos. La clave permaneció oculta hasta finalizados los experimentos y la comparación estadística de los resultados.

Función miocárdica

La evaluación de la función miocárdica se efectuó mediante ecocardiografía bidimensional (Sonos 5500, Hewlett Packard), en condiciones de reposo y bajo apremio farmacológico (dobutamina). Los animales fueron sedados con dosis suficientes de tiopental sódico y monitoreados electrocardiográficamente. Una vez estabilizada la frecuencia cardíaca (FC) se realizó el estudio en condiciones de reposo. A continuación se infundió dobutamina por vía endovenosa en dosis crecientes (5, 10, 20, 30, 40 y 50 μ g/kg/min, en etapas de 3 minutos) hasta alcanzar una FC que superara en un 50% la FC basal. Una vez alcanzada la FC máxima prevista se reestudió la función miocárdica.

Las imágenes se adquirieron en cuatro vistas: eje largo paraesternal derecho, eje corto a nivel basal, eje corto a nivel medio y una vista no convencional de cuatro cámaras en un plano paraesternal bajo. El VI se dividió en 16 segmentos según recomendaciones de la *American Society of Echocardiography*. (22) El análisis de la motilidad segmentaria fue realizado por dos observadores independientes mediante la evaluación del engrosamiento parietal y la excursión endocárdica sistólica. A cada segmento se le asignó un índice de motilidad parietal (IMP) siguiendo un puntaje de 5 puntos (de 0 a 4: ininterpretable, normocinesia, hipocinesia, acinesia y discinesia). Los índices se prome-

diaron para obtener el IMP regional (8 segmentos), correspondiente al territorio de la Cx, y el IMP global (16 segmentos).

Coronariografía

La presencia de colaterales macroscópicas ($> 200 \mu\text{m}$ de diámetro) se evaluó mediante cinecoronariografía (Angioskop D, Siemens) bajo sedación con tiopental sódico. Se realizó el cateterismo selectivo de la coronaria izquierda. Los angiogramas se obtuvieron con la inyección de 2 a 4 ml/seg de contraste (Iopamiron 370, Nihon Schering) y luego se registraron en películas de 35 mm (VariCath, Varix). En todos los casos se empleó nitroglicerina intracoronaria ($200 \mu\text{g}$). Dos observadores independientes realizaron la cuantificación de la circulación colateral homocoronaria con el empleo del índice de Rentrop. (23)

Histología

Luego del sacrificio, se extirpó el corazón. También se recolectaron muestras de órganos remotos (hígado, riñón, pulmón, retina, gónadas y músculo esquelético). La aorta se canuló y el corazón se fijó por retroperfusión a 100 mm Hg con solución salina heparinizada y luego con solución de formaldehído al 10% en buffer fosfato (pH 7,2). Los tejidos remotos y el VI completo se sumergieron en formaldehído durante 48 horas. Posteriormente se obtuvo una rodaja transversal de 5 mm de espesor de la zona media del VI, equidistante del anillo mitral y de la punta y comprendiendo la pared libre y el septum. Esta porción se eligió para limitar el análisis histológico a territorios manifiestamente perfundidos por sólo un vaso coronario (descendente anterior, Cx o coronaria derecha). La rodaja se dividió en 6 fragmentos (de 1 a 6: septum posterior, pared posterior, pared lateroposterior, pared lateral, pared anterior y septum anterior) que se incluyeron en Histowax®. A partir de cada fragmento se obtuvieron cortes histológicos de $5 \mu\text{m}$ de espesor que fueron coloreados con a) hematoxilina-eosina, b) tricómico de Masson y c) inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales anti- α -actina de músculo liso (BioGenex) contracolorada con hematoxilina.

Para el análisis cuantitativo de la neovascularización se consideraron los vasos con diámetro de entre 8 y $100 \mu\text{m}$. Debido a que la distribución de estos vasos en el miocárdio fue focal, el estudio morfométrico se realizó en la totalidad del área de la sección obtenida del VI.

Para determinar el número y los diámetros mayor y menor de los vasos se empleó un sistema digital de análisis de imágenes (Vidas, Kontron Elektronik). Los índices calculados con estos datos fueron la densidad numérica de colaterales (N_c) y la densidad de longitud de colaterales (L_c).

