

Factores de crecimiento para la angiogénesis terapéutica en las enfermedades cardiovasculares

Peter R. Vale^a, Douglas W. Losordo^b, James F. Symes^c y Jeffrey M. Isner^a

Departamentos de ^aMedicina Vascular, ^bCardiología y ^cCirugía Cardiorádica. St. Elizabeth's Medical Center. Tuft's University School of Medicine. Boston. Massachusetts. EE.UU.

La angiogénesis terapéutica basada en la administración de factores de crecimiento con actividad angiogénica sirve para promover el desarrollo de vasos sanguíneos colaterales capaces de suplir la deficiencia de perfusión secundaria a la obstrucción de las arterias nativas. En la actualidad, este tipo de terapia se dirige a aquellos pacientes en los que los tratamientos convencionales (revascularización quirúrgica o percutánea) han fallado o no son viables. Los factores de crecimiento angiogénicos que han sido objeto de un estudio más exhaustivo son el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Estas citocinas se pueden administrar en forma de proteína recombinante o de genes que codifican para estas proteínas. Cada uno de estos enfoques presenta una serie de ventajas e inconvenientes que están siendo investigados en detalle, tanto en modelos animales como en ensayos clínicos con humanos. Aunque los ensayos clínicos se han basado en series reducidas de pacientes, a menudo no aleatorizadas, los resultados preliminares son muy prometedores. Así, por ejemplo, en la isquemia miocárdica se han obtenido evidencias objetivas de aumento de la perfusión tisular, y en la enfermedad arterial periférica se ha documentado una mejoría significativa del dolor en reposo y de las úlceras isquémicas después de la administración de VEGF y FGF. Contrariamente a lo esperado, los efectos colaterales de este tipo de intervenciones han sido pocos, aunque será necesario incluir un mayor número de pacientes en los ensayos clínicos para probar la seguridad y efectividad de este tipo de terapia. Parece claro, sin embargo, que es posible inducir una angiogénesis terapéutica en pacientes seleccionados capaz de modular las alteraciones vasculares sin que se produzca una toxicidad asociada significativa.

Palabras clave: *Isquemia miocárdica. Enfermedad arterial periférica. VEGF. FGF. Transferencia génica.*

(*Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 1210-1224)

Growth Factors for Therapeutic Angiogenesis in Cardiovascular Diseases

Therapeutic angiogenesis based on the administration of growth factors with angiogenic activity allows enhancement of collateral vessels able to palliate insufficient tissue perfusion secondary to obstruction of native arteries. At present, this type of therapy is addressed to patients that fail to respond to conventional treatment (surgical or percutaneous revascularization). The most extensively investigated angiogenic growth factors are vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF). These cytokines can be administered either as recombinant proteins or as the genes encoding for these proteins. Both approaches have pros and cons that are under investigation in animal models and in clinical studies. Although clinical trials consist so far of small, often non-randomized series, preliminary results are promising. For example, administration of VEGF or FGF has been associated to objective evidence of increased tissue perfusion in patients with myocardial ischemia, and to a significant improvement of pain and ischemia in patients with peripheral arterial disease. Contrarily to expected, these interventions have been associated to scant adverse side effects, although larger clinical trials will be necessary in order to prove the safety and effectiveness of these interventions. Nevertheless, it seems clear that it is feasible to induce effective therapeutic angiogenesis in selected patients without significant associated toxicity.

Key words: *Myocardial ischemia. Peripheral arterial disease. VEGF. FGF. Gene transfer.*

(*Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 1210-1224)

Correspondencia: J.M. Isner, M.D.
St. Elizabeth's Medical Center.
736 Cambridge St. Boston, MA 02135.
Correo electrónico: jisner@opal.tufts.com

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas siguen siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad en el mundo. A pesar de los importantes avances que se han logrado en el desarrollo de terapias médicas, quirúrgicas y percutáneas en el manejo de estas enfermedades durante las últimas 3 décadas, sigue habiendo una población significativa de pacientes que no son candidatos óptimos para la revascularización quirúrgica o percutánea.

Una parte importante de la investigación se ha centrado en la administración de factores de crecimiento angiogénicos, ya sea en forma de proteína recombinante o por transferencia génica, para promover el desarrollo de vasos sanguíneos colaterales suplementarios que actuarían como conductos de *bypass* endógenos alrededor de las arterias nativas ocluidas; una estrategia que se conoce como «angiogénesis terapéutica». Esta estrategia ha demostrado aumentar la perfusión tisular mediante neovascularización en un número considerable de ensayos preclínicos de isquemia. En pacientes con isquemia crítica de las extremidades inferiores o con enfermedad arterial coronaria terminal, los ensayos clínicos han demostrado una mejoría sintomática y han aportado una evidencia objetiva de mejoría en la perfusión, lo que sugiere que esta estrategia puede constituir un método alternativo de tratamiento en pacientes en los que las terapias actualmente disponibles han fallado o no son viables.

Los próximos objetivos de la investigación en el campo de la angiogénesis van a ser: determinar la dosis óptima, la formulación, la ruta de administración y la combinación de factores de crecimiento; determinar las necesidades de células progenitoras endoteliales o la suplementación con células madre; proporcionar una angiogénesis terapéutica efectiva y segura, así como adaptar la angiogénesis a las necesidades individuales de los pacientes. Esta revisión se centrará en la discusión de la biología de la neovascularización en relación con los factores de crecimiento angiogénicos, y también se hará una revisión de las estrategias de transferencia génica en la isquemia crítica de las extremidades inferiores y en la isquemia miocárdica.

NEOVASCULARIZACIÓN

Las estrategias de transferencia génica para la angiogénesis terapéutica están basadas en los hallazgos de Folkman et al¹, que sugirieron que el establecimiento y mantenimiento de un aporte vascular es un requisito absoluto para el crecimiento tanto del tejido normal como del neoplásico, como resultado de 2 procesos principales, la vasculogénesis y la angiogénesis, y que en esta neovascularización están involucrados los factores de crecimiento angiogénicos. La vasculogénesis es la diferenciación *in situ de novo* de células endoteliales (EC) a partir de precursores meso-

dérmicos en el embrión, por la asociación de las células progenitoras endoteliales (EPC) o angioblastos y su subsiguiente reorganización en forma de plexos capilares primarios².

La angiogénesis es la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de vasos sanguíneos preexistentes, inducida por la proliferación y migración de EC residentes preexistentes y plenamente diferenciadas dentro de los vasos progenitores en respuesta a estímulos como la hipoxia, la isquemia, el estiramiento mecánico y la inflamación^{3,4}. La angiogénesis puede ser fisiológica o patológica; la fisiológica se produce en la cicatrización de las heridas y en el ciclo reproductivo femenino, y la patológica tiene lugar durante el crecimiento tumoral, la artritis reumatoide y la retinopatía diabética proliferativa.

Inicialmente se creyó que la vasculogénesis se encontraba restringida al desarrollo embrionario, mientras que la angiogénesis, aunque también ocurre en el embrión, se creía que era la única responsable de la neovascularización posnatal. Evidencias más recientes sugieren que la base de la neovascularización, tanto nativa como terapéutica, no está restringida a la angiogénesis, sino que incluye los 2 procesos embrionarios. Las EPC circulantes positivas para el antígeno CD34 han sido aisladas recientemente a partir de individuos adultos y han demostrado ser capaces de diferenciarse *in vitro* como una línea celular endotelial⁵, de lo que se puede deducir que existen células madre circulantes. Además, la demostración de que las EPC derivadas de médula ósea pueden incrementar su número en respuesta a la isquemia tisular⁶, asentarse e incorporarse a focos de revascularización en animales adultos⁷ y aumentar el desarrollo de colaterales después de la expansión *ex vivo* y trasplante⁸, sugiere que la neovascularización en el adulto no está restringida a la angiogénesis, sino que incluye procesos de «vasculogénesis posnatal».

La neovascularización inducida por los factores de crecimiento angiogénicos incluye un rango variable de calibres vasculares, desde arterias medianas visualizadas por angiografía hasta una densidad capilar aumentada demostrada por histología *post mortem*. Un número de arterias de tamaño medio de nueva formación pueden desarrollarse como resultado de «arteriogénesis» o de proliferación *in situ* de conexiones arteriolas preexistentes, formando vasos colaterales de mayor tamaño⁹ mediante remodelado; se desconoce si el proceso de remodelado ocurre como resultado directo de la modulación de factores de crecimiento o como resultado de la maduración mediada por el flujo de estos conductos colaterales.

FACTORES DE CRECIMIENTO ANGIOGÉNICOS

Mientras que muchas citocinas tienen una actividad angiogénica, los factores que han sido mejor estudia-

dos, tanto en modelos animales como en ensayos clínicos, son el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

Factor de crecimiento del endotelio vascular

Los genes humanos del VEGF que han sido identificados hasta la fecha son el VEGF-1, el VEGF-2 o VEGF-C, el VEGF-3 o VEGF-B, el VEGF-D, el VEGF-E y el factor de crecimiento de la placenta (PlGF). Todos ellos se encuentran localizados en diferentes cromosomas, pero comparten una homología considerable. La diana celular principal del VEGF es la EC. Existen tres tirosincinasas «fms-like» específicas del endotelio, la VEGFR-1 (Flt-1), la VEGFR-2 (Flk-1/KDR) y la VEGFR-3. La hipoxia induce la formación de VEGF por las EC y produce un incremento en el número de receptores de VEGF¹⁰. La VEGFR-1 genera señales que organizan el ensamblaje de las EC en tubos y vasos funcionales¹¹. La VEGFR-2 es responsable de la proliferación y migración de EC^{12,13}. La principal función de la VEGFR-3 (Flt-4) es mediar la linfangiogénesis¹⁴.

