



**CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA**  
**Investigaciones Biomédicas**  
**División de Farmacéuticos**

**Transferencia génica del VEGF<sub>121</sub> por medio de un vector  
plasmídico. Una estrategia potencialmente útil para el  
tratamiento de enfermedades vasculares isquémicas**

**Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas**

**Autora: Lic. Ariana García Ojalvo**

**Tutora: Dra. Isis Torréns Madrazo**

**Ciudad de La Habana, Cuba**

**2009**

## **INSTITUCIONES E INVESTIGADORES PARTICIPANTES**

La presente investigación se llevó a cabo gracias al esfuerzo coordinado de varias instituciones, así como al trabajo y la experiencia profesional de numerosos investigadores especializados en diferentes áreas del conocimiento científico. Sirva este apartado como reconocimiento al valioso aporte de cada uno de ellos a los resultados presentados.

### **Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología**

Alina Seralena, Nelson Santiago Vispo, Martha González Griego, Raysa Vázquez, Mariela Pérez, Martha Pupo, Miladys Limonta, Mayda Candelario, Maribel Vega, Yaquelin Puchades, Yssel Mendoza, Mónica Bequet, Humberto Lamdan, Karelía Cosme, Dania Bacardí, Lizet Aldana, Dagmara Pichardo, Nelson Merino, José Suárez Alba, Ariel Vázquez, Alfonso Alí, Elizeth García, Ricardo Silva, Pedro López Saura, Gerardo Guillén, Luis Herrera.

### **Instituto de Angiología y Cirugía Vascular**

José F. Montequín, Alfredo Aldama, María Antonia Alfonso, Rafael Simón, Armando Seuc.

### **Hospital Clínico-Quirúrgico Hermanos Ameijeiras**

Alejandro Villar, Luis Guevara, Noel González, Nicolás Chaos, Rafael González, Rigoberto Chil, Elba Garzón, Camilo Reina, Luis Reynaldo Suárez, Tomás Méndez, Gerardo Senra, Reynaldo Milán, Osmar Creach, Gladys Fleites, Manuel Naffe, Sergio Padrón, Lissette Rodríguez, Yuliette Suárez, Melba Márquez, Jorge L. Tápanes. Personal técnico, de enfermería, y anestesiistas del Servicio de Cirugía Cardiovascular del HHA.

### **Centro de Investigaciones Clínicas**

Juan F. Batista, Yamilé Peña, Marcos Coca, Alejandro Perera, Luis Rochela, Francisco Sáez, María Amelia Valdés.

### **Instituto de Investigaciones Porcinas**

Heberto Domínguez, Tamara García-Osuna, José Luis Reyes, Julio Cabrera.

## **SÍNTESIS**

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de muerte en los países desarrollados y también en Cuba. Una proporción significativa de los pacientes con enfermedades vasculares isquémicas permanecen refractarios a las terapias farmacológicas y no son candidatos adecuados para las intervenciones de revascularización percutáneas o quirúrgicas. Esta situación ha conducido al desarrollo de la angiogénesis terapéutica, una novedosa estrategia que consiste en la utilización de factores de crecimiento angiogénicos, o de los genes que los codifican, para estimular el desarrollo de vasos sanguíneos colaterales en los tejidos isquémicos. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es uno de los más atractivos y mejor estudiados en este sentido. El VEGF es una glicoproteína con actividad mitogénica específica sobre las células endoteliales.

En la presente investigación se documenta la generación de un plasmidio portador del gen de la isoforma de 121 aminoácidos del VEGF (VEGF<sub>121</sub>), y su aplicación como vector de terapia génica con potencial utilidad para el tratamiento de enfermedades vasculares isquémicas. El trabajo comprende el diseño y la construcción genética del vector, la caracterización en experimentos *in vitro*, la demostración de seguridad en animales sanos, la evaluación en dos modelos animales, uno de isquemia de miembros inferiores y otro de isquemia del miocardio; así como las primeras evidencias de su efecto terapéutico en pacientes con cardiopatía isquémica.

Esta tesis recoge los primeros estudios de terapia génica en Cuba, lo cual ubica a nuestro país entre los pioneros en este campo de la investigación científica. Los resultados presentados forman parte de tres publicaciones en revistas científicas arbitradas, y se han dado a conocer en diez congresos internacionales.

**GLOSARIO**

AAV: del inglés *adeno-associated virus*, virus adeno-asociados  
Abs: Absorbancia  
ACTP: angioplastia coronaria transluminal percutánea  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
ADNc: ADN complementario  
AdVEGF<sub>165</sub>: vector adenoviral portador del gen del VEGF<sub>165</sub>  
Ang: angiopoyetina  
ANOVA: análisis de varianza  
ARN: ácido ribonucleico  
ARNm: ARN mensajero  
ASAT: aspartato amino-transferasa  
BCA: del inglés, *bicinchoninic acid*, ácido bicinconínico  
BSA: del inglés, *bovine serum albumin*, albúmina de suero bovino  
CECMED: Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos  
CEIC: Comité de Ética en la Investigación Científica  
CENPALAB: Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio  
CMHs: células madre hematopoyéticas  
CMV: citomegalovirus  
dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato  
DO: densidad óptica  
DS: desviación estándar  
DT: dosis terapéutica  
EGF: del inglés *epidermal growth factor*, factor de crecimiento epidérmico  
ELISA: del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*, ensayo inmunoenzimático en fase sólida  
Epo: eritropoyetina  
FGF: del inglés *fibroblast growth factor*, factor de crecimiento de fibroblastos  
GENASIS: del inglés *Genetic Angiogenic Stimulation Investigational Study*  
GM-CSF: del inglés *granulocyte macrophage- colony stimulating factor*, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos  
HGF: del inglés *hepatocyte growth factor*, factor de crecimiento de hepatocitos  
HIF: del inglés *hypoxia-inducible factor*, factor inducible por hipoxia  
HMEC: del inglés *human microvascular endothelial cells*, células endoteliales microvasculares humanas  
HUVEC: del inglés *human umbilical vein endothelial cells*, células endoteliales humanas de vena umbilical  
Ig: inmunoglobulina  
IGF: del inglés *insulin-like growth factor*, factor de crecimiento semejante a la insulina  
IL: interleucina  
i.m.: intramuscular  
i.m.c.: intramúsculo cardiaco  
KAT: del inglés *Kuopio Angiogenesis Trial*  
Kd: constante de disociación  
KGF: del inglés *keratinocyte growth factor*, factor de crecimiento de queratinocitos  
LB: Luria Bertani  
LDH: del inglés *lactic deshidrogenase*, deshidrogenasa láctica

- MCP: del inglés *monocyte chemoattractant protein*, proteína quimioatrayente de los monocitos
- MMPs: del inglés *matrix metalloproteinases*, metaloproteinasas de la matriz
- NO: óxido nítrico
- NORTHERN: del inglés *NOGA angiogenesis Revascularization Therapy: Evaluation by Radionuclide imaging*
- NOS: NO sintasa
- eNOS: NOS endotelial
- iNOS: NOS inducible
- NP: neuropilina
- NTG: Nitroglicerina
- PCR: del inglés *polimerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa
- PDGF: del inglés *platelet-derived growth factor*, factor de crecimiento derivado de plaquetas
- PEI: polietilénimina
- PI3K: del inglés *phosphatidylinositol 3-kinase*, fosfatidilinositol 3-quinasa
- PIGF: del inglés *placental growth factor*, factor de crecimiento placentario
- PPM: Patrón de peso molecular
- RAVE: del inglés *Regional Angiogenesis with Vascular Endothelial growth factor in peripheral arterial disease*
- REVASC: del inglés *Randomized Evaluation of Vascular endothelial growth factor Angiogenesis in Severe Coronary artery disease*
- RT-PCR: del inglés *reverse transcription – polimerase chain reaction*, transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
- SCC: Sociedad Cardiovascular Canadiense
- SFB: suero fetal bovino
- SMC: sitio múltiple de clonación
- SPECT: del inglés *single photon emission computed tomography*, tomografía computarizada de emisión de fotón único
- SV: del inglés *simian virus*, virus de simio
- <sup>99m</sup>Tc-MIBI: metoxi-isobutil-isonitrilo marcado con <sup>99m</sup>Tc
- TGF: del inglés *transforming growth factor*, factor de crecimiento transformante
- TGO: transaminasa glutámico-oxaloacética
- TGP: transaminasa glutámico-pirúvica
- TNF: del inglés *tumor necrosis factor*, factor de necrosis tumoral
- ufc: unidad formadora de colonias
- VEGF: del inglés *vascular endothelial growth factor*, factor de crecimiento del endotelio vascular
- VEGFR: del inglés *vascular endothelial growth factor receptor*, receptor del VEGF
- VHL: von Hippel-Lindau
- VIH: virus de la inmunodeficiencia humana
- VIVA: del inglés *Vascular endothelial growth factor in Ischaemia for Vascular Angiogenesis*
- VPF: del inglés *vascular permeability factor*, factor de permeabilidad vascular