N_c se calculó como el cociente entre el número total de vasos y la superficie del corte histológico en mm^2 . L_c se calculó con una metodología desarrollada para el análisis de vasos orientados en forma variada. (24) Para n vasos contados en el área A, la L_c , expresada en mm por unidad de volumen (mm/mm^3), es igual a la suma de los cocientes (R) entre el diámetro mayor y el diámetro menor de cada vaso, de acuerdo con la fórmula:

$$L_c(\text{mm} / \text{mm}^3) = 1/A \sum_{i=1}^n R_i = (R_1 + R_2 + R_3 + \dots R_n) / A$$

donde A es el área total, n es el número total de vasos y R es el cociente para cada vaso.

Los índices calculados para cada fragmento se promediaron para obtener un dato representativo del área isquémica (territorio de la Cx: fragmentos 3, 4 y 5), y otro del área no isquémica (fragmentos 1, 2 y 6).

En cada corazón se examinó además el tramo proximal de la Cx para constatar el cierre completo del Ameroid.

Estudios moleculares

La presencia del plásmido y su expresión se estudiaron en cerdos adicionales mediante las técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y RT-PCR (PCR con transcripción reversa), respectivamente. Se realizó la administración intramiocárdica de pCMVrhVEGF₁₆₅. Los sacrificios se realizaron a 3, 10, 16 y 35 días postratamiento ($n = 2$ para cada momento) y se recolectaron muestras de tejido miocárdico y de órganos remotos. Dos cerdos control recibieron plásmido desprovisto del gen y se estudiaron a los 10 días de la administración.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con la prueba de la t de Student para datos no apareados (comparaciones intergrupo). Valores de p menores de 0,05 se consideraron indicativos de diferencias estadísticamente significativas. Los resultados se expresan como media \pm EEM (error estándar del promedio).

RESULTADOS

Estudios moleculares

En corazones tratados con pCMVrhVEGF₁₆₅, la reacción de RT-PCR fue positiva a los 3 ($n = 1/2$), 10 ($n = 2/2$) y 16 ($n = 1/2$) días postransfección (Figura 1). A los 35 días ($n = 2$) de la administración de pCMVrhVEGF₁₆₅ y en los corazones que recibieron el plásmido desprovisto del gen, la reacción de RT-PCR fue negativa. En todos los órganos remotos la PCR fue negativa, excepto en la retina y músculo esquelético de un animal (a 16 días postratamiento). Sin embargo, la RT-PCR fue positiva *sólo* en el músculo esquelético.

Función miocárdica

Los valores pretratamiento de los IMP regional y global fueron prácticamente idénticos en ambos grupos. A 5 semanas del tratamiento, el IMP regional y el IMP global mostraron una leve tendencia a mejorar en el grupo placebo. Sin embargo, en ningún caso las diferencias entre ambos grupos alcanzaron significación estadística (Tabla 1).

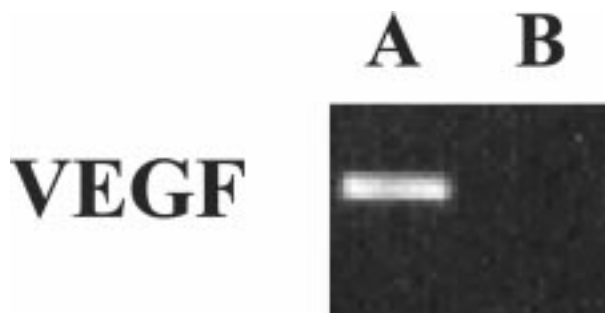


Fig. 1. RT-PCR. La expresión máxima ocurrió a 10 días de la inyección. Calle A: corazón inyectado con pCMVrhVEGF₁₆₅. Calle B: corazón inyectado con placebo (plásmido desprovisto de gen).

Tabla 1
Función ventricular evaluada 5 semanas luego del tratamiento. Índice de motilidad parietal obtenido mediante ecocardiografía estrés

	VEGF		Placebo	
	Reposo	Estrés	Reposo	Estrés
Regional	1,58 ± 0,15	1,48 ± 0,16	1,23 ± 0,12	1,17 ± 0,12
Global	1,32 ± 0,09	1,27 ± 0,1	1,12 ± 0,06	1,09 ± 0,06

Coronariografía

Se constató la oclusión completa del Ameroid en todos los cerdos. En el 94% de los animales se observó la presencia de circulación colateral epicárdica alrededor del Ameroid, que produjo un llenado de grado III del lecho distal de la Cx. El índice de Rentrop para circulación colateral homocoronaria no mostró diferencias entre grupos (tratado: 3 ± 0 ; placebo $2,6 \pm 0,4$; $p = \text{NS}$).