El VEGF posee algunas características que facilitan la transferencia génica. En primer lugar, contiene una secuencia de señal secretora que permite que la proteína sea secretada de forma natural por células intactas, lo que hace que se activen una serie de efectos paracrinos adicionales¹⁵. En segundo lugar, sus lugares de unión de alta afinidad son exclusivos para las EC; en consecuencia, los efectos mitogénicos del VEGF están limitados a las EC, en contraste con el FGF ácido o básico, que se sabe que ejerce una acción mitogénica sobre las células musculares lisas y los fibroblastos, además de las EC^{16,17}. En tercer lugar, el VEGF posee un bucle autocrino que es compartido por la mayoría de citocinas angiogénicas y facilita la modulación del comportamiento de las EC; cuando se activa bajo condiciones hipóxicas, este bucle autocrino sirve para amplificar y, por tanto, prolongar la respuesta en las EC estimuladas por VEGF administrado exógenamente. Además, algunos factores que son secretados por los miocitos hipóxicos incrementan la expresión del receptor de VEGF de las EC dentro del medio hipóxico. Esta expresión localizada del receptor puede explicar el hecho de que la angiogénesis no ocurra de forma indiscriminada, sino más bien en los sitios donde hay isquemia tisular. Otra función adicional importante del VEGF es el aumento del número de EPC circulantes, documentado en ratones y en humanos después de un tratamiento con transferencia génica de VEGF¹⁸⁻²⁰.

Factor de crecimiento de fibroblastos

Los FGF son una familia de 9 factores, concretamente el FGF básico, el FGF ácido y los FGFs 3-9. El FGF

ácido (aFGF o FGF-1) y el FGF básico (bFGF o FGF-2) son los miembros mejor caracterizados de la gran familia de FGF. Los FGF son factores de crecimiento no secretados que carecen de una secuencia peptídica señal. La liberación extracelular de FGF está causada por el daño o la muerte celular. Aunque los FGF son potentes mitógenos de las EC, no son específicos de las EC y sirven también como ligandos para otros tipos celulares, como las células musculares lisas de los vasos y los fibroblastos. Se han identificado por los menos 4 receptores de FGF de alta afinidad y se ha clonado su cADN. Los FGF, al igual que el VEGF, también estimulan la síntesis de proteasas de las EC, incluido el activador del plasminógeno y las metaloproteinasas, que son importantes para la digestión de la matriz extracelular en el proceso de angiogénesis²¹. Sin embargo, a diferencia del VEGF, las formas comunes del FGF (FGF-1 y 2) carecen de la secuencia de señal secretora; consecuentemente, los ensayos clínicos de transferencia génica de FGF han requerido o bien una modificación del gen de FGF²² o bien el uso de otro miembro de la familia génica de FGF que tenga una secuencia señal^{23,24}.

ANGIOGÉNESIS TERAPÉUTICA

Las citocinas angiogénicas pueden ser administradas en forma de proteína recombinante o como genes que codifican para estas proteínas. Dado que tanto la proteína como el enfoque génico han sido estrategias relativamente bien toleradas hasta ahora en los ensayos clínicos, las investigaciones que se están llevando a cabo permitirán determinar la preparación óptima y la estrategia de liberación para la neovascularización terapéutica.

La terapia proteica sigue siendo el enfoque más convencional y algunos investigadores han indicado que esta estrategia es la más próxima a ser utilizada en la práctica. No obstante, la proteína recombinante se suele administrar de forma sistémica y está, por tanto, limitada por los potenciales efectos adversos de las altas concentraciones plasmáticas que se requieren para alcanzar la captación tisular adecuada.

La transferencia génica es la introducción de material genético dentro de las células somáticas de un organismo con el objetivo de alcanzar altos niveles de una expresión génica sostenida sin provocar reacciones adversas en el huésped. El éxito de las estrategias de transferencia génica depende de la eficiencia con la que el transgén es introducido y expresado dentro de las células diana y de la duración de la expresión del transgén. Los vectores de transferencia facilitan la penetración celular y el tráfico intracelular del transgén, y los sistemas de liberación local liberan el vector en las proximidades de las células diana. Existen 2 categorías principales de sistemas de transferencia génica, los sistemas virales y los no virales. Los vectores virales más comúnmente utilizados para la transferencia génica son los adenovirus y los retrovirus. Los méto-

dos no virales incluyen la introducción de ADN desnudo dentro del área diana y el uso de liposomas.

El músculo isquémico representa una diana prometedora para la terapia génica. Se ha demostrado que los músculos cardíacos y estriados captan y expresan el ADN desnudo en forma de plásmido, así como los transgenes incorporados en vectores virales. Además, estudios previos han demostrado que la eficiencia de la transfección intramuscular está aumentada más de 5 veces cuando el músculo inyectado está isquémico^{25,26}. Sin embargo, mientras que los vectores virales pueden aumentar la eficiencia de transfección y, por tanto, proporcionar niveles más elevados de expresión génica, los modelos *in vitro*²⁷ e *in vivo*²⁸ han demostrado que la transfección de baja eficiencia pero alta especificidad (transfección con éxito en < 1% de las células) con un gen (plásmido de ADN) que codifica para una proteína secretada (por ejemplo el VEGF), puede superar la desventaja que supone la transfección ineficiente mediante la secreción de la proteína adecuada hasta alcanzar niveles locales con efectos biológicos significativos y fisiológicamente relevantes, lo que permite conseguir resultados terapéuticos sin llevar a cabo una transfección con genes que codifican proteínas intracelulares (p. ej., el bFGF). Además, a diferencia de los vectores virales, el plásmido de ADN no induce inflamación.

ISQUEMIA CRÍTICA DE LAS EXTREMIDADES INFERIORES

En una gran proporción de pacientes con isquemia crítica de las extremidades inferiores, la distribución y extensión de la enfermedad oclusiva arterial imposibilita llevar a cabo una revascularización percutánea o quirúrgica. La declaración acordada por el Grupo de Trabajo Europeo sobre Isquemia Crítica de las Extremidades Inferiores²⁹ establece que no hay ningún tratamiento médico que haya demostrado ser capaz de alterar la historia natural de este cuadro clínico. Además, los índices de calidad de vida de estos pacientes son parecidos a los de los pacientes con estados terminales de malignidad. A pesar de la morbilidad y mortalidad asociadas a la amputación, a menudo esta estrategia es el tratamiento de elección. Por tanto, buscar alternativas terapéuticas para el tratamiento de pacientes con isquemia crítica de las extremidades inferiores es una necesidad imperiosa. Se ha llevado a cabo una importante labor de investigación dirigida al desarrollo de terapias angiogénicas que permitan proporcionar nuevas aproximaciones en el tratamiento de la isquemia de las extremidades inferiores.

Transferencia génica de VEGF en la isquemia periférica

A partir de experimentos realizados en córnea de rata y de conejo, en la membrana corioalantoidea y en

el modelo de injerto óseo en conejo^{16,30} han surgido evidencias que demuestran que el VEGF estimula la angiogénesis *in vivo*. Los estudios preclínicos han establecido una prueba de principio sobre el concepto de que la actividad angiogénica del VEGF es lo suficientemente potente como para lograr un beneficio terapéutico; el incremento de vasos colaterales visibles angiográficamente y capilares identificables por histología fue demostrado en conejos con isquemia severa y unilateral de las extremidades posteriores^{31,32}. La evidencia angiográfica e histológica de la angiogénesis fue posteriormente demostrada después de realizar transferencia génica intraarterial de phVEGF₁₆₅ en un paciente humano³³.

Sin embargo, la liberación intraarterial tiene algunas limitaciones inherentes que pueden debilitar el éxito de la transferencia génica en el tratamiento de la isquemia crítica de las extremidades inferiores. En el caso del ADN desnudo, es decir ADN no asociado con vectores virales ni de ningún otro tipo, la captación celular es prácticamente nula cuando el transgén se inyecta directamente dentro de la luz arterial, presumiblemente debido a la rápida degradación por parte de las nucleasas circulantes. Además, la distribución difusa del engrosamiento de la neointima y/o los depósitos calcificados extensos pueden limitar la transferencia génica a las células musculares lisas de la media arterial³⁴.

Los estudios preclínicos han sido diseñados, por tanto, para establecer la viabilidad de la transferencia génica intramuscular de VEGF en la isquemia crítica de las extremidades inferiores con el objetivo de promover la angiogénesis terapéutica. Después de la transferencia génica de VEGF de ADN desnudo por inyección directa en el músculo esquelético de las extremidades isquémicas de conejo se obtuvieron resultados biológicos significativos^{26,35}, como se evidenció por el incremento de la presión sanguínea de la extremidad, aumento del flujo ilíaco medido por Doppler, mejoría de la neovascularización determinada angiográficamente y aumento de la densidad capilar en las necropsias.

En pacientes con isquemia crítica de las extremidades inferiores y que presentaban úlceras isquémicas que no cicatrizaban y/o dolor en reposo se ha demostrado que la transferencia génica intramuscular de VEGF puede ser utilizada para realizar una angiogénesis terapéutica con éxito³⁶. El método empleado ha sido la transferencia génica intramuscular de un plásmido de ADN desnudo de 4.000 µg que codifica para el VEGF (phVEGF₁₆₅). La expresión génica fue documentada por el aumento transitorio de las concentraciones séricas de VEGF medidos por ELISA. El beneficio terapéutico fue demostrado por la regresión del dolor en reposo y/o la mejoría de la integridad de la extremidad, por el aumento del tiempo en el que el paciente podía andar sin dolor y el índice tobillo-brazo,

por los vasos colaterales visibles de nueva formación visualizados por angiografía de sustracción digital y por la evidencia cualitativa de mejoría en el flujo distal según imágenes de resonancia magnética.