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>6</b>
<b>2.1. EL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)</b>	<b>6</b>
2.1.1. Identificación del VEGF	6
2.1.2. La familia de genes del VEGF	6
2.1.3. Isoformas del VEGF	9
2.1.4. Actividades del VEGF	10
2.1.4.1. <i>Angiogénesis, mitogénesis, y supervivencia de las células endoteliales</i>	10
2.1.4.2. <i>Homeostasia vascular</i>	11
2.1.4.3. <i>Efectos del VEGF sobre las células de la médula ósea y la hematopoyesis</i>	11
2.1.4.4. <i>Permeabilidad vascular y efectos hemodinámicos</i>	12
2.1.5. Regulación de la expresión del gen del VEGF	13
2.1.5.1. <i>Tensión de oxígeno</i>	13
2.1.5.2. <i>Factores de crecimiento, hormonas y oncogenes</i>	13
2.1.6. Receptores del VEGF	14
2.1.6.1. <i>VEGFR-1 (Flt-1)</i>	15
2.1.6.2. <i>VEGFR-2 (KDR, humano; Flk-1, ratón)</i>	16
2.1.6.3. <i>Neuropilina (NP) -1 y NP-2</i>	17
<b>2.2. FISIOPATOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES VASCULARES ISQUÉMICAS</b>	<b>17</b>
2.2.1. Formación de la lesión aterosclerótica	18
2.2.2. Papel del VEGF en la aterosclerosis	19
2.2.3. Angiogénesis terapéutica	20
<b>2.3. TERAPIA GÉNICA</b>	<b>21</b>
2.3.1. Vectores de terapia génica	22
2.3.1.1. <i>Vectores virales</i>	22
2.3.1.2. <i>Vectores no virales</i>	23
2.3.2. Vías y procedimientos de transferencia génica	25
2.3.3. Aplicaciones de la terapia génica angiogénica	26
2.3.3.1. <i>Estudios preclínicos en modelos animales de isquemia de miembros inferiores</i>	27
2.3.3.2. <i>Estudios clínicos en pacientes con enfermedad vascular periférica</i>	28
2.3.3.3. <i>Estudios preclínicos en modelos animales de isquemia del miocardio</i>	29
2.3.3.4. <i>Estudios clínicos en pacientes con cardiopatía isquémica</i>	30
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>34</b>
<b>3.1. REACTIVOS QUÍMICOS</b>	<b>34</b>
<b>3.2. MEDIOS DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS</b>	<b>34</b>

<b>3.3. ENZIMAS</b>	<b>34</b>
<b>3.4. PLASMIDIOS</b>	<b>34</b>
<b>3.5. OLIGONUCLEÓTIDOS</b>	<b>35</b>
<b>3.6. MICROORGANISMOS</b>	<b>35</b>
<b>3.7. CÉLULAS DE MAMÍFEROS</b>	<b>35</b>
<b>3.8. ANIMALES</b>	<b>35</b>
<b>3.9. CONSTRUCCIÓN GENÉTICA DEL VECTOR PVEGF<sub>121</sub></b>	<b>36</b>
3.9.1. Técnicas generales de Biología Molecular	36
3.9.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	36
3.9.3. Secuenciación de ADN	36
<b>3.10. PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO</b>	<b>37</b>
3.10.1. Purificación de ADN plasmídico a mediana escala	37
3.10.2. Purificación de ADN plasmídico a gran escala	37
<b>3.11. MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS PREPARACIONES DE ADN PLASMÍDICO PURIFICADO A GRAN ESCALA</b>	<b>38</b>
3.11. 1. Determinación de la concentración de ADN plasmídico	38
3.11.2. Determinación del porcentaje de ADN plasmídico superenrollado	38
3.11.3. Determinación de la concentración de proteínas	38
<b>3.12. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS CON ADN PLASMÍDICO</b>	<b>38</b>
<b>3.13. ELISA ANTI-VEGF</b>	<b>39</b>
<b>3.14. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA</b>	<b>39</b>
3.14.1. Ensayo de proliferación de células endoteliales	39
3.14.2. Ensayo de actividad angiogénica <i>in vitro</i>	40
<b>3.15. ANÁLISIS EXPLORATORIO DE LA TOXICIDAD EN RATAS SANAS</b>	<b>40</b>
3.15.1. Administración de pVEGF <sub>121</sub>	41
3.15.2. Determinación del peso corporal y del consumo de alimento	42
3.15.3. Observación de los animales	42
3.15.4. Preparación de muestras para estudios histopatológicos	42
<b>3.16. APLICACIÓN DEL PVEGF<sub>121</sub> EN UN MODELO CANINO DE ISQUEMIA DE MIEMBROS INFERIORES</b>	<b>42</b>
3.16.1. Modelo de isquemia de miembros inferiores en perro	43
3.16.2. Administración intramuscular de pVEGF <sub>121</sub>	43
3.16.3. Estudios hemodinámicos	43
3.16.3.1. Índice de presiones	44
3.16.3.2. Reserva vasomotora	44
3.16.4. Angiografía	44
3.16.5. Estudios hematológicos	45

3.16.6. Observación de los animales	45
<b>3.17. APLICACIÓN DEL PVEGF<sub>121</sub> EN UN MODELO PORCINO DE ISQUEMIA DEL MIOCARDIO</b>	<b>45</b>
3.17.1. Modelo de isquemia del miocardio en cerdo	45
3.17.2. Administración intramiocárdica de pVEGF <sub>121</sub>	46
3.17.3. Tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT)	47
3.17.4. Observación de los animales	48
<b>3.18. APLICACIÓN DEL PVEGF<sub>121</sub> EN PACIENTES CON CARDIOPATÍA ISQUÉMICA CRÍTICA</b>	<b>48</b>
3.18.1. Consideraciones éticas	48
3.18.2. Diseño general	48
3.18.3. Pacientes	48
3.18.4. Tratamiento	49
3.18.5. Evaluación de la seguridad	49
3.18.5.1. <i>Eventos adversos</i>	49
3.18.5.2. <i>Parámetros de laboratorio clínico</i>	50
3.18.6. Determinación de la concentración sérica de VEGF	50
3.18.7. Evaluación del efecto terapéutico	50
3.18.7.1. <i>Evaluación clínica</i>	50
3.18.7.2. <i>Tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT)</i>	50
<b>3.19. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>51</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>52</b>
<b>4.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL VECTOR PVEGF<sub>121</sub></b>	<b>52</b>
4.1.1. Generación de plasmidios codificantes para el gen del VEGF <sub>121</sub>	52
4.1.2. Purificación a mediana escala de los plasmidios codificantes para el gen del VEGF <sub>121</sub>	53
4.1.3. Expresión del gen del VEGF <sub>121</sub> en células CHO-K1 transfectadas con los plasmidios recombinantes	54
4.1.4. Actividad biológica del VEGF <sub>121</sub> expresado en células CHO-K1	54
4.1.5. Purificación a gran escala y caracterización de las preparaciones del plasmidio pVEGF <sub>121</sub>	56
<b>4.2. ANÁLISIS EXPLORATORIO DE LA TOXICIDAD DEL VECTOR PVEGF<sub>121</sub></b>	<b>57</b>
4.2.1. Peso corporal y consumo de alimento	57
4.2.2. Observaciones clínicas	58
4.2.3. Hallazgos macroscópicos	58
4.2.4. Hallazgos microscópicos	59
<b>4.3. EVALUACIÓN DEL VECTOR PVEGF<sub>121</sub> EN UN MODELO CANINO DE ISQUEMIA DE MIEMBROS INFERIORES</b>	<b>61</b>
4.3.1. Estudios hemodinámicos	61



4.3.2. Estudio angiográfico	63
4.3.3. Estudios hematológicos y observaciones clínicas	64
<b>4.4. EVALUACIÓN DEL VECTOR pVEGF<sub>121</sub> EN UN MODELO PORCINO DE ISQUEMIA DEL MIOCARDIO</b>	<b>64</b>
<b>4.5. APLICACIÓN DEL VECTOR pVEGF<sub>121</sub> A PACIENTES CON CARDIOPATÍA ISQUÉMICA CRÍTICA</b>	<b>67</b>
4.5.1. Caracterización demográfica y clínica de los pacientes	67
4.5.2. Curso operatorio	67
4.5.3. Evaluación de la seguridad	68
4.5.3.1. <i>Eventos adversos</i>	68
4.5.3.2. <i>Parámetros de laboratorio clínico</i>	69
4.5.4. Concentración sérica de VEGF	70
4.5.5. Evaluación del efecto terapéutico	71
4.5.5.1. <i>Evaluación clínica</i>	71
4.5.5.2. <i>Evaluación de la perfusión miocárdica</i>	71
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>74</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>99</b>
<b>7. RECOMENDACIONES</b>	<b>100</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>101</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>122</b>
<b>Anexo 1.</b> Esquema de la purificación de ADN plasmídico a mediana escala mediante el juego de reactivos EndoFree Plasmid Mega Kit (Qiagen, Alemania)	122
<b>Anexo 2.</b> Diagrama de flujo del proceso de purificación de ADN plasmídico a gran escala	123
<b>Anexo 3.</b> Especificaciones de calidad de los lotes de pVEGF <sub>121</sub>	125
<b>Anexo 4.</b> Definiciones de términos médicos	126
<b>Anexo 5.</b> Consentimiento de participación en la investigación	127
<b>Anexo 6.</b> Clasificación funcional de la angina según la Sociedad Cardiovascular Canadiense	130
<b>Anexo 7.</b> Técnica quirúrgica de toracotomía	131
<b>Anexo 8.</b> Clasificación de los eventos adversos	132
<b>Anexo 9.</b> Imágenes gammagráficas de los animales correspondientes al estudio en el modelo porcino de isquemia del miocardio	133
<b>Anexo 10.</b> Parámetros de laboratorio de los pacientes tratados con pVEGF <sub>121</sub>	135
<b>10. AUTOBIBLIOGRAFÍA</b>	<b>139</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de muerte en los países desarrollados y en Cuba. Estas patologías provocan alrededor de 17 millones de fallecimientos por año, lo cual representa el 30% de todas las muertes a nivel mundial (WHO, 2009). La cardiopatía isquémica y la enfermedad vascular periférica se encuentran entre las enfermedades cardiovasculares de mayor incidencia, y están asociadas a una alta morbi-mortalidad.