Histología

En todos los cerdos se constató la oclusión completa de la Cx. En los cerdos tratados no se evidenciaron angiogénesis o arteriogénesis indeseada en tejidos remotos.

El área estudiada en los cortes histológicos de cada corazón fue de $1.448,3 \pm 199,6 \text{ mm}^2$ en el grupo tratado y de $1.243,2 \pm 135,5 \text{ mm}^2$ en el grupo placebo ($p = \text{NS}$). Dado que las áreas fibróticas o con tejido de granulación presentaron, como era esperable, neovascularización con arteriogénesis, el análisis morfométrico se realizó exclusivamente en el tejido miocárdico indemne remanente. De todas maneras, la superficie de las áreas excluidas del análisis no superó el 15% de la superficie total de tejido estudiado.

En la Tabla 2 se muestran los valores de Nc y Lc de arteriolas con diámetro menor de $100 \mu\text{m}$ en el área isquémica miocárdica. No se observaron diferencias significativas entre grupos, a pesar de la tendencia pronunciada a favor del grupo tratado. Sin embargo, debido a la gran predominancia de pequeñas arteriolas, la estratificación de los datos se realizó en dos subgrupos de acuerdo con el diámetro vascular ($8\text{-}50 \mu\text{m}$ y $51\text{-}100 \mu\text{m}$). Observamos que el tejido miocárdico isquémico de los cerdos tratados presentó mayor Nc y Lc de arteriolas de entre 8 y $50 \mu\text{m}$. La Figura 2 muestra ejemplos de pequeñas arteriolas (arteriogénesis) en el miocardio de un cerdo tratado con pCMVrhVEGF₁₆₅.

En resumen, se evidenció una cantidad mayor (67%) de arteriolas en el grupo tratado que en el grupo placebo. Además, estas arteriolas fueron un 92% más largas (Tabla 2 y Figura 3).

En contraste, no se apreciaron diferencias significativas cuando se analizaron los vasos de entre 51 y $100 \mu\text{m}$ de diámetro (Tabla 2). En el área no isquémica, tampoco se observaron diferencias entre grupos en las densidades de colaterales de cualquier diámetro.

DISCUSIÓN

Neoformación arteriolar

Nuestro estudio es el primero en demostrar la inducción significativa de arteriogénesis miocárdica mediante VEGF en mamíferos grandes con isquemia cardíaca crónica. Este efecto consistió en el crecimiento (en número y longitud) de vasos coronarios pequeños con capa muscular lisa en su túnica media.

Estudios previos de neoformación vascular inducida por VEGF en mamíferos grandes no informaron proliferación arteriolar. Esto puede deberse, al menos en parte, al uso de técnicas de tinción que no permiten la fácil identificación de células musculares lisas que rodean la túnica íntima. (4, 6) En el presente estudio usamos un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la α -actina del músculo liso vascular y que nos permitió identificar fácilmente, mediante inmunohistoquímica y análisis digital de imágenes, las arteriolas sin posibilidad de error. Otra razón que explicaría la diferencia con estudios anteriores podría ser la dosis empleada. Debido a que los efectos del VEGF son dosis-dependientes, (25-27) el uso de dosis superiores en nuestro estudio puede haber resultado en un efecto arteriogénico no observado por otros autores.

La arteriogénesis es un efecto no esperable para un GF con actividad mitogénica específica sobre los endotelios. (28) Sin embargo, algunos estudios han

Tabla 2
Densidad arteriolar en el miocardio isquémico 5 semanas luego del tratamiento

	Densidad numérica (mm^{-2})			Densidad de longitud (mm/mm^3)		
	VEGF	Placebo	p	VEGF	Placebo	p
8-100 μm	2,5 ± 0,3	1,8 ± 0,2	0,06	5,8 ± 0,9	4,3 ± 0,6	0,1
8-50 μm	1 ± 0,1	0,6 ± 0,1	< 0,02	2,5 ± 0,4	1,3 ± 0,3	< 0,02
51-100 μm	1,5 ± 0,2	1,2 ± 0,1	0,2	3,3 ± 0,5	3 ± 0,4	0,3

Fig. 2. Inmunohistoquímica contra α -actina de músculo vascular en cortes histológicos del miocardio de un cerdo tratado con pCMVrhVEGF₁₆₅. Obsérvense los vasos coronarios con capa muscular lisa en su túnica media (arteriogénesis). Panel A: microscopía óptica convencional (barra = 40 μ m). Panel B: microscopía con óptica de Nomarski (barra = 40 μ m).