Ensayos clínicos realizados posteriormente con phVEGF₁₆₅ han utilizado inyecciones intramusculares aleatorizadas y de forma ciega en 55 pacientes (con edades comprendidas entre los 24 y 84 años; media, 56,7 años) con dolor isquémico en reposo (n = 14) o úlceras isquémicas (n = 41). Se han obtenido evidencias de mejoría clínica en 13/14 pacientes (92%) con dolor en reposo y en 26/41 pacientes (63%) con úlceras isquémicas en un período de seguimiento de 4-36 meses. Para la serie total de 55 pacientes se obtuvo un resultado clínico favorable en el 65,5%. El análisis de regresión logística múltiple calificó el dolor en reposo y la edad de < 50 años como factores predictores significativos (p < 0,05) de un resultado clínico favorable. La diabetes, el tabaquismo, la hiperlipidemia, la hipertensión y la dosis de phVEGF₁₆₅ no fueron predictores del resultado clínico³⁷. Las complicaciones en estos pacientes se han limitado a la aparición de edema de las extremidades inferiores, que se desarrolla en un tercio de los pacientes aproximadamente³⁸.

Una estrategia terapéutica similar se utilizó en 11 pacientes con la enfermedad de Buerger que presentaban isquemia crítica de las extremidades inferiores, y en nueve de ellos el tratamiento fue exitoso³⁹. En estos enfermos se resolvió el dolor en reposo nocturno y se cicatrizaron las úlceras del pie y/o pierna. El índice tobillo-brazo aumentó en más de un 0,1 y se pudieron visualizar los vasos colaterales de nueva formación por resonancia magnética y angiografía de contraste seriada.

Estudios preclínicos de nuestro laboratorio han demostrado que el VEGF-2 fue capaz de promover la angiogénesis en un modelo de isquemia de las extremidades posteriores en conejo⁴⁰ y estimular la liberación de óxido nítrico por parte de las EC⁴⁰. Ensayos clínicos posteriores aleatorizados y doble ciego, controlados por placebo y con dosis crecientes, han comenzado a investigar el potencial terapéutico de la transferencia génica de VEGF-2 en pacientes con isquemia crítica de las extremidades inferiores. Un total de 46 pacientes con este cuadro han sido aleatorizados hasta el momento sobre una base 3:1 (tratamiento: placebo) para recibir solución salina o pVEGF2 en forma de ADN desnudo inyectado directamente en los músculos isquémicos de las extremidades inferiores; de los 46 pacientes, 21 presentaban solamente dolor en reposo y 25 tenían úlceras isquémicas ± dolor en reposo. Los resultados de este ensayo clínico en fase I están pendientes.

Otras estrategias para pacientes con enfermedad arterial periférica

El potencial del FGF básico (bFGF) para mejorar el desarrollo de colaterales ha sido demostrado previa-

mente en modelos animales con isquemia crítica de las extremidades posteriores⁴¹⁻⁴³. La seguridad de la administración intraarterial de bFGF en pacientes con claudicación intermitente ha sido demostrada recientemente por Lazarous et al⁴⁴. En este ensayo clínico en fase I, doble ciego y controlado por placebo se produjo una mejoría a los 6 meses en el flujo sanguíneo de la pantorrilla mediante pletismografía manométrica en los pacientes tratados con bFGF comparados con los controles. De todas formas, son necesarios más ensayos clínicos a mayor escala para investigar la seguridad y eficacia del FGF en pacientes con enfermedad arterial periférica, particularmente aquellos con enfermedad crítica de las extremidades inferiores.

ISQUEMIA MIOCÁRDICA

En aquellos pacientes en los que la medicación antianginosa no consigue proporcionar un alivio sintomático suficiente, pueden ser necesarias otras intervenciones como la angioplastia o la cirugía de *bypass*. Aunque los 2 tipos de intervenciones parecen ser efectivas en varios tipos de enfermos, un grupo considerable de pacientes puede no ser un buen candidato para ninguna de estas intervenciones debido a la naturaleza difusa de su enfermedad arterial coronaria. Además, hay muchos casos en los que el estrechamiento recurrente y/o oclusión de los conductos de *bypass* después de una cirugía que inicialmente tuvo éxito, puede hacer que el paciente se vuelva de nuevo sintomático sin que tenga ninguna opción adicional para una revascularización convencional.

Con el fin de estimular la angiogénesis miocárdica se han administrado citocinas angiogénicas a través de varias vías, que incluyen la intravenosa, la intracoronaria, la transepicárdica en el momento de la cirugía de *bypass* o por toracotomía, la intrapericárdica o periadventicial en el momento de la cirugía de *bypass* y, más recientemente, la transendocárdica por catéter. Los ensayos clínicos han favorecido por ahora la vía intracoronaria (adenovirus) o la vía miocárdica directa (ADN desnudo o adenovirus) debido a la creencia de que la liberación local de la proteína recombinante o del gen es el método ideal⁴⁵. El progreso futuro de estas técnicas exige que el riesgo inherente de un enfoque quirúrgico sea salvado con enfoques percutáneos basados en el uso de catéteres.

Estudios preclínicos con VEGF

Después de la demostración como prueba de principio de que la transferencia génica de citocinas podría ser usada para promover la angiogénesis en humanos con isquemia crítica de las extremidades inferiores, extrapolamos esta estrategia a la isquemia miocárdica. Aunque en los experimentos con animales que realizamos en nuestro laboratorio utilizando la proteína hu-

mana recombinante VEGF (rhVEGF₁₆₅) administrada directamente en el *ostium* coronario izquierdo, se produjo un aumento significativo del flujo en el miocardio isquémico dependiente de colaterales, este resultado fue complicado por la hipotensión mediada, aparentemente, por la liberación de óxido nítrico inducida por el VEGF⁴⁶. Resultados similares han sido obtenidos por otros grupos que han utilizado inyección intracoronaria en el cerdo⁴⁷ y en el perro⁴⁸. Las administraciones intramiocárdica⁴⁹ y periadventicial^{47,50} de la proteína VEGF han demostrado una eficacia limitada, pero la administración intravenosa no ha sido efectiva⁴⁹.

De acuerdo con esto, nosotros anticipamos que la expresión local de VEGF durante un período prolongado de 2-3 semanas podría salvar el problema de la hipotensión sintomática, pero seguir reduciendo la isquemia miocárdica. Y, en consecuencia, demostramos que es posible realizar una transferencia génica miocárdica directa, segura y con éxito, de phVEGF₁₆₅^{51,52} o VEGF-2⁵³ a través de una incisión en la pared pectoral mínimamente invasiva en un modelo porcino de isquemia miocárdica crónica. En este modelo se produjo un aumento del llenado de los vasos colaterales y una mejoría en la perfusión del miocardio isquémico por microvasos coloreados.

En un modelo con constrictor ameroide en cerdo, la inyección intramiocárdica de adenovirus que codifican para VEGF₁₂₁^{54,55} vía toracotomía ha demostrado mejorar la perfusión colateral y la función. La administración intracoronaria de un gen adenoviral produjo valores muy bajos y con una localización pobre de VEGF y del gen en el miocardio⁵⁵. La liberación pericárdica del adenovirus que codifica el VEGF₁₆₅ en un modelo canino no aumentó el flujo colateral⁵⁶.

Estudios recientes han sugerido que la transferencia génica miocárdica mediada por catéter de plásmidos desnudos de VEGF₁₆₅ y VEGF-2 es un procedimiento efectivo en el cerdo⁵¹. Este enfoque menos invasivo de transferencia génica intramiocárdica es capaz de producir una expresión génica adecuada^{51,57-59}.

Estudios preclínicos con FGF

Varias series de experimentos con animales han demostrado que el FGF-2 administrado intracoronariamente mejora la perfusión miocárdica y la función, e incrementa el flujo colateral en el perro, tanto en la isquemia crónica como en la aguda^{41,60-63}. Esta mejoría se produjo como resultado de la aparición de una red de capilares a partir de los vasos coronarios originales, como se documentó angiográfica e histológicamente. También se han observado efectos beneficiosos sobre el flujo colateral y la función ventricular izquierda en el cerdo después de la administración de una única dosis por vía perivasculosa o dentro del pericardio de FGF-2⁶⁴⁻⁶⁶. La proteína FGF-1 recombinante no ha sido efectiva en el perro^{67,68}. La experiencia con la

transferencia génica de FGF es más limitada. Tanto la inyección intramuscular de una única dosis de ADN desnudo que codifica para FGF-1, como la transferencia adenoviral intracoronaria del gen de FGF-5, han demostrado mejorar el flujo en la extremidad posterior del conejo²² y en el miocardio porcino²³, respectivamente.

Ensayos clínicos de transferencia génica miocárdica directa de VEGF

Hasta el momento, los ensayos clínicos publicados sobre transferencia génica de VEGF para la angiogénesis terapéutica en pacientes humanos se han limitado a ensayos en fase I no aleatorizados y de dosis crecientes, con plásmidos de ADN desnudo y adenovirus. En general, los pacientes de estos estudios tienen una angina refractaria a la terapia médica, una isquemia miocárdica progresiva demostrada y no son adecuados para la revascularización convencional.