La cardiopatía isquémica afecta a cerca de 6,8 millones de personas en EE.UU. (Yla-Herttuala y cols., 2007). En Cuba, esta enfermedad tiene una incidencia anual de 153 por 100 000 habitantes, y se presenta en 5 al 10% de la población mayor de 15 años (Suarez y cols., 2008). La cardiopatía isquémica es responsable de más del 80% de los fallecimientos por causas cardiovasculares, y de casi un 25% de la tasa de mortalidad total del país (MINSAP, 2008). La enfermedad vascular periférica afecta entre 500 y 1000 individuos por millón de habitantes cada año (Ciancaglini, 2005). La incidencia en Cuba es de 500 casos por millón de habitantes por año (MINSAP, 2008). Esta patología se presenta en 12 al 14% de la población, y su prevalencia se incrementa con la edad (Shammas, 2007). Con el tiempo, progresa hacia la isquemia crítica de miembros inferiores.

Los tratamientos actuales para ambas enfermedades comprenden la terapia farmacológica, la modificación de los factores de riesgo, y las intervenciones de revascularización quirúrgicas (cirugía de *bypass*) y percutáneas (angioplastia transluminal percutánea). Sin embargo, existe un grupo no despreciable de pacientes refractarios al tratamiento farmacológico, y que no son candidatos adecuados para estos procedimientos de revascularización debido a la extensión y a la naturaleza difusa de su enfermedad arterial. Tales grupos se estiman entre 6 y 12% de los pacientes con cardiopatía isquémica crítica (Lekas y cols., 2006), y alrededor del 20% de los casos de isquemia crítica de miembros inferiores (Yla-Herttuala y cols., 2007).

En el caso de la cardiopatía isquémica, estos pacientes permanecen incapacitados por frecuentes episodios de angina, por lo que su calidad de vida es muy pobre. La única opción terapéutica es el trasplante cardiaco, que no siempre es posible debido a la escasa disponibilidad de donantes. Los pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores padecen dolor de reposo, úlceras isquémicas y gangrena. El tratamiento recomendado en estos casos es la amputación (Baumgartner y cols., 1998), que además de estar asociada a elevadas morbilidad y mortalidad, repercute negativamente en la calidad de vida del individuo. Los pacientes amputados tienen probabilidades del 40-50% de perder la segunda extremidad por amputación en un plazo de 2-5 años (Sontheimer, 2006).

En consecuencia, existe una imperiosa necesidad de alternativas terapéuticas para estos pacientes con enfermedades vasculares isquémicas, que no tienen otra opción de tratamiento. La angiogénesis terapéutica es una novedosa estrategia desarrollada en este sentido, que consiste en la utilización de factores de crecimiento angiogénicos, o de los genes que los codifican, para estimular el desarrollo de vasos sanguíneos colaterales en los tejidos isquémicos.

La terapia con factores de crecimiento recombinantes presenta limitaciones con respecto a la angiogénesis terapéutica: Una vez administradas, estas proteínas tienen un corto tiempo de vida media (minutos). En consecuencia, la administración en forma de bolo no es capaz de mantener una concentración de la proteína suficientemente elevada en el tiempo, para lograr el efecto terapéutico deseado (Lekas y cols., 2006). Por otra parte, las dosis altas de factores de crecimiento recombinantes pueden estar asociadas a eventos adversos (Hariawala y cols., 1996). En contraste, la terapia génica funciona como un sistema sofisticado de liberación sostenida, puesto que el gen transferido es capaz de expresarse durante períodos de tiempo más prolongados (días a meses, en dependencia del vector utilizado). Esto permite mantener los niveles del factor proteico lo suficientemente elevados y estables para ejercer su acción terapéutica.

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Leung y cols., 1989; Keck y cols., 1989) es uno de los factores más atractivos y mejor estudiados en relación con la terapia génica angiogénica. El VEGF es una glicoproteína dimérica de unión a heparina que presenta actividad mitogénica específica sobre las células endoteliales, ya que sus receptores VEGFR-1 y -2 están restringidos a ese tipo de células (Ferrara, 2004). Esta especificidad representa una ventaja del VEGF para la angiogénesis terapéutica, dado que las células endoteliales constituyen el elemento celular más importante para la formación de nuevos vasos sanguíneos. Además, tanto el VEGF como el VEGFR-2 se inducen bajo condiciones de hipoxia, de modo que el efecto angiogénico se localiza de manera preferencial en los tejidos isquémicos.

El gen del VEGF humano está organizado en ocho exones. Como resultado de la eliminación alternativa de intrones, se generan 4 isoformas fundamentales, compuestas por 121, 165, 189, y 206 aminoácidos, respectivamente (Tischer y cols., 1991). Las propiedades biológicas que distinguen a las diferentes isoformas son la capacidad de unión a la heparina, el patrón de secreción, y la afinidad por co-receptores que potencian la transducción de señales. No obstante, se ha demostrado que las isoformas 121, 165, y 189 son biológicamente equivalentes con respecto a la angiogénesis *in vivo* (Takeshita y cols., 1996b; Cherng y cols., 2000).

Varios estudios preclínicos de transferencia génica han demostrado que la expresión de VEGF es capaz de estimular el desarrollo de vasos colaterales en modelos animales de isquemia de miembros inferiores (Tsurumi y cols., 1997) y de isquemia del miocardio (Tio y cols., 1999; Lee y cols., 2000a).

Subsecuentemente, varios ensayos clínicos han documentado la eficacia de la transferencia génica del VEGF en pacientes con enfermedad vascular periférica (Rajagopalan y cols., 2001; Kim y cols., 2004) y cardiopatía isquémica (Rosengart y cols., 1999a; Sarkar y cols., 2001). Estas investigaciones se basan en dos estrategias fundamentales, las cuales se limitan a la transferencia génica de la isoforma 165 (VEGF<sub>165</sub>) mediante un vector plasmídico desnudo (Tsurumi y cols., 1997; Tio y cols., 1999; Sarkar y cols., 2001; Kim y cols., 2004), y al empleo de un vector adenoviral para transferir el gen de la isoforma 121 (VEGF<sub>121</sub>) (Rosengart y cols., 1999a; Lee y cols., 2000a; Rajagopalan y cols., 2001).

Los vectores adenovirales son  $10^3$ - $10^4$  veces más eficientes que el ADN plasmídico desnudo en la transfección *in vivo* (Crystal y cols., 2002). Sin embargo, la administración de vectores virales puede inducir una respuesta inmune masiva, capaz de provocar una inmunopatología grave, y de reducir la sensibilidad del organismo receptor a los efectos del transgen (Epstein y cols., 2001). Esta respuesta pudiera también mediar la destrucción de las células transfectadas. La utilización de vectores plasmídicos no presenta tales problemas inmunológicos, por lo que resulta una estrategia más segura para el

paciente. Además, la purificación del ADN plasmídico es más simple y menos costosa que la de los vectores virales (Lyon y cols., 2008).

El plasmidio phVEGF<sub>165</sub> (Isner y cols., 1995) se ha utilizado anteriormente para la transferencia génica del VEGF<sub>165</sub>. No obstante, este vector presenta algunos inconvenientes: contiene el origen de replicación del bacteriófago filamentoso f1, que es una secuencia irrelevante en relación con la transferencia génica. Además, porta un gen de resistencia a ampicilina, que contiene dos secuencias inmunoestimuladoras o motivos CpG, capaces de potenciar la respuesta inmune contra el factor terapéutico codificado (Rodríguez, 2004).

El vector plasmídico pAEC-Δ2 (Herrera y cols., 2000), obtenido en el CIGB, posee algunos elementos en común con el phVEGF<sub>165</sub>. Sin embargo, el pAEC-Δ2 está compuesto por los elementos esenciales para la expresión en células de mamíferos y para su propagación en bacteria, de modo que carece de secuencias irrelevantes. Como marcador de selección, porta un gen de resistencia a kanamicina, que no presenta secuencias inmunoestimuladoras. Este vector tampoco contiene secuencias homólogas al genoma humano. Estos elementos señalan al pAEC-Δ2 como un vector más compacto, y posiblemente más seguro, en relación con la transferencia de genes terapéuticos.

Sobre la base de los elementos antes expuestos, se definió la siguiente **hipótesis de trabajo**:

**La transferencia génica de la isoforma 121 del VEGF por medio de un plasmidio basado en el vector pAEC-Δ2 es capaz de promover la angiogénesis terapéutica en el músculo esquelético y en el miocardio sometidos a condiciones de isquemia crónica.**

Para demostrar la validez de esta hipótesis, el trabajo se estructuró en los siguientes **objetivos**:

1. Obtener y caracterizar *in vitro* un vector plasmídico basado en el pAEC-Δ2 y portador del gen que codifica para el VEGF<sub>121</sub>.
2. Evaluar de manera preliminar la toxicidad del plasmidio en animales sanos.
3. Evaluar el efecto del plasmidio en modelos animales de enfermedades vasculares isquémicas.
4. Obtener las primeras evidencias de la prueba de concepto en pacientes con cardiopatía isquémica crítica.

Con vistas a cumplimentar estos objetivos, se diseñaron las siguientes **tareas experimentales**:

1. Clonación del gen que codifica para el VEGF<sub>121</sub> en el vector pAEC-Δ2. Purificación de los clones recombinantes a partir de cultivos de bacterias transformadas.
2. Transfección de células CHO-K1 con los clones recombinantes y determinación de los niveles de expresión de VEGF en los sobrenadantes de cultivo.
3. Evaluación de la actividad biológica del VEGF expresado en células CHO-K1 a través de ensayos *in vitro* sobre células endoteliales humanas.
4. Purificación a gran escala de uno de los clones recombinantes y caracterización físico-química de las preparaciones de ADN plasmídico.
5. Análisis exploratorio de la toxicidad del plasmidio seleccionado mediante la administración de diferentes dosis en ratas sanas.