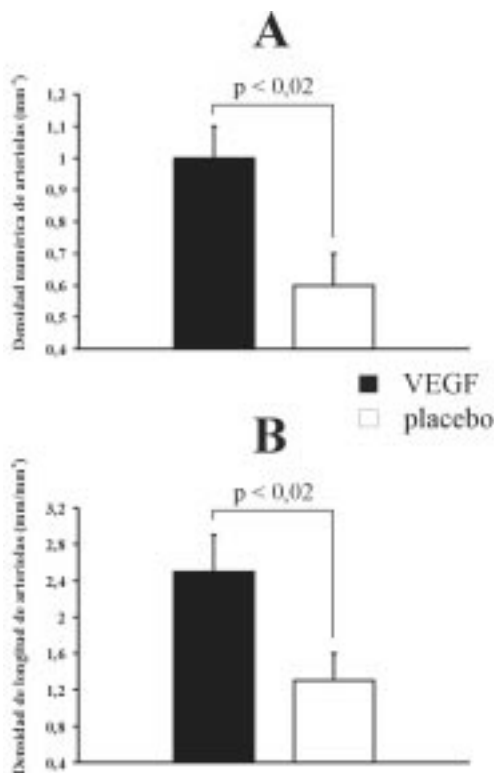
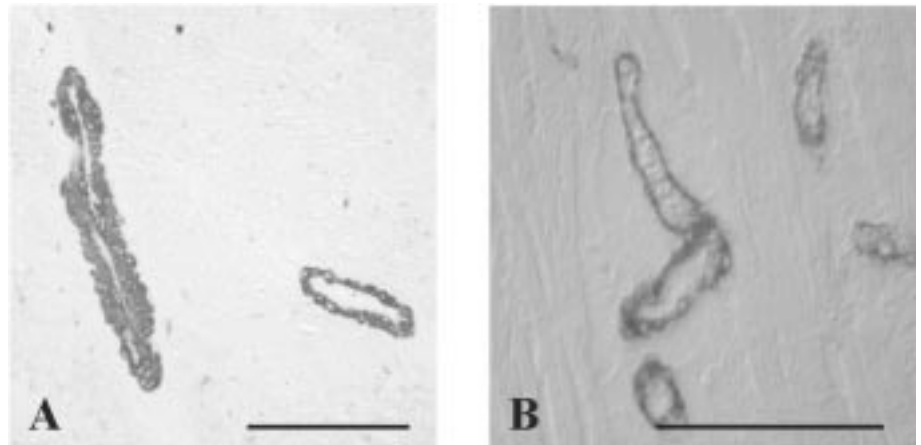


Fig. 3. Densidad numérica (panel A) y densidad de longitud (panel B) de colaterales pequeñas (8-50 mm de diámetro) con músculo liso vascular. Se observa la diferencia significativa a favor del grupo tratado con pCMVrhVEGF₁₆₅.

cuestionado esta especificidad descrita clásicamente para el VEGF. Capogrossi y colaboradores, estudiando la cicatrización de heridas en ratones diabéticos, encontraron una longitud mayor de pequeñas arteriolas (4 a 41 μ m) en el grupo tratado con aplicación tópica de adenovirus que contenían el gen codificante para VEGF₁₆₅. (29) En ratones transgénicos desprovistos de las isoformas 164 y 188 del VEGF, Carmeliet y colabo-

radore hallaron una densidad menor de vasos coronarios teñidos con inmunohistoquímica para α -actina de músculo liso; además, los vasos mostraron una tinción más débil en comparación con los vasos coronarios de ratones normales. (30) En el corazón de ratas infartadas y transfectadas con el plásmido codificante para VEGF₁₆₅, Schwarz y colaboradores comunicaron que algunos de los vasos neoformados contenían células musculares lisas en su túnica media. (31) Su y colaboradores publicaron observaciones similares: evidenciaron que en el miocardio isquémico de ratones transfectados con virus adeno-asociados que contenían el gen codificante para VEGF₁₆₅ los pequeños vasos neoformados estaban recubiertos por unas pocas capas de músculo liso. (32) Tomanek y colaboradores inyectaron el FGF básico (FGFb) y anticuerpos anti-VEGF en ratas neonatas y concluyeron que, a pesar de que el crecimiento arteriolar depende del FGFb, el VEGF desempeña algún papel en colaboración con el FGFb en la neoformación arteriolar y en el establecimiento de la jerarquía del árbol arteriolar coronario. (33) Además, tal como se enfatiza en un editorial referido a ese trabajo, debido a que es imposible saber en qué grado un anticuerpo neutraliza a un GF, la participación del VEGF en la formación arteriolar se podría estar subestimando. (34) Si los hallazgos de Tomanek y colaboradores fuesen aplicables a nuestros cerdos, y teniendo en cuenta que la isquemia promueve la neosíntesis de FGFb, una explicación posible para la arteriogénesis observada es que el VEGF interactuó con el FGFb endógeno para inducir la neoformación arteriolar.