Como resultado de los experimentos con animales que se han mencionado más arriba, en los que se ha utilizado transferencia génica de VEGF mediante plásmidos de ADN, nuestro centro ha iniciado un estudio clínico en fase I, de dosis creciente y no ciego, para determinar la seguridad y bioactividad de la transferencia génica miocárdica directa de phVEGF₁₆₅ como terapia única (es decir, sin angioplastia, implantación de *stents* o cirugía de *bypass*), en pacientes con angina de esfuerzo estable refractaria a la terapia médica, con áreas de miocardio viable pero infraperfundido y con enfermedad arterial coronaria oclusiva multivaso. Los resultados preliminares de este estudio clínico sugieren que se puede lograr una transfección segura y con éxito mediante este método con un efecto clínico favorable^{69,70}.

Una serie de 30 pacientes recibieron phVEGF₁₆₅ por inyección miocárdica directa en 4 alícuotas de 2 ml vía «mini-toracotomía»; la dosis total fue de 125 µg (n = 10), 250 µg (n = 10), 500 µg (n = 10). Se aseguró la inmovilidad del campo para la inyección intramiocárdica mediante un dispositivo estabilizador que facilita la anastomosis vascular durante la cirugía de *bypass* en el corazón latiente. Se realizó una monitorización ecocardiográfica transesofágica continua a lo largo de todo el procedimiento para controlar el desarrollo de anomalías en la motilidad de la pared asociadas a las inyecciones, y para asegurar que el plásmido de ADN no fuese inyectado en la cavidad del ventrículo izquierdo⁷¹. No se produjeron complicaciones perioperativas. No hubo evidencia de daño miocárdico según el análisis enzimático cardíaco y los pacientes mantuvieron la función ventricular izquierda. La expresión génica se documentó por un aumento transitorio pero significativo de las concentraciones plasmáticas de VEGF monitorizados por un ensayo ELISA. Todos los pacientes experimentaron una mejoría sintomática significativa y/o una evidencia objetiva

de mejoría en la perfusión miocárdica. Al final del seguimiento, 15/30 pacientes estuvieron libres de angina a los 360 días. En concreto, el uso de nitratos sublinguales disminuyó de 60 semanas a 3 semanas en el día 360 y se produjo una disminución significativa en el número de episodios de angina desde 56/semana a 4/semana en el día 360. El tiempo de ejercicio para el conjunto del grupo aumentó 98 s en el día 360 y el tiempo de ejercicio para el desarrollo de angina aumentó 2,5 min sobre el basal. Hubo dos muertes tardías (4,5 y 28,5 meses⁷⁰), y un paciente fue sometido a trasplante cardíaco a los 13 meses.

En 22/29 pacientes se ha documentado una disminución de la isquemia por SPECT ⁹⁹Tc-sestamibi con una reducción significativa en la puntuación perfusión/isquemia media, tanto en estrés como en reposo, en el día 60 del seguimiento. Es sorprendente el hecho de que se produzca una mejoría después de la transferencia génica no sólo de los defectos observados en la perfusión con el estrés farmacológico, sino también de los observados en reposo; los registros secuenciales de SPECT realizados antes y después de la transferencia génica demostraron una resolución parcial o completa de los defectos no reversibles en 4 (33%) y 5 (43%) pacientes, respectivamente, en los que los defectos estaban presentes sólo en la imagen de reposo inicial. Este hallazgo es consistente con la noción de que estos defectos preexistentes constituyen focos de miocardio viable hibernado⁷²⁻⁷⁴ que han reanudado o mejorado la actividad contráctil como resultado de la neovascularización terapéutica. Esta observación ha estado apoyada por los resultados obtenidos con el mapeo electromecánico que se practicó en los últimos 13 pacientes consecutivos. Los defectos de perfusión en reposo según las imágenes de SPECT correspondían a áreas con características isquémicas (disminución de la motilidad de la pared con viabilidad preservada) en los mapas endocárdicos. Los focos de isquemia fueron identificados antes de la intervención en todos los pacientes, produciéndose una mejoría significativa en estas anomalías de la motilidad de la pared endocárdica después de los 60 días de la transferencia génica⁷⁵.

Este estudio proporciona la primera evidencia de que la inyección miocárdica directa de plásmido de ADN desnudo que codifica para VEGF como única intervención terapéutica tiene un efecto clínico favorable. Una experiencia favorable similar se ha obtenido en un ensayo clínico multicéntrico no ciego de dosis creciente, con plásmido de ADN que codifica para VEGF-2, en 30 pacientes con enfermedad arterial coronaria terminal y angina refractaria de clase III o IV. En ningún enfermo hubo efectos adversos debidos al procedimiento, aunque se produjo una muerte 20 h después de la cirugía. Después de 12 meses de la transferencia génica, el número medio de episodios de angina y las tabletas de nitratos consumidas semanalmente disminuyeron signi-

ficativamente, y en 25/29 pacientes (86%) se produjo una mejoría de dos o más clases de angina y la duración media de ejercicio aumentó en más de 2 min (datos no publicados).

El único estudio adicional del que tenemos constancia de transferencia génica miocárdica directa de VEGF se realizó por inyección de VEGF₁₂₁ asociado a adenovirus en pacientes que se sometieron a cirugía de *bypass* (n = 15), y en pacientes que lo recibieron como terapia única vía minitoracotomía (n = 6). Los síntomas y la tolerancia al ejercicio mejoraron tanto en el grupo que se sometió a cirugía de *bypass* como en el grupo que lo recibió como terapia única, pero las imágenes de perfusión con radioisótopos inducidas por el esfuerzo no cambiaron. Los resultados de este estudio son consistentes con el concepto de que el VEGF₁₂₁ adenoviral parece ser bien tolerado en pacientes con enfermedad coronaria avanzada.

Estas primeras experiencias con transferencia génica miocárdica de VEGF, aunque son alentadoras desde el punto de vista de la angiogénesis terapéutica y la terapia génica, dejan muchos aspectos sin resolver. Serán necesarios más trabajos de investigación que permitan optimizar el lugar anatómico, el número y la dosis de las inyecciones miocárdicas directas. La estrategia de la terapia génica única administrada vía minitoracotomía no permite la aleatorización contra placebo (controles no tratados) o las pruebas clínicas de dosis alternativas que incluyan múltiples tratamientos.

Transferencia génica miocárdica de VEGF mediante catéter

Mientras que se ha realizado con éxito la transferencia génica intravascular³³, pericárdica⁷⁶ e intramuscular³⁶ utilizando técnicas de liberación mínimamente invasivas, todo el trabajo que se ha comentado con anterioridad que incluye transferencia génica miocárdica ha requerido hasta el momento un procedimiento quirúrgico.

Los estudios preclínicos preliminares han utilizado un sistema de navegación y una tecnología de mapeo por catéter (NOGATM) integrados a un catéter de inyección (Biosense-Webster, Warren, NJ), con una aguja 27 G incorporada al extremo distal para liberar 6 inyecciones (1 ml por inyección) al miocardio porcino normal o isquémico⁵⁷, y determinar así la seguridad y viabilidad de la transferencia génica mediada por catéter. Los resultados con azul de metileno han sugerido que el procedimiento alcanza la diana endocárdica de manera segura, fiable y reproducible, y la inyección de un gen indicador (pCMV-nlsLacZ) ha demostrado un pico de actividad betagalactosidasa (β -gal) (mayor en el miocardio isquémico que en el no isquémico, lo que indica una transferencia génica aumentada en el miocardio isquémico) en el área dia-

na, con un nivel bajo o despreciable de actividad en áreas lejanas al punto de inyección, lo que sugiere una transferencia génica relativamente localizada. Hallazgos similares han sido obtenidos en un estudio en el que se ha realizado transferencia génica asociada a adenovirus de un gen indicador⁷⁷. Estos resultados establecen que la transferencia génica miocárdica percutánea puede realizarse con éxito en el miocardio normal e isquémico de forma relativamente específica sin que se produzca una morbilidad o mortalidad significativas. La capacidad de mapeo del sistema NOGATM utilizado en este estudio ha sido útil para demostrar que la expresión génica puede dirigirse a sitios predeterminados del ventrículo izquierdo, lo que indica que esta técnica puede ser claramente ventajosa para evitar una transferencia génica a los sitios donde hay una cicatriz miocárdica, así como para trasladar cuidadosamente el extremo del catéter de inyección a las áreas de isquemia miocárdica (o miocardio hibernado) en las que la transferencia génica puede optimizarse.

Se han realizado también estudios preclínicos para probar específicamente la viabilidad y seguridad de la liberación mediada por catéter de plásmido de ADN desnudo que codifica para VEGF-1 y VEGF-2⁵¹. Se ha podido demostrar una transferencia génica efectiva por la presencia del plásmido de ADN en el tejido miocárdico mediante la técnica de PCR. No se identificó la proteína VEGF ni el plásmido en órganos remotos. Las inyecciones no provocaron cambios hemodinámicos ni arritmias ventriculares sostenidas, y no hubo evidencia electrocardiográfica de infarto. Se documentó una evidencia objetiva de reducción de la isquemia (reducción del área de isquemia por mapeo con NOGATM) en todos los animales transfectados con VEGF. No se observó mejoría en los animales del grupo control. Estos resultados sugieren, por tanto, que la inyección miocárdica percutánea de VEGF puede realizarse de manera segura y reproducible en el miocardio isquémico porcino. Posteriormente iniciamos un estudio piloto de transferencia génica de ADN de VEGF-2 percutánea y mediada por catéter frente a un procedimiento simulado guiado por el sistema de mapeo NOGATM en 6 pacientes con isquemia miocárdica sintomática no revascularizable⁷⁸. Los enfermos transfectados con VEGF-2 presentaron una reducción significativa en los episodios de angina semanales y en el consumo de tabletas de nitratos a los 12 meses después de la transferencia génica. Por el contrario, a pesar de que los pacientes que fueron aleatorizados de forma ciega al grupo control informaron sobre una reducción inicial en estos parámetros, esta mejoría en el perfil clínico no se mantuvo después de los 30 días, lo que sugiere que la reducción continuada de la angina en el grupo tratado con VEGF-2 no era debida a un efecto placebo. La mejoría sintomática estuvo de

nuevo acompañada por una evidencia objetiva de aumento en la perfusión miocárdica documentada tanto por gammagrafía de perfusión por SPECT-sestamibi como por mapeo electromecánico⁷⁸. Aunque los resultados clínicos de este ensayo piloto en cuanto a su eficacia son muy alentadores, el número de pacientes incluidos y el diseño ciego para el paciente, pero no para el médico, impiden obtener conclusiones firmes en este sentido. En consecuencia, se ha iniciado un ensayo clínico multicéntrico aleatorizado de transferencia génica de VEGF-2 mediada por catéter, doble ciego y controlado por placebo, que ha incluido hasta el momento 19 pacientes. No ha habido complicaciones asociadas a las 150 inyecciones entre los 25 pacientes que han recibido VEGF-2 o placebo en estos 2 estudios.