6. Evaluación del efecto terapéutico del plasmidio en un modelo canino de isquemia de miembros inferiores, mediante estudios hemodinámicos y angiográficos.
7. Evaluación del efecto terapéutico del plasmidio en un modelo porcino de isquemia del miocardio, mediante estudios de perfusión miocárdica.
8. Administración del plasmidio a pacientes con cardiopatía isquémica crítica. Obtención de las primeras evidencias de su posible utilidad para la terapia génica angiogénica, mediante las evaluaciones de la seguridad y del efecto terapéutico.

La terapia génica constituye una estrategia novedosa, que ha abierto nuevas posibilidades para el tratamiento de enfermedades genéticas hereditarias, enfermedades con un componente genético no necesariamente hereditarias, y enfermedades adquiridas. La importancia de esta investigación radica en la generación de un vector plasmídico para la terapia génica, cuya evaluación abarcó desde los ensayos *in vitro* en el laboratorio y los ensayos en animales hasta las primeras evidencias en humanos, lo cual ubica a nuestro país entre los pioneros en este campo de la investigación científica.

La novedad científica de este trabajo consiste en la utilización por primera vez, de un plasmidio basado en el vector pAEC- $\Delta$ 2 para la transferencia génica del VEGF<sub>121</sub> con el fin de estimular la angiogénesis terapéutica. Este nuevo vector de terapia génica demostró su capacidad para inducir un efecto terapéutico en animales y en humanos. Esta investigación recoge los primeros estudios de terapia génica en Cuba, los cuales se han sumado a los existentes en el estado del arte, como un aporte relevante al conocimiento.

En el orden metodológico, esta investigación ha sido de gran importancia para el desarrollo de vectores plasmídicos para la terapia génica, lo cual incluye el establecimiento de diversas metodologías para la producción y el control de la calidad, de acuerdo con los estándares establecidos por las autoridades regulatorias para su administración en humanos. Otro aporte a destacar es la implementación de modelos animales robustos, útiles para la evaluación no solo de vectores de terapia génica, sino de otros fármacos con potencial para el tratamiento de las enfermedades vasculares isquémicas. Desde el punto de vista práctico, este trabajo constituye la primera experiencia de aplicación de la terapia génica en la práctica médica cubana.

La investigación presentada tiene también implicaciones desde el punto de vista social, dado que los pacientes a los cuales va dirigida la terapia en estudio son refractarios al tratamiento farmacológico, y no son candidatos a los procedimientos convencionales de revascularización. La posibilidad de contar con una estrategia terapéutica alternativa es de gran importancia para la supervivencia, la salud y la calidad de vida de estos pacientes.

Los resultados que conforman esta investigación forman parte de tres artículos publicados en revistas científicas arbitradas, se han presentado en diez congresos internacionales, han dado lugar a tres logros científicos del CIGB, y a dos ponencias premiadas en el Forum de Ciencia y Técnica (Autobibliografía).

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. EL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)**

#### **2.1.1. Identificación del VEGF**

El VEGF fue identificado como resultado del avance de dos líneas de investigación no relacionadas, que convergieron en el factor en cuestión. En 1983, Senger y colaboradores describieron la purificación parcial, a partir del medio de cultivo de una línea de células tumorales de curiel, de una proteína capaz de inducir filtración vascular en la piel, a la cual se le llamó factor de permeabilidad vascular (VPF) (Senger y cols., 1983). De manera independiente, Connolly y colaboradores reportaron el aislamiento y secuenciación del VPF humano a partir de células U937 (Connolly y cols., 1989).

Por otra parte, Ferrara y Henzel reportaron el aislamiento y la secuencia aminoacídica N-terminal de un mitógeno específico de las células endoteliales, a partir de medio condicionado por células foliculares pituitarias bovinas (Ferrara y Henzel, 1989). A este mitógeno se le denominó factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Los trabajos relativos a la clonación del ADNc del VEGF (Leung y cols., 1989) y del VPF (Keck y cols., 1989) se publicaron simultáneamente en el propio año 1989, y demostraron que el VEGF y el VPF eran una misma molécula.

El VEGF es una glicoproteína homodimérica de unión a heparina, de 34-46 kDa (Ferrara y Henzel, 1989). La estructura cristalina del VEGF muestra que la molécula forma un homodímero antiparalelo unido de forma covalente por dos puentes disulfuro entre los residuos Cys-51 y Cys-60 (Muller y cols., 1997).

El hallazgo de que el VEGF es un mitógeno potente, con acción paracrina, y específico para las células endoteliales vasculares, condujo a la hipótesis de que esta molécula podría jugar un papel relevante en la regulación de la angiogénesis fisiológica y patológica (Ferrara y Henzel, 1989; Leung y cols., 1989).

#### **2.1.2. La familia de genes del VEGF**

El VEGF (conocido también como VEGF-A) pertenece a una familia de genes que incluye otros 4 miembros de origen humano: factor de crecimiento placentario (PlGF) (Maglione y cols., 1991), VEGF-B (Olofsson y cols., 1996), VEGF-C (también llamado VEGF-2) (Joukov y cols., 1996), y VEGF-D (Achen y cols., 1998). Adicionalmente, se han descrito homólogos virales del VEGF, que en conjunto se conocen como VEGF-E (Ogawa y cols., 1998); y VEGFs derivados de veneno de serpiente, llamados VEGF-F (Yamazaki y cols., 2003). Las propiedades de los diferentes miembros de la familia del VEGF se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1. Propiedades de los miembros de la familia del VEGF.**

VEGF	Isoformas	Receptores	Actividades biológicas
VEGF-A	VEGF-A <sub>121</sub> VEGF-A <sub>165</sub> VEGF-A <sub>189</sub> VEGF-A <sub>206</sub>	VEGFR-1 VEGFR-2 VEGF-A <sub>165</sub> se une a NP-1 y -2	Angiogénesis, vasculogénesis, mitogénesis, homeostasia vascular, permeabilidad vascular, reclutamiento de células de la médula ósea
PlGF	PlGF <sub>131</sub> PlGF <sub>152</sub> PlGF <sub>203</sub>	VEGFR-1 PlGF <sub>152</sub> se une a NP-1 y -2	Angiogénesis, migración de monocitos, reclutamiento de células de la médula ósea, inducción de VEGF-A
VEGF-B	VEGF-B <sub>167</sub> VEGF-B <sub>186</sub>	VEGFR-1 NP-1	Angiogénesis, reclutamiento de células de la médula ósea
VEGF-C	No procesada Madura ( $\Delta N\Delta C$ )	VEGFR-2 VEGFR-3 NP-2 Procesamiento aumenta afinidad	Linfangiogénesis, angiogénesis
VEGF-D	No procesada Madura ( $\Delta N\Delta C$ )	VEGFR-2 VEGFR-3 Procesamiento aumenta afinidad	Linfangiogénesis, angiogénesis
VEGF-E	-	VEGFR-2 NP-1	Angiogénesis
VEGF-F	-	VEGFR-2	Angiogénesis, permeabilidad vascular

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; NP: neuropilina; PlGF: factor de crecimiento placentario.

En los transcritos de la familia del VEGF ocurre una eliminación de intrones diferencial, la cual da lugar a varias isoformas que, además de exhibir distintas tallas (número de aminoácidos), difieren entre sí con respecto a la solubilidad, la capacidad de unión a la heparina, y la afinidad por co-receptores que amplifican la transducción de señales (Ferrara, 2007).

Los VEGFs se unen a tres receptores tirosina-quinasa altamente relacionados: VEGFR-1 (Flt-1) (Shibuya y cols., 1990), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) (Terman y cols., 1991), y VEGFR-3 (Flt-4) (Pajusola y cols., 1992), según se muestra en la Figura 1. Los VEGFR-2 y -3 son los principales reguladores de los efectos de los VEGFs sobre los vasos sanguíneos y linfáticos, respectivamente (Yla-Herttuala y cols., 2007). Sin embargo, la biología del VEGFR-1 aún se comprende pobremente. Este receptor parece mediar acciones ligando-específicas. También existe como un receptor soluble (*decoy*), que actúa como regulador negativo de la angiogénesis. No obstante, la activación del VEGFR-1 por el PlGF y el VEGF-B estimula la angiogénesis y la permeabilidad vascular *in vivo* (Silvestre y cols., 2003; Roy y cols., 2005). El VEGFR-1 también media la quimiotaxia de los monocitos. Adicionalmente, los VEGFs interactúan con una familia de co-

receptores, las neuropilinas (NP) -1 y -2, que contribuyen a amplificar las señales intracelulares (Kurschat y cols., 2007). La afinidad a los heparan sulfatos y a los co-receptores NP modulan las actividades biológicas de los diferentes VEGFs (Tabla 1, Fig. 1).

En condiciones patológicas, como la isquemia aguda del músculo esquelético, la hipoxia produce un incremento en la expresión de VEGF-A a través de la regulación positiva del factor inducible por hipoxia (HIF) -1 $\alpha$  (Rissanen y cols., 2002; Tuomisto y cols., 2004). El VEGF-A es uno de los más potentes inductores de permeabilidad vascular, la cual ocurre minutos después de la exposición al factor en cuestión, probablemente como resultado de la producción eficiente y simultánea de óxido nítrico (NO) y prostaciclina (Neagoe y cols., 2005).

Las funciones del PlGF y el VEGF-B en la biología vascular no están totalmente esclarecidas. En estudios *in vitro* se ha comprobado que ambos son mitógenos débiles para las células endoteliales, y que no inducen permeabilidad vascular de manera significativa (Olofsson y cols., 1996; Murohara y cols., 1998). Como se explicó anteriormente, en experimentos *in vivo* se ha documentado que la exposición durante largo tiempo a PlGF o VEGF-B promueve la angiogénesis, la permeabilidad vascular, y podría potenciar el crecimiento vascular inducido por VEGF, probablemente a través de mecanismos indirectos que aun no se han dilucidado (Silvestre y cols., 2003; Roy y cols., 2005).