El mecanismo íntimo de la arteriogénesis inducida por el VEGF no puede explicarse con nuestros datos. El VEGF pudo haber facilitado la migración de células musculares lisas mediante la producción de metaloproteinasas, (19) y/o mediante el estímulo quimiotáctico sobre estas células, en las que se ha demostrado la presencia de los receptores específicos para el VEGF (20, 21) El VEGF pudo, además, haber promovido la quimio-

taxis de monocitos, (17) que están directamente implicados en el proceso arteriogénico. (35)

Por otra parte, y dado que los endoteliositos reclutan precursores de células musculares lisas, el VEGF pudo haber inducido la expresión de factores de reclutamiento como el GF derivado de plaquetas (PDGF-BB). (36)

Dado que nuestro estudio no fue diseñado para evaluar los procesos involucrados en el efecto biológico del VEGF, las consideraciones precedentes son estrictamente especulativas. No obstante, y en concordancia con datos previos, nuestros resultados cuestionan categóricamente la especificidad del VEGF como mitógeno de células endoteliales y revelan su potencial arteriogénico en la isquemia miocárdica crónica.

Función miocárdica

A pesar del incremento de colaterales en el grupo tratado, la función miocárdica evaluada por ecocardiografía de estrés no demostró diferencias significativas entre grupos. Dado que esperamos solamente 5 semanas para estudiar el efecto del tratamiento, pudo haber existido cierto grado de atontamiento miocárdico en el momento de la evaluación. Es importante mencionar que la cirugía de revascularización miocárdica, un procedimiento que reperfunde el miocardio inmediatamente, induce la mejoría de sólo el 30% de los pacientes a 2 meses. En efecto, dado que la expresión génica máxima ocurrió alrededor del día 10 postransfección, la restauración del flujo sanguíneo por parte de la arteriogenesis inducida debe haber ocurrido pocos días antes del estudio funcional. Por lo tanto, es razonable presumir que en ese momento el miocardio todavía estaba atontado. En un modelo similar al nuestro, otros autores encontraron mejoría de la función miocárdica 5 a 6 semanas después de la administración del VEGF proteico. (5, 6) Con tiempos de seguimiento más cortos, incluso con la administración de la forma proteica del VEGF, los resultados funcionales son controvertidos: mientras que López y colaboradores comunicaron mejoría en la fracción de engrosamiento parietal, (7) Sato y colaboradores no pudieron encontrar cambios funcionales luego del tratamiento. (10) Con el uso de plásmido codificante para el VEGF₁₆₅ en cerdos isquémicos, Tio y colaboradores no encontraron mejoría en la fracción de eyección 4 semanas después de la inyección intramiocárdica directa. (9) Más aún, Sayeed-Shah y colaboradores observaron que el 50% de sus cerdos presentaron anomalías en la motilidad parietal 6 semanas después de la inyección de plásmido codificante para VEGF₁₆₅. (37) En cambio, Mack y colaboradores hallaron mejoría de la fracción de engrosamiento parietal 4 semanas después de la transfección con adenovirus que contenían el gen codificante para el VEGF₁₂₁. (8) Sin embargo, el uso de vectores adenovirales puede haber dado por resultado una mayor eficiencia de transfección. De hecho, en otro estudio realizado más tarde, estos autores no observaron ninguna mejoría en la función ventricular 4 semanas luego

del mismo tratamiento. En conclusión, no hay evidencias concretas de una mejoría precoz de la función ventricular luego del tratamiento con VEGF. Nuestros hallazgos, por lo tanto, no difieren de lo comunicado por algunos autores y la hipótesis del atontamiento miocárdico debería ser confirmarse o descartarse con tiempos de seguimiento más prolongados.