Así pues, estas experiencias preliminares sugieren que es posible reemplazar los enfoques quirúrgicos empleados en la actualidad por técnicas mínimamente invasivas, para aplicaciones de terapia génica dirigidas a la función miocárdica y la perfusión. Este tipo de enfoque tiene por lo menos 3 ventajas en comparación con el enfoque quirúrgico. En primer lugar, permite una liberación más selectiva del transgén a las zonas específicamente isquémicas, incluidas las áreas que son menos accesibles por minitoracotomía. En segundo lugar, el enfoque basado en catéter facilita los ensayos doble ciego y controlados por placebo porque se evita el uso de anestesia general y disección quirúrgica a través de las adhesiones secundarias a la colocación de los conductos de *bypass*. En tercer lugar, la intervención puede realizarse como un procedimiento ambulatorio, y puede repetirse si es necesario.

Transferencia génica miocárdica de FGF

La experiencia clínica con transferencia génica de FGF para la angiogénesis miocárdica es limitada. Se ha implantado FGF-2 (bFGF) perivascular o placebo contenido en microcápsulas de heparina, en la grasa subepicárdica del territorio miocárdico no susceptible de revascularización en pacientes que se sometían a cirugía de *bypass* con miocardio isquémico y viable⁷⁹. En este estudio se produjo una mortalidad y morbilidad perioperativas relativamente altas, atribuidas a la naturaleza avanzada de la enfermedad arterial coronaria. Sin embargo, los datos preliminares han sugerido una mejoría en la angina, la perfusión miocárdica y la función regional por resonancia magnética en el grupo bFGF.

Estudios clínicos de terapia con proteína recombinante miocárdica

El primer estudio clínico de proteína recombinante para la isquemia miocárdica utilizó inyecciones intra-

miocárdicas de FGF-1 (aFGF) en conjunción con cirugía de *bypass* en pacientes que se sometían a derivación de la arteria mamaria interna izquierda a la arteria coronaria descendente anterior. En este estudio de 40 pacientes (20 en el grupo FGF y 20 en el grupo placebo), aleatorizado y controlado por placebo, la angiografía reveló que en el grupo de pacientes tratados con FGF se produjo un aumento en la captación del contraste (crecimiento de la red de capilares) en el lugar de inyección del factor de crecimiento comparado con el grupo placebo. Este efecto fue corroborado por el desarrollo de mejoría en la clase funcional y la reducción en el consumo de nitratos a los 3 años de seguimiento⁸⁰. Además, en este mismo grupo se ha documentado recientemente un aumento de la perfusión miocárdica evaluada por SPECT y de la capacidad de ejercicio a las 12 semanas en pacientes con angina severa que no eran adecuados para la revascularización convencional y que fueron inyectados con rhFGF-1 de forma transepicárdica vía minitoracotomía⁸¹.

El reciente ensayo clínico VIVA es un estudio doble ciego de dosis crecientes y controlado por placebo que incluye pacientes con miocardio viable que no son candidatos óptimos para revascularización percutánea o quirúrgica. Este estudio ha sido diseñado para comparar 2 dosis de proteína VEGF-1 o placebo en 178 pacientes que recibieron una única infusión intracoronaria seguida por 3 infusiones intravenosas separadas⁸²⁻⁸⁵. Las dosis estuvieron limitadas por la hipotensión que se había desarrollado a dosis altas en un estudio previo de análisis de dosis. La mejoría que se produjo en la duración del ejercicio en tapiz rodante (aproximadamente 45 s) fue similar en los grupos que recibieron tratamiento y placebo a los 60 días. A los 120 días, el grupo que recibió la dosis alta mantuvo la mejoría con un incremento de 47 s sobre el nivel basal, mientras que el grupo placebo sólo demostró una mejoría de 14 s. No hubo diferencias significativas respecto al grupo placebo, en el grado de angina o la medida de calidad de vida a los 60 días aunque se produjo una reducción significativa en el grado de angina a los 120 días en el grupo que recibió la dosis alta. Ni la angiografía ni el SPECT-estambibi pusieron de manifiesto cambios significativos en ningún grupo.

El estudio FIRST comparó el efecto de una única dosis intracoronaria de FGF-2 (bFGF) recombinante respecto a placebo en 337 pacientes, liberada como una única infusión de 20 min y repartida entre 2 arterias coronarias importantes, en pacientes con enfermedad arterial coronaria no revascularizable⁸⁶. Los resultados a los 90 días no demostraron diferencias significativas respecto al placebo en las variables primarias de estudio del tiempo de ejercicio (la mejoría fue de 65 frente a 45 s; $p = 0,64$), o la perfusión nuclear de reposo o de estrés.

TERAPIA GÉNICA ARTERIAL PARA INHIBIR LA REESTENOSIS EN PACIENTES CON CLAUDICACIÓN INTERMITENTE QUE SE SOMETEN A ANGIOPLASTIA ARTERIAL FEMORAL SUPERFICIAL

La estenosis de la arteria femoral superficial es uno de los lugares más comunes de obstrucción vascular periférica. La angioplastia transluminal percutánea se ha usado ampliamente y con éxito para tratar las obstrucciones ateroscleróticas en la circulación periférica y coronaria. Sin embargo, la reestenosis de la arteria femoral superficial y de la arteria poplítea después de la angioplastia sigue siendo una de las complicaciones más molestas y caras de esta, por otra parte, eficaz intervención. Mientras que el éxito de la revascularización percutánea de las lesiones de la arteria femoral superficial con guías convencionales y angioplastia transluminal percutánea estándar excede el 90%, los resultados publicados establecen que la reestenosis puede complicar el curso clínico hasta en un 60% de los pacientes sometidos a este tipo de angioplastia para el tratamiento de la estenosis y/o oclusión de la arteria femoral superficial. Otras estrategias que se han utilizado para limitar el desarrollo de reestenosis por métodos no mecánicos han demostrado no ser efectivas. Las estrategias terapéuticas dirigidas específicamente a reestablecer la integridad endotelial no han sido exploradas hasta ahora con el fin de prevenir la reestenosis. Los estudios con animales han demostrado que la administración de mitógenos, como el VEGF, que promueven la migración y/o proliferación de las EC, pueden acelerar la reendotelización y, por tanto, reducir el engrosamiento de la íntima⁸⁷⁻⁹⁰.

Teniendo en cuenta estas observaciones hemos diseñado un ensayo clínico de terapia génica en fase I monocéntrico, no ciego y de dosis crecientes, para acelerar la reendotelización en el lugar en el que se produce la discontinuidad endotelial inducida por angioplastia transluminal percutánea, como un método novedoso para inhibir la reestenosis después de angioplastia. El principal objetivo de este estudio ha sido documentar la seguridad del método de liberación percutánea mediada por catéter del gen codificador de VEGF, en pacientes con claudicación intermitente debida a obstrucción de la arteria femoral superficial.

La transferencia génica arterial de VEGF se ha realizado hasta ahora en 20 pacientes, 13 varones y 7 mujeres con una edad media de 69 años. Todos los pacientes tenían dos o más factores de riesgo cardiovascular. La expresión génica se documentó por un aumento en las concentraciones plasmáticas de VEGF. El pico de los valores plasmáticos se registró como media a los 12 días después de la transferencia génica. El tiempo medio de claudicación aumentó desde 2 min en condiciones basales a 5 min después de 18 meses de haberse realizado la transferencia génica. Previamente

a la transferencia del gen, todos los pacientes habían sido clasificados como clase Rutherford 3. A los 12-18 meses después de realizarse la transferencia génica, 10 pacientes estaban asintomáticos y cinco se encontraban en clase 1. Tras una mejoría inicial, 4 pacientes que se encontraban en la clase Rutherford 2 después de la revascularización volvieron a la clase 3. Un paciente desarrolló un cuadro de isquemia crítica de las extremidades inferiores y requirió terapia de rescate con transferencia génica intramuscular de plásmido de ADN desnudo codificador de VEGF.

Se produjo una mejoría significativa y sostenida del índice tobillo-brazo después de la transferencia génica en comparación con el valor basal. Este índice era 0,70 antes de la transferencia génica y aumentó a 0,89 a los 18 meses de la transferencia génica. En 15 pacientes la estenosis de la arteria femoral superficial disminuyó desde un 82% en condiciones basales a un 32% como media después de 9 meses de haberse realizado la transferencia génica. Estos resultados fueron corroborados por los hallazgos proporcionados por los ultrasonidos intravasculares durante la angiografía de seguimiento. En 5 pacientes hubo evidencias angiográficas de reestenosis a los 6-12 meses después de la transferencia génica. Fue necesaria una revascularización del vaso diana en los 5 pacientes. La histología en 3/4 pacientes para someterse a una aterectomía direccional en el momento de repetirse la revascularización demostró una proliferación activa de células musculares lisas y valores altos del antígeno nuclear celular en estado proliferativo, lo que indica la existencia de una actividad proliferativa importante.