Los VEGF-C y -D se unen a los receptores VEGFR-2 y -3. Ambos se sintetizan como precursores que son proteolíticamente procesados por proteasas como la plasmina, a formas maduras ( $\Delta N\Delta C$ ) que presentan el dominio central de homología del VEGF, con mucha mayor afinidad por el VEGFR-2 (Joukov y cols., 1996; Achen y cols., 1998). En consecuencia, las formas no procesadas son fundamentalmente linfangiógenas, mientras que las formas maduras también son angiogénicas y promueven la permeabilidad vascular a través de mecanismos mediados por NO (Rissanen y cols., 2003b). Los VEGF-E y -F son ligandos relativamente específicos del VEGFR-2 y por lo tanto, tienen una considerable potencia angiogénica (Ogawa y cols., 1998; Yamazaki y cols., 2003).

Los VEGF-A y -C son esenciales para el desarrollo embrionario de la vasculatura sanguínea y linfática, respectivamente. Los estudios con ratones *knockout* han demostrado que la pérdida de un solo alelo del VEGF-A conduce a la letalidad del embrión debido a defectos en la vasculogénesis y la angiogénesis (Ferrara y cols., 1996). El ratón *knockout* para el gen del VEGF-C presenta también un fenotipo letal, pero en este caso debido a defectos en el desarrollo de los vasos



linfáticos (Karkkainen y cols., 2004). PlGF, VEGF-B y -D por su parte, parecen ser dispensables para el desarrollo vascular. Los ratones *knockout* para los genes del PlGF y el VEGF-B exhiben fenotipos casi normales, con defectos menores en el desarrollo cardiovascular (Malik y cols., 2006). En el caso del VEGF-D, el animal *knockout* presenta un fenotipo normal (Baldwin y cols., 2005).

En lo adelante, esta revisión bibliográfica estará enfocada hacia la biología y las aplicaciones preclínicas y clínicas del VEGF-A, al cual nos referiremos como VEGF.

### 2.1.3. Isoformas del VEGF

El gen del VEGF humano está organizado en 8 exones, separados por 7 intrones (Tischer y cols., 1991), y se localiza en el cromosoma 6p21.3 (Vincenti y cols., 1996). Como resultado de la eliminación de intrones alternativa, se generan 4 isoformas diferentes, compuestas por 121, 165, 189, y 206 aminoácidos, respectivamente (Tischer y cols., 1991). Adicionalmente, se han descrito otras isoformas menos frecuentes, tales como VEGF<sub>145</sub> (Poltorak y cols., 1997), VEGF<sub>183</sub> (Jingjing y cols., 1999), VEGF<sub>162</sub> (Lange y cols., 2003), y VEGF<sub>165b</sub> que, paradójicamente, ejerce un efecto inhibitorio en la mitogénesis inducida por VEGF (Bates y cols., 2002).

La capacidad de unión a heparina y el patrón de secreción difieren marcadamente entre las isoformas (Yla-Herttuala y cols., 2007). El VEGF<sub>121</sub> es un polipéptido débilmente ácido, que no se une a la heparina y se encuentra soluble en el medio condicionado de las células transfectadas. Las capacidades de unión a heparina de las restantes isoformas se incrementan progresivamente como resultado de un enriquecimiento sucesivo en residuos básicos. De este modo, el VEGF<sub>165</sub> es una glicoproteína básica con capacidad de unión a heparina que, aunque se secreta, permanece unida a la superficie celular y a la matriz extracelular en una proporción significativa. Los VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub> son polipéptidos altamente básicos, con gran afinidad por la heparina. Estas isoformas no se secretan al medio, sino que quedan secuestradas en la superficie celular y en la matriz extracelular por los proteoglicanos de heparan sulfato. Las isoformas unidas a la matriz extracelular pueden ser liberadas por heparina o heparinasa, que las desplaza de su unión a los proteoglicanos de heparan-sulfato; o por plasmina, que corta en el extremo C-terminal y genera un fragmento activo que comprende los primeros 110 aminoácidos N-terminales (Ferrara, 2007). Dado el importante papel de la activación del plasminógeno durante los procesos de angiogénesis fisiológicos y patológicos (Ebisch y cols., 2008), este mecanismo proteolítico puede ser particularmente importante en la regulación local de la actividad y la biodisponibilidad del VEGF.

### 2.1.4. Actividades del VEGF

#### 2.1.4.1. Angiogénesis, mitogénesis, y supervivencia de las células endoteliales

Una de las actividades mejor documentadas del VEGF es su capacidad para promover el crecimiento *in vitro* de células endoteliales vasculares derivadas de arterias, venas, y vasos linfáticos (Ferrara, 2004). El VEGF estimula la angiogénesis en modelos tridimensionales *in vitro*, e induce a las células endoteliales microvasculares a formar estructuras semejantes a capilares en matrices de colágeno (Pepper y cols.,

1994). También induce la ramificación a partir de anillos aórticos de rata embebidos en un gel de colágeno (Nicosia y cols., 1994).

Por otra parte, el VEGF también promueve una pronunciada respuesta angiogénica en variados modelos *in vivo*, tales como: la membrana corioalantoidea de pollo (Leung y cols., 1989), la córnea de conejo (Phillips y cols., 1994), el implante de matrigel en ratones (Mesri y cols., 1995), el iris de primates (Tolentino y cols., 1996), entre otros. Además, se ha documentado que el VEGF es capaz de inducir linfangiogénesis en ratones (Nagy y cols., 2002).

El VEGF es también un factor de supervivencia para las células endoteliales, tanto *in vitro* como *in vivo* (Benjamin y cols., 1999). En experimentos *in vitro*, el VEGF previene la apoptosis endotelial inducida por privación del suero. Esta actividad está mediada por la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) / Akt (Gerber y cols., 1998b; Fujio y Walsh, 1999). El VEGF también induce la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, A1 (Gerber y cols., 1998a), XIAP (Tran y cols., 1999), y survivina (Tran y cols., 2002) en las células endoteliales.

En estudios *in vivo*, la inhibición del VEGF resulta en grandes cambios apoptóticos en la vasculatura de los ratones neonatos, pero no en la de los adultos (Gerber y cols., 1999). Además, se ha demostrado que en los tumores, las células endoteliales de los vasos de nueva formación presentan una marcada dependencia del VEGF, a diferencia de aquellas de los vasos ya establecidos (Benjamin y cols., 1999). Se ha sugerido que el recubrimiento de los vasos por los pericitos es uno de los eventos claves para la pérdida de esta dependencia del VEGF.

#### **2.1.4.2. Homeostasia vascular**

En los individuos adultos, el VEGF se expresa en prácticamente todos los tejidos vascularizados, especialmente en los vasos sanguíneos fenestrados y sinusoidales presentes en los órganos endocrinos y secretores. También se expresa en los grandes vasos sanguíneos, en el músculo esquelético y en el miocardio, lo cual sugiere que se requieren bajos niveles fisiológicos de VEGF para el mantenimiento de la homeostasia vascular general (Maharaj y cols., 2006). Por otra parte, la regulación positiva del VEGF es importante en los procesos fisiológicos de angiogénesis activa, tales como: el desarrollo del cuerpo lúteo, la angiogénesis inducida por el ejercicio en el músculo esquelético, y la regeneración tisular después de un daño o isquemia (Rissanen y cols., 2002; Ferrara, 2007).

Estos hallazgos sugieren que los efectos del VEGF son marcadamente dependientes de su concentración local. Las funciones relacionadas con la protección vascular, tales como: la homeostasia vascular, la supervivencia de las células endoteliales, y la producción de NO y prostaciclina; parecen requerir bajos niveles fisiológicos de VEGF, lo que resulta en vasodilatación, antitrombosis, y supresión de la proliferación de las células de músculo liso (Yla-Herttuala y cols., 2004). En contraste, los efectos angiogénico y vasculogénico requieren concentraciones mucho mayores del factor. En la isquemia y el daño vascular, la regulación positiva del VEGF restaura la perfusión y la integridad del endotelio.

#### **2.1.4.3. Efectos del VEGF sobre las células de la médula ósea y la hematopoyesis**

El primer reporte acerca de los efectos del VEGF sobre las células sanguíneas describía su habilidad para promover la quimiotaxia de los monocitos (Clauss y cols., 1990). Subsecuentemente, se reportó que el

VEGF es capaz de inducir la formación de colonias por células progenitoras de granulocitos-macrófagos (Broxmeyer y cols., 1995). Resulta interesante el hecho de que la administración de VEGF a ratones adultos inhibe el desarrollo de las células dendríticas (Gabrilovich y cols., 1998), lo cual conduce a la hipótesis de que el VEGF facilita el crecimiento de los tumores al permitir su escape del sistema inmune del hospedero. También se ha reportado que el VEGF incrementa la producción de células B y la generación de células mieloides inmaduras (Hattori y cols., 2001).

La tecnología del *knockout* condicional se ha utilizado para lograr la ablación génica selectiva del VEGF en células de la médula ósea y en células madre hematopoyéticas (CMHs) (Gerber y cols., 2002). Las CMHs y las células mononucleares de la médula ósea deficientes de VEGF no lograron recuperar las poblaciones celulares de hospederos irradiados con dosis letales, a pesar de haberse coadministrado un gran exceso de células de tipo salvaje. Estos estudios dilucidaron la existencia de un lazo autocrino, no bloqueado por inhibidores extracelulares como los anticuerpos, a través del cual el VEGF controla la supervivencia de las CMHs durante la repoblación hematopoyética (Gerber y cols., 2002).