Coronariografía

La evaluación de la circulación colateral visible angiográficamente no mostró diferencias entre grupos. Sin embargo, dado que no realizamos una angiografía pretratamiento, no podemos afirmar si hubo diferencias intragrupalas en el desarrollo de colaterales. Tio y colaboradores calcularon, en un estudio similar, las diferencias entre el índice de Rentrop pretratamiento y postratamiento y encontraron que la diferencia promedio era significativamente mayor en el grupo tratado. (9) Transfectando el gen codificante para el VEGF₁₂₁, Mack y colaboradores encontraron índices de Rentrop significativamente mayores en los cerdos tratados. (8) Sin embargo, dada la realización de angiogramas "ex vivo" y el empleo de vectores adenovirales, sus resultados no son estrictamente comparables con los nuestros. De todas maneras, el tamaño de las arteriolas neoformadas en nuestros cerdos está muy por debajo del límite de resolución de la angiografía convencional y por lo tanto es esperable que no se visualicen con este método.

Seguridad

En tejidos remotos, el análisis con PCR demostró la presencia de ADN plasmídico solamente en 2 de 48 muestras (retina y músculo esquelético), ambas del mismo animal. Cuando se evaluó la expresión del plásmido, la reacción de RT-PCR fue positiva *única*mente en el músculo esquelético donde se detectó el plásmido. Esto pudo haber sido la consecuencia de la administración intravascular accidental del plásmido en ese cerdo. Sin embargo, en *ninguno* de los órganos remotos estudiados de los cerdos tratados con pCMVrhVEGF₁₆₅ se encontró evidencia histológica de neoangioarteriogenesis, tanto a los 35 días (n = 10) como a los 3, 10 y 16 días (n = 2 para cada tiempo). Cabe señalar que actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos con terapia génica *intravascular*, en los cuales, a pesar de que el agente llega en mayor o menor medida a todos los tejidos, no se han comunicado efectos adversos en órganos remotos. (38)

Dado que el VEGF posee distintas actividades biológicas en diferentes concentraciones y que pueden ocurrir complicaciones dosis-dependientes, (27, 31, 39) se ha recomendado el monitoreo cuidadoso de las dosis empleadas. (26) Por lo tanto, es importante enfatizar que con las dosis empleadas, más elevadas que las de estudios similares, en ningún caso observamos hemangiomas, extravasación patológica o edemas.

A pesar de que los presentes resultados indican un buen perfil de seguridad de la vía de administración y del plásmido empleado, la evaluación minuciosa de

patologías subyacentes que contraindican la terapia angiogénica (retinopatía proliferativa, cáncer, etc.) es obligatoria en pacientes pasibles de inclusión en estudios clínicos. (1)

Implicaciones clínicas

Los vasos con capa muscular lisa poseen ventajas importantes sobre los vasos compuestos por una simple capa endotelial. Algunos autores sostienen que las estrategias dirigidas a la inducción de neoformación vascular deberían promover principalmente la arteriogénesis. Dado que es el árbol arteriolar el que controla la perfusión tisular, un incremento aislado de vasos sin túnica media no necesariamente resultaría en una mejoría del flujo sanguíneo. (15, 16) Se ha demostrado que los vasos neoformados son estabilizados por la adherencia y la acumulación de pericitos y células musculares lisas, ambas inducidas por el VEGF. (15, 40) Además, los vasos con capa muscular lisa son los que responden a estímulos fisiológicos involucrados en la autorregulación coronaria. Adicionalmente, estos vasos son más estables, menos propensos a involucionar y menos compresibles por la contracción sistólica.

En la piel se ha comprobado que la transferencia génica local del VEGF mediante vectores adenovirales induce una respuesta angiogénica, pero solamente los vasos que se conectan con la vasculatura funcional preexistente son recubiertos por células musculares lisas y sobreviven. (25) Los autores concluyen que estos vasos con capa muscular son los que podrían ser clínicamente útiles para revertir la isquemia.

A pesar de que las estrategias terapéuticas que combinan diferentes GF reproducirían más fielmente el desarrollo natural de vasos sanguíneos, nuestros datos sugieren que la transferencia génica de sólo VEGF es suficiente para la generación de vasos con capa muscular lisa. Recién cuando esté disponible el análisis histológico de corazones humanos tratados con VEGF sabremos si la mejoría observada en la tolerancia al esfuerzo y en la perfusión miocárdica (11-14) está asociada o no con el desarrollo de una red arteriolar inducida por la terapia.

CONCLUSIONES

En cerdos con isquemia miocárdica crónica la transferencia de plásmido codificante para el VEGF₁₆₅ es segura y promueve arteriogénesis. Estas observaciones apoyan la utilidad de esta terapia en pacientes con enfermedad coronaria sintomática refractaria al tratamiento convencional.