Así pues, 20 pacientes han sido tratados con transferencia génica arterial de VEGF para prevenir la reestenosis. La expresión de VEGF se ha documentado por el ensayo ELISA. A los 12-18 meses de seguimiento, cinco de 20 pacientes (25%) requirieron una revascularización del vaso diana por existir evidencias angiográficas y de ultrasonidos del desarrollo de reestenosis. De este estudio preliminar se concluye que la terapia génica diseñada para acelerar la reendotelización en el lugar de la discontinuidad endotelial inducida por angioplastia transluminal percutánea puede realizarse de forma segura. Es importante señalar que no hubo evidencias de aceleración en la aterosclerosis o de aumento en la tasa de reestenosis después de la transferencia génica.

POTENCIALES PROBLEMAS DE SEGURIDAD

Se sabe que muchos factores angiogénicos están involucrados en el crecimiento tumoral secundario al aumento de la angiogénesis, que es vital para el crecimiento de la mayoría de tumores, particularmente los tumores sólidos. De ahí que, en teoría, los factores de crecimiento angiogénicos puedan conducir al desarrollo de tumores que pueden ser demasiado pequeños

para ser detectados. A pesar de estas consideraciones, no hay ningún dato *in vitro* ni *in vivo* que sugiera que el VEGF aumenta el riesgo de crecimiento neoplásico y/o metástasis, aunque será necesario realizar un seguimiento más largo para investigar específicamente este aspecto en los ensayos clínicos. Fue muy interesante constatar en el estudio VIVA que hubo una mayor incidencia de tumores en el grupo placebo que en el grupo VEGF. Esto ejemplifica el hecho de que el grupo de edad que recibe este tipo de terapias desarrolla algunos tumores no relacionados con el tratamiento. No obstante, hay que ser vigilante con la posibilidad de cáncer en pacientes tratados con estos factores de crecimiento angiogénico. Además, en estudios con ratones⁹¹ o ratas⁹² tratados con mioblastos transducidos o con dosis suprafisiológicas de plásmidos de ADN surgió el temor sobre el posible desarrollo de angiomata. Es importante destacar que no ha habido otros informes preclínicos o clínicos, incluyendo aquellos estudios en los que se utilizan vectores adenovirales, que describan este tipo de complicaciones.

En teoría, es posible que el VEGF pueda exacerbar la retinopatía proliferativa y/o hemorrágica en pacientes con diabetes, teniendo en cuenta las altas concentraciones de VEGF detectadas en el fluido ocular de pacientes con retinopatía proliferativa activa causante de pérdida de visión⁹³. Hasta el momento, este efecto adverso de la angiogénesis terapéutica no ha sido observado. La liberación local de plásmido de ADN desnudo codificador de VEGF-1 o VEGF-2 en más de 100 pacientes (un tercio de ellos con diabetes y/o retinopatía remota) tratados en nuestra institución con un seguimiento de 4 años no ha afectado la agudeza visual ni los hallazgos en el fondo de ojo, como se ha evidenciado por exámenes seriados del fondo de ojo realizados antes y después de la transferencia génica, y llevados a cabo por un grupo independiente de especialistas en retina.

En experimentos con ratones transgénicos manipulados para sobreexpresar VEGF ± angiopoyetina se ha demostrado un efecto de aumento letal de la permeabilidad asociado al VEGF⁹⁴. Sin embargo, aunque el tratamiento con VEGF ha provocado un edema local que se manifiesta como un edema pedal en pacientes con isquemia crítica de las extremidades inferiores, este efecto responde bien al tratamiento con diuréticos³⁸.

Se ha descrito que el tratamiento con proteínas recombinantes produce hipotensión^{46,95}, particularmente cuando se administra por vía sistémica y a altas dosis, debido a que el VEGF estimula la síntesis de óxido nítrico^{96,97}; sin embargo, esta complicación nunca ha sido descrita después de realizarse transferencia génica ni en animales ni en humanos.

Se han documentado efectos colaterales hematológicos en forma de anemia o trombocitopenia después de la administración sistémica de bFGF en perros. Sin embargo, estos efectos adversos no se han producido

en terapias a corto plazo. También se ha descrito el desarrollo de toxicidad renal en forma de proteinuria en estudios animales con bFGF. Se supone que este efecto indeseable es transitorio y reversible⁹⁸.

Otra posible preocupación procede de la demostración reciente de que los inhibidores de la angiogénesis que se han probado en un modelo de aterosclerosis en ratón deficiente en apolipoproteína E inhibieron el crecimiento de la placa y la neovascularización de la íntima⁹⁹. Sin embargo, los datos disponibles a partir de 4 estudios diferentes con animales⁸⁷⁻⁹⁰ y 2 estudios clínicos con humanos^{100,101} no han podido demostrar que la aterosclerosis acelerada sea una consecuencia probable de la administración de citocinas angiogénicas; de hecho, el resultado es más bien el opuesto, ya que la administración de VEGF ha producido una reducción estadísticamente significativa en el engrosamiento de la íntima debido a una reendotelización acelerada, lo que va en contra del concepto de que la aceleración de la aterosclerosis es una consecuencia de la estimulación de la angiogénesis inducida por VEGF.

CONCLUSIONES

Las estrategias clínicas empleadas actualmente para el tratamiento de la isquemia crítica de las extremidades inferiores y de la isquemia miocárdica crónica constituyen una extrapolación de las aplicaciones iniciales de transferencia génica en modelos animales, en los que se ha utilizado la isoforma ácida de 165 aminoácidos del gen VEGF-1 para el tratamiento de la isquemia de las extremidades. Estos resultados tienen probablemente implicaciones genéricas para la neovascularización terapéutica utilizando genes candidatos alternativos, nuevos vectores y otras estrategias de liberación. Ya han sido publicados datos preclínicos que apoyan el uso de otras isoformas de VEGF-1¹⁰², así como de otros genes de VEGF⁴⁰, y también existen estudios preclínicos en los que se utiliza el FGF^{23,103}; todo esto se está estudiando activamente en ensayos clínicos que están en marcha. Además, siguen sin establecerse las ventajas relativas de la transferencia génica respecto a la administración de proteína recombinante.

Los objetivos primarios negativos que se han obtenido en los estudios VIVA y FIRST con la administración de proteína intracoronaria ± intravenosa, ponen de relieve la preocupación de que la farmacocinética de las proteínas recombinantes administradas dentro del espacio vascular puede conducir a una liberación local inadecuada del factor de crecimiento angiogénico en el miocardio isquémico. No cabe duda de que serán necesarias investigaciones adicionales que comparen las dosis de la proteína recombinante y las rutas de liberación para resolver esta cuestión. Hasta que todos estos estudios se hayan completado no podrá saberse cuál es el método ideal para lograr una angio-

génesis terapéutica. Además, los resultados de los estudios en fase I, que están diseñados por definición para probar la seguridad, deben ser interpretados con cautela. En general, el número de pacientes incluidos en este tipo de estudios es relativamente bajo, y para aquellos en los que no existe un grupo control, no puede excluirse un posible efecto placebo. Para los estudios en los que la proteína recombinante o el gen se administra en conjunción con una revascularización convencional puede ser difícil determinar las contribuciones relativas del agente angiogénico respecto a la cirugía de *bypass* en cuanto a la respuesta sintomática.

Lo que sí está claro, sin embargo, es que la transferencia génica de VEGF dirigida de forma específica puede ser usada para conseguir una modulación terapéutica fisiológicamente relevante de las alteraciones vasculares y, en concreto, que la inyección intramuscular de plásmidos de ADN desnudo produce una sobreexpresión constitutiva de VEGF suficiente para inducir una angiogénesis terapéutica en pacientes seleccionados con isquemia crítica de las extremidades inferiores. Cabe destacar que no se han obtenido evidencias de toxicidad inmunológica ni en nuestros estudios intraarteriales con animales, ni en nuestra experiencia clínica con humanos, utilizando plásmidos de ADN desnudo que codifican para VEGF. Además, en este estadio temprano de los estudios clínicos sobre terapia génica miocárdica se ha demostrado que la transferencia génica miocárdica directa utilizando diferentes dosis de plásmidos de ADN desnudo codificadores de VEGF₁₆₅ y VEGF-2, puede realizarse de forma segura con resultados positivos sobre la perfusión miocárdica. En términos de seguridad, no se han observado complicaciones operativas ni se ha agravado el deterioro en la visión como consecuencia de la retinopatía diabética¹⁰⁴ en pacientes tratados con transferencia génica de phVEGF₁₆₅. En cuanto a la mortalidad, es importante remarcar que en los 85 pacientes con angina en clase III o IV, todos ellos rechazados para una revascularización convencional, y que se sometieron a una transferencia génica operativa o percutánea de ADN desnudo de VEGF-1 o VEGF-2, la mortalidad acumulativa fue de 3/85 (3,5%) a los 33 meses de seguimiento. Este resultado es favorable si se compara con el que se obtuvo en un grupo similar de 1.000 pacientes que recibieron revascularización miocárdica por láser o terapia médica continuada en 5 estudios contemporáneos controlados, y en los que la mortalidad media fue de 11-13% al año de seguimiento¹⁰⁵⁻¹⁰⁹. Los estudios clínicos que están en curso serán los que determinarán las posibilidades potenciales de la terapia génica de neovascularización realizada de forma no quirúrgica a través de un catéter, aunque desde el punto de vista terapéutico los resultados preliminares están siendo muy prometedores.