#### **2.1.4.4. Permeabilidad vascular y efectos hemodinámicos**

La actividad estimuladora de la permeabilidad vascular del VEGF tiene importantes implicaciones con respecto al papel de esta molécula en la inflamación y en otras condiciones patológicas. Se ha demostrado que el VEGF induce la fenestración endotelial en algunos lechos vasculares y en cultivos de células endoteliales adrenales (Esser y cols., 1998), lo cual se corresponde con su función en la regulación de la permeabilidad vascular.

Varios estudios han apuntado hacia el crítico papel que juega el NO en la permeabilidad vascular y en la angiogénesis inducidas por VEGF (Parenti y cols., 1998; Fukumura y cols., 2001). En uno de estos trabajos se estimó la contribución relativa a estos procesos de las isoformas de la NO sintasa (NOS), la NOS inducible (iNOS) y la NOS endotelial (eNOS). Los resultados indicaron que eNOS juega un papel predominante en la angiogénesis y la permeabilidad vascular en respuesta al VEGF exógeno. No obstante, esta vía parece ser dispensable para la angiogénesis del desarrollo embrionario (Fukumura y cols., 2001). Anteriormente se reportó que los miembros de la familia Src están diferencialmente implicados en la mediación de la permeabilidad y la angiogénesis dependientes de VEGF (Eliceiri y cols., 1999). Este estudio evidenció que la actividad estimuladora de la permeabilidad depende de Src ó Yes. Los ratones carentes de Src y Yes mostraron una respuesta angiogénica normal al VEGF, sin defectos manifiestos en la vasculatura, lo cual sugiere que la permeabilidad vascular incrementada no es un requerimiento para la angiogénesis dependiente de VEGF.

El VEGF induce vasodilatación *in vitro* de manera dosis-dependiente, y produce taquicardia transitoria, hipotensión, y una disminución en el gasto cardiaco cuando se inyecta por vía intravenosa en ratas despiertas (Yang y cols., 1996). Tales efectos parecen estar causados por una disminución en el retorno venoso mediado por el NO derivado de las células endoteliales. De hecho, la hipotensión fue un efecto colateral que limitó la dosis en ensayos clínicos de administración sistémica de VEGF recombinante (Henry y cols., 2003). Por el contrario, la administración de anticuerpos monoclonales anti-VEGF a pacientes con cáncer resultó en la elevación de la presión arterial (Yang y cols., 2003). Estos hallazgos indican que la señalización del VEGF cumple una función tónica homeostática en la regulación de la presión arterial, probablemente mediada por la eNOS.

### **2.1.5. Regulación de la expresión del gen del VEGF**

#### **2.1.5.1. Tensión de oxígeno**

La tensión de oxígeno juega un papel clave en la regulación de la expresión de numerosos genes (Safran y Kaelin, Jr., 2003). La expresión del ARNm del VEGF se induce por exposición a baja  $PO_2$  en una variedad de condiciones fisiopatológicas (Semenza, 2003). Estudios anteriores han indicado que existen semejanzas entre los mecanismos de regulación hipóxica del VEGF y de la eritropoyetina (Epo) (Goldberg y Schneider, 1994). Ambos genes presentan secuencias homólogas que les permiten ser inducidos por hipoxia. En el promotor del gen del VEGF humano se ha identificado una secuencia de 28 pb, que media la transcripción inducida por hipoxia (Liu y cols., 1995). Esta secuencia tiene un alto grado de homología y características de unión similares a las del sitio de unión de Epo a HIF-1 (Madan y Curtin, 1993). HIF-1 es un mediador clave de las respuestas hipóxicas. Es una proteína heterodimérica, básica, formada por dos subunidades, HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$  (Wang y Semenza, 1995). En respuesta a la hipoxia, HIF-1 se une a elementos potenciadores específicos, lo cual resulta en un incremento de la transcripción génica (Semenza, 2002). Por otra parte, se descubrió que el producto del gen supresor de tumores von Hippel-Lindau (VHL) desempeña una función crítica en las respuestas hipóxicas dependientes de HIF-1 (Mole y cols., 2001). Investigaciones anteriores han demostrado que una de las funciones de la proteína VHL es formar parte de un complejo ubiquitina ligasa, que actúa en la degradación proteosómica de las subunidades de HIF (Jaakkola y cols., 2001; Ivan y cols., 2001). El oxígeno promueve la hidroxilación de HIF en un residuo de prolina, lo cual es un requerimiento para la asociación de HIF con VHL. Estos estudios indican que VHL participa en la regulación negativa del VEGF y de otros genes inducibles por hipoxia. Otros trabajos han aportado evidencias de que la vía PI3K/Akt está implicada en la regulación de las respuestas mediadas por HIF de manera independiente con respecto a la hipoxia (Zundel y cols., 2000; Tang y Lasky, 2003).

#### **2.1.5.2. Factores de crecimiento, hormonas y oncogenes**

Numerosos factores de crecimiento son capaces de regular positivamente la expresión de VEGF, por ejemplo: factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) -BB, PlGF, factor de crecimiento transformante (TGF) - $\alpha$ , y - $\beta$ , factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF) -1, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de necrosis tumoral (TNF) - $\alpha$ , y factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) (Ferrara, 2007). Lo anterior sugiere que la liberación paracrina o autocrina de estos factores coopera con la hipoxia local en la regulación de la liberación de VEGF a nivel del microambiente. Algunas citocinas inflamatorias tales como interleucina (IL) -1 $\alpha$  e IL-6, inducen la expresión de VEGF en varios tipos celulares, lo cual concuerda con la hipótesis de que el VEGF puede ser el mediador de la angiogénesis/permeabilidad en enfermedades inflamatorias (Ferrara, 2004).

Las hormonas también son importantes reguladores de la expresión génica del VEGF. Se ha demostrado que la TSH induce la expresión de VEGF en varias líneas celulares de carcinoma de tiroides (Soh y cols., 1996). También se ha reportado que la ACTH es capaz de inducir la expresión de VEGF en cultivos de células de la corteza adrenal fetal humana (Shifren y cols., 1998). Varios estudios han documentado que las gonadotropinas son potentes inductoras de la transcripción del VEGF en el ovario (Ferrara y cols., 1998) y en cultivos de células de Leydig (Schwarzenbach y cols., 2004). Los esteroides sexuales constituyen estímulos importantes para la regulación del VEGF en tejidos sensibles a hormonas (Mueller y cols., 2000;

Stewart y cols., 2001). En otros experimentos se ha demostrado que las progestinas inducen la transcripción génica del VEGF en células de carcinoma endometrial (Mueller y cols., 2003). Los eventos de transformación maligna también resultan en la inducción de la expresión génica del VEGF. Las mutaciones oncogénicas o la amplificación de *ras* conducen a la regulación positiva del VEGF (Okada y cols., 1998; Shi y Ferrara, 1999). Se ha demostrado que la señalización a través del receptor EP3 de prostaglandina E(2) cumple una función clave en la regulación positiva del VEGF en células estromales (Amano y cols., 2003), de lo que se deduce que también pudiera tener un papel significativo en la angiogénesis tumoral.

### 2.1.6. Receptores del VEGF

La transducción de señales del VEGF en el endotelio vascular está mediada por dos receptores tirosina-quinasa: VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (KDR/Flk-1). Ambos presentan 7 dominios tipo inmunoglobulina (Ig) extracelulares, una región transmembrana, y una secuencia consenso tirosina-quinasa interrumpida por un dominio de inserción a quinasas (Shibuya, 2007). Además, algunas isoformas del VEGF interactúan con los co-receptores NP-1 y -2 (Kurschat y cols., 2007).

#### 2.1.6.1. VEGFR-1 (Flt-1)

El Flt-1 (*fms-like tyrosine kinase*) fue el primer receptor tirosina-quinasa en identificarse como VEGFR (De Vries y cols., 1992). La función exacta de esta molécula aún es objeto de debate, ya que exhibe diferentes propiedades de señalización en dependencia del estadio de desarrollo y del tipo celular estudiado. La expresión del VEGFR-1 está regulada positivamente por la hipoxia a través de un mecanismo dependiente de HIF-1 (Gerber y cols., 1997). Como se introdujo anteriormente, el VEGFR-1 no se une solo a VEGF-A, sino también a PlGF (Park y cols., 1994) y a VEGF-B (Olofsson y cols., 1998). Existe además una forma soluble del VEGFR-1 (sFlt-1) que actúa como inhibidor de la actividad del VEGF (Kendall y Thomas, 1993). El sitio de unión para VEGF (y también para PlGF) se localizó en el segundo dominio tipo Ig (Davis-Smyth y cols., 1998). La unión VEGF-VEGFR-1 tiene una constante de disociación (Kd) de 25 pM (Shibuya, 2007). El VEGFR-1 muestra una débil autofosforilación de tirosina en respuesta al VEGF (Waltenberger y cols., 1994). Sobre esta base se propuso inicialmente que el VEGFR-1 podía no ser un transductor de señales mitogénicas, sino más bien un receptor *decoy*, capaz de regular negativamente la actividad del VEGF al secuestrar y reducir la disponibilidad del factor en cuestión para el VEGFR-2 (Park y cols., 1994). Se ha planteado que la activación del VEGFR-1 resulta en la inhibición de la proliferación de células endoteliales dependiente de VEGFR-2, y que esta vía inhibitoria es dependiente de PI3K (Zeng y cols., 2001). Sin embargo, otros estudios han indicado que el VEGFR-1 es capaz de interactuar con varias proteínas transductoras de señales, y generar una señal mitogénica (Landgren y cols., 1998; Maru y cols., 1998). Los estudios de apagamiento genético (*gene-targeting*) han demostrado el papel esencial de esta molécula durante la embriogénesis. Los ratones Flt-1<sup>-/-</sup> mueren *in utero* entre los 8,5 y 9,5 días (Fong y cols., 1999). Las células endoteliales se desarrollan, pero no logran organizarse en canales vasculares debido a una excesiva proliferación de angioblastos. Lo anterior indica que, al menos durante el desarrollo temprano, el VEGFR-1 es un regulador negativo de la acción del VEGF. Otros estudios indican que el VEGFR-1 pudiera ser un regulador positivo bajo condiciones patológicas como el cáncer, donde sus ligandos específicos son altamente expresados (Hiratsuka y cols., 2001). Estos hallazgos sugieren que el

VEGFR-1 tiene una función dual en la angiogénesis, de modo que actúa positiva o negativamente en diferentes circunstancias.