Agradecimientos

Agradecemos a los técnicos Julio Martínez, Fabián Gauna y Luis Palacios por su ayuda en las cirugías y en el análisis morfológico. También agradecemos a los veterinarios María Inés Besansón, Pedro Iguain y Marta Tealdo y a sus asistentes Juan Ocampo, Osvaldo Sosa y Juan Carlos Mansilla por el cuidado de los animales.

SUMMARY

Arteriogenesis induced by vascular endothelial growth factor 165 gene transfer in chronically ischemic pigs

Vascular endothelial growth factor (VEGF), an endothelial cell-specific angiogen, improves myocardial perfusion in large animals and humans with chronic myocardial ischemia. Since tissue perfusion is mainly dependent upon the arteriolar tree and VEGF receptors have been shown to be present in vascular smooth muscle cells, VEGF administration should also promote arteriogenesis. We thus investigated the hypothetical arteriogenic effect of intramyocardial administration of a new plasmid encoding for recombinant human VEGF (pCMVrhVEGF₁₆₅), developed and produced in Argentina, in a pig model of chronic myocardial ischemia. Three weeks after positioning of an Ameroid constrictor in the left circumflex coronary artery, 16 pigs underwent myocardial function studies (echocardiography) at rest and under pharmacological challenge (dobutamine), and were then randomized into a treated group (n=8) that received 10 direct intramyocardial injections of pCMVrhVEGF₁₆₅ (3.8 mg) and a placebo group (n=8) that received plasmid devoid of gene. Five weeks later, function studies were repeated, a coronary angiography was performed and the heart and remote tissues were removed for histological analysis. All experimental steps were done in a blinded fashion. Treated pigs showed, as compared with placebo pigs, significantly higher length density (2.4 ± 0.4 vs. 1.3 ± 0.3 mm/mm³; $p < 0,02$) and numerical density ($1 \pm 0,1$ vs. $0,6 \pm 0,1$ mm⁻²; $p < 0,02$) of small (< 50 mm in diameter) vessels with smooth muscle layer (immunohistochemistry). No evidence of undesired neovascular proliferation was found in remote tissues. We conclude that direct intramyocardial injection of pCMVrhVEGF₁₆₅ in chronically ischemic pigs is safe and induces arteriogenesis.

Key words: Ischemic heart disease - VEGF - Angiogenesis - Arteriogenesis - Smooth muscle - Pigs

BIBLIOGRAFIA

1. Vera Janavel GL, del Valle HF, Lascano EC, Negroni JA, Linares Casas JC, Crottogini AJ. Angiogénesis terapéutica en la cardiopatía isquémica. *Rev Fed Arg Cardiol* 2001;30:245-61.
2. Del Valle HF, Vera Janavel GL, Capogrossi MC, Gaetano C, Illi B, Lascano EC. Efecto angiogénico de la inyección intramiocárdica de plásmido codificante para factor de crecimiento fibroblástico ácido recombinante humano en cerdos crónicamente isquémicos. *Rev Fed Arg Cardiol* 2002;31:74-81.
3. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-8.
4. Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, Lazarous DF, Scheinowitz M, Biro S, et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* 1994;89:2183-9.
5. Pearlman JD, Hibberd MG, Chuang ML, Harada K, López JJ, Gladstone SR, et al. Magnetic resonance mapping demonstrates benefits of VEGF-induced myocardial angiogenesis. *Nat Med* 1995;1:1085-9.
6. Harada K, Friedman M, López JJ, Wang SY, Li J, Prasad PV, et al. Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol* 1996;270:H1791-H1802.
7. López JJ, Laham RJ, Stamler A, Pearlman JD, Bunting S, Kaplan A, et al. VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs. *Cardiovasc Res* 1998;40:272-81.
8. Mack CA, Patel SR, Schwarz EA, Zanzonico P, Hahn RT, Iltercil A, et