En la mayoría de los casos, los estudios clínicos sobre angiogénesis terapéutica han estado restringidos a pacientes con isquemia miocárdica o con isquemia crítica de las extremidades inferiores que no tienen otras opciones. Aunque éste es el grupo prioritario para recibir esta terapia en el futuro más inmediato no es difícil prever que llegará un momento en el que los pacientes que se someten a cirugía de *bypass* pero que no son candidatos óptimos para este tipo de intervención, puedan beneficiarse de la angiogénesis terapéutica, que tiene la ventaja de que se puede realizar en un estadio más temprano de la enfermedad y proporcionar, de esta forma, mayores posibilidades de éxito.

BIBLIOGRAFÍA

- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186.
- Risau W. Differentiation of endothelium. *FASEB J* 1995; 9: 926-933.
- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931-10934.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967.
- Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature Med* 1999; 5: 434-438.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221-228.
- Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3422-3427.
- Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 1998; 101: 40-50.
- Broggi E, Schattman G, Wu T, Kim EA, Varticovski L, Keyt B et al. Hypoxia-induced paracrine regulation of VEGF receptor expression. *J Clin Invest* 1996; 97: 469-476.
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376: 66-70.
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature* 1995; 376: 62-66.
- Carmeliet P, Collen D. Molecular analysis of blood vessel formation and disease. *Am J Physiol* 1997; 273: H2091-H2104.
- Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997; 276: 1423-1425.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-1309.
- 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: 851-855.
- Conn G, Soderman D, Schaeffer M-T, Wile M, Hatcher VB, Thomas KA. Purification of glycoprotein vascular endothelial cell mitogen from a rat glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1323-1327.
- Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravelleux E et al. Vascular endothelial growth factor165 gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res* 2000; 86: 1198-1202.
- Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999; 18: 3964-3972.
- Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, Vale PR, Isner JM, Asahara T et al. Mobilization of endothelial progenitor cells following gene therapy with VEGF165 in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg* 2000; 70: 829-834.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Med* 2000; 6: 389-395.
- Tabata H, Silver M, Isner JM. Arterial gene transfer of acidic fibroblast growth factor for therapeutic angiogenesis in vivo: critical role of secretion signal in use of naked DNA. *Cardiovasc Res* 1997; 35: 470-479.
- Giordano FJ, Ping P, McKirnan MD, Nozaki S, DeMaria AN, Dillmann WH et al. Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. *Nature Med* 1996; 2: 534-539.
- McKirnan MD, Guo X, Waldman LK et al. Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-4 increases regional contractile function and responsiveness to adrenergic stimulation in heart failure. *Cardiac Vasc Reg* 2000; 1: 11-21.
- Takeshita S, Isshiki T, Sato T. Increased expression of direct gene transfer into skeletal muscles observed after acute ischemic injury in rats. *Lab Invest* 1996; 74: 1061-1065.
- Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, Kearney M, Rossow ST, Passeri J et al. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation* 1996; 94: 3281-3290.
- Takeshita S, Losordo DW, Kearney M, Isner JM. Time course of recombinant protein secretion following liposome-mediated gene transfer in a rabbit arterial organ culture model. *Lab Invest* 1994; 71: 387-391.
- Losordo DW, Pickering JG, Takeshita S, Leclerc G, Gal D, Weir L et al. Use of the rabbit ear artery to serially assess foreign protein secretion after site specific arterial gene transfer in vivo: evidence that anatomic identification of successful gene transfer may underestimate the potential magnitude of transgene expression. *Circulation* 1994; 89: 785-792.
- European Working Group on Critical Leg Ischemia. Second European consensus document on chronic critical leg ischemia. *Circulation* 1991; 84: IV1-IV26.
- Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989; 84: 1470-1478.
- Riessen R, Rahimizadeh H, Blessing E, Takeshita S, Barry JJ, Isner JM. Arterial gene transfer using pure DNA applied directly to a hydrogel-coated angioplasty balloon. *Hum Gene Ther* 1993; 4: 749-758.
- Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S et al. Therapeutic angiogenesis: a single intra-arterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hindlimb model. *J Clin Invest* 1994; 93: 662-670.
- Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T et al. Clinical evidence of angiogenesis following arterial gene transfer of phVEGF165. *Lancet* 1996; 348: 370-374.
- Feldman LJ, Steg PG, Zheng LP, Chen D, Kearney M, McGarr SE et al. Low-efficiency of percutaneous adenovirus-mediated

- arterial gene transfer in the atherosclerotic rabbit. *J Clin Invest* 1995; 95: 2662-2671.
35. Rivard A, Silver M, Chen D, Kearney M, Magner M, Annex B et al. Rescue of diabetes related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. *Am J Pathol* 1999; 154: 355-364.
 36. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K et al. Constitutive expression of phVEGF165 following intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998; 97: 1114-1123.
 37. Rauh G, Gravereaux EC, Pieczek AM, Radley S, Schainfeld RM, Isner JM. Age < 50 years and rest pain predict positive clinical outcome after intramuscular gene transfer of phVEGF165 in patients with critical limb ischemia [resumen]. *Circulation* 1999; 100: 1319.
 38. Baumgartner I, Rauh G, Pieczek A, Wuensch D, Magner M, Kearney M et al. Lower-extremity edema associated with gene transfer of naked DNA vascular endothelial growth factor. *Ann Inter Med* 2000; 132: 880-884.
 39. Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, Schainfeld R, Blair R, Manor O et al. Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J Vasc Surg* 1998; 28: 964-975.
 40. Witzembichler B, Asahara T, Murohara T, Silver M, Spyridopoulos I, Magner M et al. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol* 1998; 153: 381-394.
 41. Baffour R, Berman J, Garb JL, Rhee SW, Kaufman J, Friedmann P. Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose-response effect of basic fibroblast growth factor. *J Vasc Surg* 1992; 16: 181-191.
 42. Yang HT, Deschenes MR, Ogilvie RW, Terjung RT. Basic fibroblast growth factor increases collateral blood flow in rats with femoral artery ligation. *Circ Res* 1996; 79: 62-69.
 43. Chlegoun JO, Martins RN, Mitchell CA, Chirila TV. Basic FGF enhances the development of collateral circulation after acute arterial occlusion. *Biochem Biophys Res Comm* 1992; 185: 510-516.
 44. Lazarous DF, Unger EF, Epstein SE, Stine A, Arevalo JL, Chew EY et al. Basic fibroblast growth factor in patients with intermittent claudication: results of a phase I trial. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 1239-1244.
 45. Laham RJ, Rezaee M, García L, Post M, Sellke FW, Baim DS et al. Tissue and myocardial distribution of intracoronary, intravenous, intrapericardial and intramyocardial 125I-labeled basic fibroblast growth factor (bFGF) favor intramyocardial delivery [resumen]. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 10A.
 46. Hariawala MD, Horowitz JR, Esakof D, Sheriff DD, Walter DH, Keyt B et al. VEGF improves myocardial blood flow but produces EDRF-mediated hypotension in porcine hearts. *J Surg Res* 1996; 63: 77-82.
 47. 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: 272-281.
 48. 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: 2183-2189.
 49. Hughes CG, Biswas SS, Yin B, Baklanov DV, DeGrado TR, Coleman RE et al. Intramyocardial but not intravenous vascular endothelial growth factor improves regional perfusion in hibernating porcine myocardium [resumen]. *Circulation* 1999; 100: 1476.
 50. Harada K, Friedman M, López JJ, Wang SY, Li J, Prasad PV et al. Vascular endothelial growth factor in chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol* 1996; 270: H1791-H1802.
 51. Vale PR, Milliken CE, Tkebuchava T, Chen D, Iwaguro H, Magner M et al. Catheter-based gene transfer of VEGF utilizing electromechanical LV mapping accomplishes therapeutic angiogenesis: pre-clinical studies in swine [resumen]. *Circulation* 1999; 100: 1512.
 52. Tio RA, Tkebuchava T, Scheuermann TH, Lebherz C, Magner M, Kearney 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: 2953-2960.
 53. Vale PR, Tkebuchava T, Milliken CE, Chen D, Symes JF, Isner JM. Percutaneous electromechanical mapping demonstrates efficacy of pVGL1 (VEGF2) in an animal model of chronic myocardial ischemia [resumen]. *Circulation* 1999; 100: 122.
 54. 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: 168-176.
 55. Lee LY, Patel SR, Hackett NR, Mack CA, Polce DR, El-Sawy T et al. Focal angiogen therapy using intramyocardial delivery of an adenovirus vector coding for vascular endothelial growth factor 121. *Ann Thorac Surg* 2000; 69: 14-24.
 56. Lazarous DF, Shou M, Stiber JA, Hodge E, Thirumurti V, Goncalves L et al. Adenoviral-mediated gene transfer induces sustained pericardial VEGF expression in dogs: effect on myocardial angiogenesis. *Cardiovasc Res* 1999; 44: 294-302.
 57. Vale PR, Losordo DW, Tkebuchava T, Chen D, Milliken CE, Isner JM. Catheter-based myocardial gene transfer utilizing non-fluoroscopic electromechanical left ventricular mapping. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 246-254.
 58. Deutsch E, Tarazona N, Sanborn TA, Martin JL, Lee LY, Hackett N et al. Percutaneous endocardial gene therapy: patterns of in-vivo gene expression related to regional myocardial delivery [resumen]. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 6A.
 59. Kornowski R, Fuchs S, Vodovotz Y, Flynn MA, Gordon DA, Pierre A et al. Catheter-based transendocardial injection of adenoviral VEGF121 offers equivalent gene delivery and protein expression compared to a surgical-based transpericardial injection approach [resumen]. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 73A.
 60. Unger EF, Banai S, Shou M, Lazarous DF, Jaklitsch MT, Scheinowitz M et al. Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am J Physiol* 1994; 266: H1588-H1595.
 61. Lazarous DF, Scheinowitz M, Shou M, Hodge E, Rajanayagam S, Hunsberger S et al. Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. *Circulation* 1995; 91: 145-153.
 62. Lazarous DF, Shou M, Scheinowitz M, Hodge E, Thirumurti V, Kitsiou AN et al. Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and arterial response to injury. *Circulation* 1996; 94: 1074-1082.
 63. Rajanayagam MA, Shou M, Thirumurti V, Lazarous DF, Quyyumi AA, Goncalves L et al. Intracoronary basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral perfusion in dogs. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 519-526.
 64. Harada K, Grossman W, Friedman M, Edelman ER, Prasad PV, Keighley CS et al. Basic fibroblast growth factor improves myocardial function in chronically ischemic porcine hearts. *J Clin Invest* 1994; 94: 623-630.
 65. López JJ, Edelman ER, Stamler A, Hibberd MG, Prasad P, Caputo RP et al. Basic fibroblast growth factor in a porcine model of chronic myocardial ischemia: a comparison of angiographic, echocardiographic and coronary flow parameters. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282: 385-390.
 66. Laham RJ, Rezaee M, Post M, Novicki D, Sellke FW, Pearlman JD et al. Intrapericardial delivery of fibroblast growth factor-2