Por otra parte, se ha documentado que la activación del VEGFR-1 resulta en la liberación paracrina de HGF, IL-6, y otras moléculas hepatotróficas por las células endoteliales sinusoidales del hígado (LeCouter y cols., 2003). Estos resultados indican que, independientemente de la regulación de la angiogénesis, una función clave de la señalización a través del VEGFR-1 es la liberación paracrina de factores de crecimiento específicos del lecho vascular.

#### **2.1.6.2. VEGFR-2 (KDR, humano; Flk-1, ratón)**

El VEGFR-2 se une al VEGF con una Kd de 75-250 pM (Millauer y cols., 1993). El papel clave que desempeña este receptor en la angiogénesis y la hematopoyesis embrionarias se evidencia en estudios con ratones deficientes de VEGFR-2, que carecen de vasculogénesis y presentan fallo en el desarrollo de vasos sanguíneos organizados, lo cual resulta en la muerte *in utero* entre los 8,5 y 9,5 días (Shalaby y cols., 1995). Existe consenso con respecto a que el VEGFR-2 es el principal mediador de los efectos del VEGF, tanto mitogénicos, como angiogénicos y de estimulación de la permeabilidad vascular.

El sitio de unión para VEGF se localizó en el segundo y tercer dominios tipo Ig (Fuh y cols., 1998). En células intactas, el VEGFR-2 experimenta dimerización y una marcada fosforilación de tirosina dependiente de ligando, lo cual resulta en una señal mitogénica, quimiotáctica y de supervivencia (Shibuya, 2007). Se ha demostrado que la proliferación de células endoteliales dependiente de VEGF requiere la autofosforilación del residuo Y-1175 (Takahashi y cols., 2001).

Además, se ha demostrado que el VEGF induce la fosforilación de varias proteínas transductoras de señales, tales como las fosfolipasas  $C\gamma$ , PI3K, proteína activadora de la GTPasa Ras (Guo y cols., 1995), proteínas de la familia Src (Eliceiri y cols., 1999), entre otras. Se ha reportado que la activación del VEGFR-2 por VEGF resulta en la activación de varias integrinas a través de un mecanismo dependiente de PI3K/Akt (Byzova y cols., 2000), y en la inducción del crecimiento de las células endoteliales a través de la vía Raf-Mek-Erk (Wu y cols., 2000).

Los mutantes de VEGF que se unen selectivamente al VEGFR-2 exhiben actividades mitogénica, quimioatrayente, y estimuladora de la permeabilidad sobre las células endoteliales, mientras que los mutantes específicos para el VEGFR-1 carecen de las tres actividades (Gille y cols., 2001). En este sentido resulta interesante que el VEGF-E (de origen viral) y el VEGF-F (derivado de veneno de serpiente), que muestran similares efectos mitogénico y de permeabilidad, se unen al VEGFR-2 con la consecuente activación del receptor, pero no son capaces de unirse al VEGFR-1 (Wise y cols., 1999; Yamazaki y cols., 2003).

#### **2.1.6.3. Neuropilina (NP) -1 y NP-2**

En estudios iniciales se observó que ciertos tumores y células endoteliales expresan sitios de unión a VEGF<sub>165</sub> diferentes de los VEGFRs en afinidad y masa molecular (Soker y cols., 1996). El VEGF<sub>121</sub> no es capaz de unirse a estos sitios. Posteriormente se identificó dicho receptor como NP-1, una molécula de unión a la familia colapsina/semaforina (Soker y cols., 1998).

Cuando se co-expresó con el VEGFR-2 en células, NP-1 estimuló la unión de VEGF<sub>165</sub> al VEGFR-2 y la quimiotaxia mediada por VEGF<sub>165</sub> (Soker y cols., 1998). NP-1 parece presentar el VEGF<sub>165</sub> al VEGFR-2 de manera que incrementa la efectividad de la transducción de señales. NP-1 es capaz de unirse

directamente al VEGFR-1 (Fuh y cols., 2000), lo cual sugiere que uno de los mecanismos por los cuales VEGFR-1 funciona como regulador negativo de la actividad del VEGF es mediante la competencia por la unión a NP-1. La unión a NP-1 contribuye a explicar la mayor potencia mitogénica observada para el VEGF<sub>165</sub> en comparación con el VEGF<sub>121</sub>. Hasta el momento no existen evidencias claras de señalización a través de NP-1 ó4 de NP-2, otro co-receptor relacionado, como resultado de la unión de VEGF (Kurschat y cols., 2007).

El papel de NP-1 en el desarrollo del sistema vascular se ha demostrado en estudios de apagamiento genético, que han documentado la letalidad embrionaria en ratones deficientes de NP-1 (Kawasaki y cols., 1999). Por otra parte, en experimentos en pez cebra se ha demostrado que NP-1 es requerido para el desarrollo vascular y media la angiogénesis dependiente de VEGF (Lee y cols., 2002). Otros estudios han relacionado a NP-2 con el desarrollo de los vasos linfáticos (Yuan y cols., 2002).

## **2.2. FISIOPATOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES VASCULARES ISQUÉMICAS**

Durante las pasadas décadas, la comprensión de la fisiopatología de las enfermedades vasculares isquémicas giraba en torno a la estenosis arterial. El riesgo de sufrir eventos isquémicos se asociaba al grado de estrechamiento de las arterias; y la aterosclerosis se consideraba como una enfermedad de acumulación de colesterol. Esta visión tradicional ha experimentado una marcada evolución. Actualmente se reconoce que durante gran parte de su existencia, la lesión aterosclerótica crece hacia fuera en lugar de hacia dentro de la arteria (Libby y Theroux, 2005). En consecuencia, puede existir una carga sustancial de aterosclerosis sin producir estenosis. Estudios de ultrasonido intravascular han confirmado que la estenosis representa la “punta del *iceberg*” de la aterosclerosis (Schoenhagen y cols., 2000; Tuzcu y cols., 2001). Una vez que las lesiones han progresado hasta el punto de producir estenosis, ya se ha producido una abundante aterosclerosis de la íntima, la cual se distribuye de manera amplia y difusa. El reconocimiento de la ubicuidad de las lesiones ateroscleróticas tiene importantes implicaciones para la comprensión de padecimientos como la enfermedad vascular periférica y la cardiopatía isquémica.

### **2.2.1. Formación de la lesión aterosclerótica**

La aterogénesis constituye una compleja interacción de factores tales como: las células de la pared arterial, la sangre, y los mensajes moleculares que ellos intercambian. La inflamación juega un papel fundamental en todas las etapas de la aterogénesis (Libby, 2002), y también participa en las complicaciones locales, miocárdicas y sistémicas de la aterosclerosis.

Cuando el endotelio vascular se expone a ciertos productos bacterianos o a factores de riesgo tan diversos como dislipidemia, hormonas vasoconstrictoras implicadas en la hipertensión, los productos de glicoxidación asociados con la hiperglicemia, o citocinas proinflamatorias derivadas de un exceso de tejido adiposo, dichas células aumentan la expresión de moléculas de adhesión, que promueven la unión de los leucocitos de la sangre a la superficie interna de la pared arterial (Libby y Theroux, 2005). Una vez residentes en la íntima arterial, los leucocitos (fundamentalmente fagocitos mononucleares y linfocitos T) intercambian mensajes con las células endoteliales y las células de músculo liso de la pared arterial en cuestión. Dichos mensajes dependen de mediadores de la inflamación y la inmunidad, por ejemplo, prostanoïdes, leucotrienos, histamina, citocinas, y componentes del complemento.

Como consecuencia del proceso inflamatorio en el ateroma temprano, las células de músculo liso migran de la túnica media hacia la íntima. Estas células proliferan y elaboran una matriz extracelular compleja.

Junto con las células endoteliales y los monocitos, secretan metaloproteinasas de la matriz (MMPs) en respuesta a señales oxidativas, hemodinámicas, inflamatorias, y autoinmunes. Las MMPs, en equilibrio con sus inhibidores tisulares endógenos, modulan numerosas funciones de las células vasculares tales como: la activación, proliferación, migración, y muerte celular; la formación de nuevos vasos, la remodelación geométrica, cicatrización, o destrucción de la matriz extracelular de las arterias y del miocardio (Libby y Theroux, 2005). Algunos constituyentes de la matriz extracelular, por ejemplo, los proteoglicanos, se unen a lipoproteínas de manera que prolongan su residencia en la íntima, y las hacen más susceptibles a la modificación oxidativa y la glicación (conjugación no enzimática con azúcares) (Williams y Tabas, 1998). Estos productos, que incluyen fosfolípidos oxidados y productos avanzados de glicación, mantienen y propagan la respuesta inflamatoria (Berliner y cols., 2001).

En la medida en que la lesión progresa, puede ocurrir calcificación a través de mecanismos similares a los de la formación de hueso (Demer, 2002). En las lesiones ateroscleróticas establecidas, además de la proliferación, ocurre comúnmente la muerte celular, incluyendo la apoptosis (Geng y Libby, 2002). La muerte de macrófagos cargados de lípidos puede conducir a la deposición extracelular de factor tisular (Bogdanov y cols., 2003). Los lípidos extracelulares que se acumulan en la íntima llegan a formar el clásico núcleo necrótico, rico en lípidos, de la placa aterosclerótica.