- al. Biologic bypass with the use of adenovirus-mediated gene transfer of the complementary deoxyribonucleic acid for vascular endothelial growth factor 121 improves myocardial perfusion and function in the ischemic porcine heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:168-77.
9. Tio RA, Tkebuchava T, Scheuermann TH, Lebherz C, Magner M, Kearny M, et al. Intramyocardial gene therapy with naked DNA encoding vascular endothelial growth factor improves collateral flow to ischemic myocardium. *Hum Gene Ther* 1999;10:2953-60.
 10. Sato K, Wu T, Laham RJ, Johnson RB, Douglas P, Li J, et al. Efficacy of intracoronary or intravenous VEGF₁₆₅ in a pig model of chronic myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:616-23.
 11. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Sanborn TA, Parikh M, Bergman GW, et al. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 1999;100:468-74.
 12. Symes JF, Losordo DW, Vale PR, Lathi KG, Esakof DD, Mayskiy M, et al. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann Thorac Surg* 1999;68:830-37.
 13. Henry TD, Rocha-Singh K, Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ, Simons M, et al. Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial growth factor to patients with coronary artery disease. *Am Heart J* 2001;142:872-80.
 14. Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, Milliken CE, Fortuin FD, Cummings N, et al. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2002;105:2012-8.
 15. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-95.
 16. Schaper W. Therapeutic arteriogenesis has arrived. *Circulation* 2001;104:1994-5.
 17. Heil M, Clauss M, Suzuki K, Buschmann IR, Willuweit A, Fischer S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates monocyte migration through endothelial monolayers via increased integrin expression. *Eur J Cell Biol* 2000;79:850-57.
 18. 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 Therapy* 2002;9:1676-81.
 19. Wang H, Keiser JA. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. *Circ Res* 1998;83:832-40.
 20. Ishida A, Murray J, Saito Y, Kanthou C, Benzakour O, Shibuya M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 2001;188:359-68.
 21. Grosskreutz CL, Anand-Apte B, Dupl a C, Quinn TP, Terman BI, Zetter B, et al. Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Microvasc Res* 1999;58:128-36.
 22. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, DeMar a A, Devereux R, Feigenbaum H, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr* 1989;2:358-67.
 23. Rentrop KP, Cohen M, Blanke H, Phillips RA. Changes in collateral channel filling immediately after controlled coronary artery occlusion by an angioplasty balloon in human subjects. *J Am Coll Cardiol* 1985;5:587-92.
 24. Adair TH, Wells ML, Hang J, Montani JP, et al. A stereological method for estimating length density of the arterial vascular system. *Am J Physiol* 1994;266:H1434-38.
 25. Pettersson A, Nagy JA, Brown LF, Sundberg C, Morgan E, Jungles S, et al. Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest* 2000;80:99-115.
 26. Carmeliet P. VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis? *Nat Med* 2000;6:1102-3.
 27. Lee RJ, Springer ML, Blanco-Bose WE, Shaw R, Ursell PC, Blau HM, et al. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* 2000;102:898-901.
 28. Schaper W. Quo vadis collateral blood flow?: a commentary on a highly cited paper. *Cardiovasc Res* 2000;45:220-23.
 29. Romano Di Peppe S, Mangoni A, Zambruno G, Spinetti G, Melillo G, Napolitano M, et al. Adenovirus-mediated VEGF₁₆₅ gene transfer enhances wound healing by promoting angiogenesis in CD1 diabetic mice. *Gene Therapy* 2002;9:1271-7.
 30. Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Thelmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, et al. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF₁₆₄ and VEGF₁₈₈. *Nat Med* 1999;5:495-502.
 31. Schwarz ER, Speakman MT, Patterson M, Hale SS, Isner JM, Kedes LH, et al. Evaluation of the effects of intramyocardial injection of DNA expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a myocardial infarction model in the rat -angiogenesis and angioma formation. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1323-30.
 32. Su H, Lu R, Kan YW. Adeno-associated viral vector-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer induces neovascular formation in ischemic heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13801-6.
 33. Tomanek RJ, Sandra A, Zheng W, Brock T, Bjercke RJ, Hollifield JS, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor differentially modulate early postnatal coronary angiogenesis. *Circ Res* 2001;88:1135-41.
 34. Yokoyama M, Hirase T. Harmonic interplay of angiogenic growth factors in the development of coronary blood vessels. *Circ Res* 2001;88:1099-101.
 35. Buschmann I, Schaper W. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol* 2000;190:338-42.
 36. Hirschi KK, Rohovski SA, D'Amore PA. PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol* 1998;141:805-14. [Erratum in *J Cell Biol* 1998;141:1287].
 37. Sayeed-Shah U, Mann MJ, Martin J, Grachev S, Reimold S, Laurence R, et al. Complete reversal of ischemic wall motion abnormalities by combined use of gene therapy with transmural laser revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;116:763-9.
 38. Grines CL, Watkins MW, Helmer G, Penny W, Brinker J, Marmur JD, et al. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2002;105:1291-7.
 39. Kloner RA, Dow J, Chung G, Kedes LH. Intramyocardial injection of DNA encoding vascular endothelial growth factor in a myocardial infarction model. *J Thromb Thrombolysis* 2000;10:285-9.
 40. Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 1998;125:1591-8.