- induces neovascularization in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292: 795-802.
67. Banai S, Jaklitsch MT, Casscells W, Shou M, Shrivastav S, Correa R et al. Effects of acidic fibroblast growth factor on normal and ischemic myocardium. *Circ Res* 1991; 69: 76-85.
 68. Unger EF, Shou M, Sheffield CD, Hodge E, Jaye M, Epstein SE. Extracardiac to coronary anastomoses support regional left ventricular function in dogs. *Am J Physiol* 1993; 264: H1567-H1574.
 69. Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Mayskiy M et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998; 98: 2800-2804.
 70. 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: preliminary clinical results. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 830-837.
 71. Esakof DD, Mayskiy M, Losordo DW, Vale PR, Lathi K, Pastore JO et al. Intraoperative multiplane transesophageal echocardiography for guiding direct myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor in patients with refractory angina pectoris. *Human Gene Ther* 1999; 10: 2307-2314.
 72. Shen Y-T, Vatner SF. Mechanism of impaired myocardial function during progressive coronary stenosis in conscious pigs: hibernation versus stunning? *Circ Res* 1995; 76: 479-488.
 73. Wijns W, Vatner SF, Camici PG. Hibernating myocardium. *N Engl J Med* 1998; 3: 173-181.
 74. Dilsizian V, Bonow RO. Current diagnostic techniques of assessing myocardial viability in patients with hibernating and stunned myocardium. *Circulation* 1993; 87: 1-20.
 75. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, Mayskiy M, Esakof DD, Symes JF et al. Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF165 gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2000; 102: 965-974.
 76. March KL. Methods of local gene delivery to vascular tissues. *Sem Interv Cardiol* 1996; 1: 215-223.
 77. Kornowski R, Leon MB, Fuchs S, Vodovotz Y, Flynn MA, Gordon DA et al. Electromagnetic guidance for catheter-based transcatheter injection: a platform for intramyocardial angiogenesis therapy. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 1031-1039.
 78. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, Schatz RA, Fortuin FD, Clin S et al. Randomized, placebo-controlled clinical study of percutaneous catheter-based left ventricular endocardial gene transfer of VEGF-2 for myocardial angiogenesis in patients with chronic myocardial ischemia [resumen]. *Circulation* 2000; 102: II563.
 79. Laham RJ, Sellke FW, Edelman ER, Pearlman JD, Ware JA, Brown DL et al. Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery: results of a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation* 1999; 100: 1865-1871.
 80. Stegmann TJ, Hoppert T, Schlurmann W, Gemeinhardt S. First angiogenic treatment of coronary heart disease by FGF-1: long-term results after 3 years. *Cardiac and Vascular Regeneration* 2000; 1: 5-10.
 81. Stegmann TJ, Hoppert T, Schneider A, Gemeinhardt S, Kocher M, Ibing R et al. Induction of myocardial neovascularization by human growth factors. A new therapeutic option in coronary heart disease. *Herz* 2000; 25: 589-599.
 82. Henry TD, Rocha-Singh K, Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ, Simons M et al. Results of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor (rhVEGF) administration trial [resumen]. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 65A.
 83. Henry TD, Annex BH, Azrin MA, McKendall GR, Willerson JT, Hendel RC et al. Final results of the VIVA trial of rhVEGF for human therapeutic angiogenesis [resumen]. *Circulation* 1999; 100: 1476.
 84. Ferguson JJ. Meeting highlights: highlights of the 48th scientific sessions of the American College of Cardiology. *Circulation* 1999; 100: 570-575.
 85. Henry TD, McKendall GR, Azrin MA, López JJ, Benza R, Willerson JT et al. VIVA trial: one year follow up [resumen]. *Circulation* 2000; 102: II309.
 86. Kleiman NS, Califf RM. Results from late-breaking clinical trials sessions at ACCIS 2000 and ACC 2000. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 310-311.
 87. Asahara T, Bauters C, Pastore C, Kearney M, Rossow S, Bunting S et al. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation* 1995; 91: 2793-2801.
 88. Asahara T, Chen D, Tsurumi Y, Kearney M, Rossow S, Passeri J et al. Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function following phVEGF165 gene transfer. *Circulation* 1996; 94: 3291-3302.
 89. Van Belle E, Tio FO, Couffinhal T, Maillard L, Passeri J, Isner JM. Stent endothelialization: time course, impact of local catheter delivery, feasibility of recombinant protein administration, and response to cytokine expedition. *Circulation* 1997; 95: 438-448.
 90. Van Belle E, Tio FO, Chen D, Maillard L, Kearney M, Isner JM. Passivation of metallic stents following arterial gene transfer of phVEGF165 inhibits thrombus formation and intimal thickening. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29: 1371-1379.
 91. Springer ML, Chen AS, Kraft PE, Bednarski M, Blau HM. VEGF gene delivery to muscle: potential role of vasculogenesis in adults. *Mol Cell* 1998; 2: 549-558.
 92. 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: 1323-1330.
 93. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluids of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994; 331: 1480-1487.
 94. Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD et al. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1999; 286: 2511-2514.
 95. Horowitz JR, Rivard A, van der Zee R, Hariawala M, Sheriff DD, Esakof DD et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor produces nitric oxide-dependent hypotension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2793-2800.
 96. Van der Zee R, Murohara T, Luo Z, Zollmann F, Passeri J, Lekutat C et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF) augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation* 1997; 95: 1030-1037.
 97. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 1998; 101: 2567-2578.
 98. Cooper LT, Hirsch AT, Regensteine JG, Casscells SW. A double-blind, placebo-controlled, phase II study of basic fibroblast growth factor in the treatment of intermittent claudication [resumen]. *Circulation* 2000; 102: II373.
 99. Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J. Angiogenesis inhibitors endostatin and TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1999; 99: 1726-1732.
 100. Vale PR, Wuensch DI, Rauh GF, Rosenfield K, Schainfeld RM, Isner JM. Arterial gene therapy for inhibiting restenosis in patients with claudication undergoing superficial femoral artery angioplasty. *Circulation* 1998; 98: I66.
 101. Laitinen M, Hartikainen J, Hiltunen MO, Eranen J, Kiviniemi M, Narvanen O et al. Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary arteries after angioplasty. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 263-270.

102. Takeshita S, Tsurumi Y, Couffinahl T, Asahara T, Bauters C, Symes J et al. Gene transfer of naked DNA encoding for three isoforms of vascular endothelial growth factor stimulates collateral development in vivo. *Lab Invest* 1996; 75: 487-502.
103. López JJ, Edelman ER, Stamler A, Hibberd MG, Prasad P, Thomas KA et al. Angiogenic potential of perivascularly delivered aFGF in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol* 1998; 274: H930-H936.
104. Vale PR, Rauh G, Wuensch DI, Pieczek A, Schainfeld RM. Influence of vascular endothelial growth factor on diabetic retinopathy [resumen]. *Circulation* 1998; 17: I353.
105. Schofield PM, Sharples LD, Caine N, Burns S, Tait S, Wistow T et al. Transmyocardial laser revascularisation in patients with refractory angina: a randomised controlled trial. *Lancet* 1999; 353: 519-524.
106. Burkhoff D, Schmidt S, Schulman SP, Myers J, Resar J, Becker LC et al. Transmyocardial laser revascularisation compared with continued medical therapy for treatment of refractory angina pectoris: a prospective randomised trial. *Lancet* 1999; 354: 885-890.
107. Allen KB, Dowling RD, Fudge TL, Schoettle GP, Selinger SL, Gangahar DM et al. Comparison of transmyocardial revascularization with medical therapy in patients with refractory angina. *N Engl J Med* 1999; 341: 1029-1036.
108. Frazier OH, March RJ, Horvath KA, for the Transmyocardial Carbon Dioxide Laser Revascularization Study Group. Transmyocardial revascularization with a carbon dioxide laser in patients with end-stage coronary artery disease. *N Engl J Med* 1999; 341: 1021-1028.
109. Aaberge L, Nordstrand K, Dragsund M, Saatvedt K, Endresen K, Golf S et al. Transmyocardial revascularization with CO₂ laser in patients with refractory angina pectoris: clinical results from the Norwegian randomized trial. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 1170-1177.