### 2.2.2. Papel del VEGF en la aterosclerosis

La contribución del VEGF a la aterogénesis ha centrado una gran atención durante los últimos años, pero aún no se ha dilucidado. La expresión progresiva de VEGF en células endoteliales activadas, macrófagos y células de músculo liso diferenciadas en lesiones ateroscleróticas y en la restenosis *in-stent* con neovascularización sugiere que el VEGF pudiera jugar un papel en la aterogénesis y en la inestabilidad de la placa a través de mecanismos proinflamatorios y angiogénicos (Inoue y cols., 1998; Brasen y cols., 2001). Esta hipótesis está sustentada por experimentos que utilizan ratones doble *knockout* ApoE/ApoB100 y conejos, ambos alimentados con dieta rica en colesterol (Celletti y cols., 2001; Khurana y cols., 2004).

Sin embargo, se han obtenido múltiples evidencias que se oponen a dicha hipótesis. En primer lugar, la transferencia génica de VEGF mediada por adenovirus, así como la administración de VEGF recombinante, no alteró el área de la placa ni el influjo de macrófagos en ratones doble *knockout* LDLR/ApoB48 (Leppanen y cols., 2005). En segundo lugar, la transferencia génica periadventicia e intra-arterial de VEGF inhibió el crecimiento de la neointima en estudios animales (Laitinen y cols., 1997). En tercer lugar, en los ensayos clínicos de aplicación del VEGF, ya sea como proteína o transferencia génica, no se han obtenido evidencias de aterogénesis incrementada (Makinen y cols., 2002; Henry y cols., 2003; Hedman y cols., 2003; Rajagopalan y cols., 2003; Kastrup y cols., 2005). De hecho, en un estudio epidemiológico reciente se encontró que el polimorfismo del VEGF que causa una mayor expresión del factor está asociado con un menor riesgo de enfermedad arterial coronaria (Howell y cols., 2005).

El VEGF no parece intervenir en la iniciación de la aterogénesis. El incremento progresivo en la expresión del VEGF durante la aterogénesis es probablemente secundaria a la hipoxia y a la inflamación en las lesiones en crecimiento. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que la expresión de altos niveles de VEGF durante un tiempo prolongado en lesiones ateroscleróticas avanzadas pueda contribuir a la neovascularización y a la vulnerabilidad de la placa, incluso a pesar de que en el momento actual no existan evidencias directas de esta cascada. En contraste, la producción de VEGF de manera transitoria y



sistémica, a través de la terapia con proteína recombinante o de la transferencia génica adenoviral, no parece ser suficiente para promover la progresión de la aterosclerosis en ratones o humanos.

### 2.2.3. Angiogénesis terapéutica

Una proporción significativa de los pacientes con enfermedades vasculares isquémicas permanecen refractarios a las terapias farmacológicas y no son candidatos adecuados para las intervenciones de revascularización percutáneas o quirúrgicas. Esta situación ha conducido al desarrollo de terapias para promover la neovascularización, una estrategia conocida como angiogénesis terapéutica. Este novedoso enfoque consiste en el empleo de factores de crecimiento angiogénicos para estimular el desarrollo de vasos sanguíneos colaterales que formen puentes arteriales alrededor de las arterias ocluidas.

La angiogénesis terapéutica implica la estimulación de la vasculogénesis, la angiogénesis, la arteriogénesis, y la linfangiogénesis (Khurana y Simons, 2007). La vasculogénesis es la formación *de novo* de nuevos vasos sanguíneos. La angiogénesis consiste en la ramificación, formación de puentes y/o alargamiento de los capilares a partir de los preexistentes. La angiogénesis ocurre en respuesta a estímulos como la hipoxia, la isquemia, el estiramiento mecánico, y la inflamación, y está mediada por la proliferación y migración de células endoteliales preexistentes. La arteriogénesis, por su parte, es el alargamiento y crecimiento *in situ* de vasos colaterales a partir de las anastomosis arteriolares preexistentes. Por último, la linfangiogénesis consiste en la generación de nuevos vasos linfáticos a partir de los preexistentes.

Entre los factores de crecimiento angiogénicos más utilizados en los estudios de angiogénesis terapéutica se encuentran el VEGF y el FGF. El VEGF se probó en un estudio clínico fase II denominado VIVA (*Vascular Endothelial Growth Factor in Ischaemia for Vascular Angiogenesis*), donde un total de 178 pacientes con cardiopatía isquémica fueron aleatorizados para recibir placebo, una dosis baja, o una dosis alta de VEGF<sub>165</sub> recombinante (proteína) por vía intracoronaria e intravenosa (Henry y cols., 2003). No se detectaron diferencias significativas entre los grupos para la variable principal, que fue el tiempo de tolerancia al ejercicio a los 60 días. Sin embargo, a los 120 días del tratamiento, la dosis alta de VEGF<sub>165</sub> resultó en una mejoría significativa de la clasificación funcional con respecto al placebo. El FGF-2 recombinante también se ha aplicado en ensayos clínicos similares, tanto en pacientes con enfermedad vascular periférica (Lederman y cols., 2002), como con cardiopatía isquémica (Simons y cols., 2002).

### 2.3. TERAPIA GÉNICA

La terapia génica consiste en un conjunto de estrategias para el tratamiento de enfermedades humanas, las cuales se basan en la transferencia de material genético a un individuo. La terapia génica puede estar dirigida a las células somáticas o germinales. En el caso de la terapia génica somática, el genoma del receptor se modifica, pero los cambios no se heredan; mientras que en la terapia génica de línea germinal, los cambios introducidos se transmiten a la descendencia (Mammen y cols., 2007). Las investigaciones desarrolladas hasta el momento se han realizado en células somáticas. La terapia génica de línea germinal no se está estudiando de forma activa, al menos no en animales superiores ni en humanos, debido a sus implicaciones éticas.

Existen dos estrategias para la transferencia del material genético al receptor: *in vivo* y *ex vivo* (Selkirk, 2004). La estrategia *in vivo* implica la transferencia directa del gen, mediante un vector apropiado, a las células del tejido diana. En tal sentido se requiere que dichas células sean fácilmente accesibles para la

administración del vector, y que este último sea capaz de transfectar y expresar el gen terapéutico de manera específica en las células diana, a niveles efectivos y durante un tiempo prolongado. La estrategia *ex vivo* por su parte, consiste en la transferencia del gen terapéutico a células previamente extraídas del receptor y cultivadas *in vitro*, seguida por el trasplante de estas células modificadas al tejido diana. De este modo, las células modificadas y trasplantadas actúan en la síntesis y liberación de la proteína terapéutica en el ambiente local.

El campo de aplicaciones de la terapia génica se amplía constantemente, y abarca tanto enfermedades genéticas, como adquiridas. Dentro de las enfermedades genéticas, las de tipo 1 o monogénicas han constituido objetivos importantes para la terapia génica correctiva. Se trata de desórdenes causados por un solo gen defectuoso, por ejemplo, la fibrosis quística, la sicklemlia, y la distrofia muscular de Duchenne (Selkirk, 2004). Las enfermedades genéticas de tipo 2 o poligénicas están determinadas por varios genes y dependen además de factores ambientales y del estilo de vida. En este caso se incluyen el cáncer y la diabetes mellitas tipo II, en cuyo tratamiento también se ha utilizado la terapia génica. Entre las enfermedades adquiridas en las cuales se ha aplicado esta estrategia se encuentran: las enfermedades infecciosas, la artritis reumatoide y las enfermedades vasculares isquémicas.

### **2.3.1. Vectores de terapia génica**

La selección de un vector adecuado para las diversas aplicaciones de la terapia génica es uno de los mayores retos que enfrentan los investigadores en este campo (Baker, 2004). El vector ideal debe cumplir numerosos requerimientos tales como: ser seguro para el receptor, o sea, no citotóxico y no inmunogénico; tener una alta eficiencia de transfección, no tener restricción en la talla del inserto, poseer un tropismo adecuado para tipos de célula específicos. Además, debe ser capaz de transducir células mitóticas y post-mitóticas, y permitir la regulación de la expresión del transgen. Por último, su producción debe ser fácil y reproducible a altas concentraciones, el producto final debe ser estable y seguro para el ambiente. Los vectores de terapia génica se subdividen en dos categorías fundamentales: vectores virales y no virales.

#### **2.3.1.1. Vectores virales**

Los virus recombinantes constituyen un sistema eficiente para la transferencia de genes a los tejidos humanos. Los vectores virales más comúnmente empleados incluyen retrovirus, adenovirus, y virus adeno-asociados (AAV). Sin embargo, existen muchos riesgos asociados con la utilización de vectores virales para la terapia génica en humanos, tales como la inducción de respuesta inmune del hospedero, la mutagénesis por inserción aleatoria, la presencia de vectores de tipo salvaje en la preparación administrada, y el tropismo tisular inadecuado.

Los retrovirus estuvieron entre los primeros vectores utilizados para la transferencia de genes a la vasculatura (Nabel y cols., 1990). Estos virus poseen un genoma compuesto por ARN, el cual se integra en el genoma del hospedero. Aunque esta inserción resulta en una expresión génica prolongada en el tejido, también abre la posibilidad de que ocurra una mutagénesis por inserción aleatoria y otras formas de carcinogénesis (Hacein-Bey-Abina y cols., 2003; Woods y cols., 2006). Por otra parte, los vectores retrovirales son pobremente captados y transducidos en las células post-mitóticas, que son las más comunes en los tejidos vasculares. Otras limitaciones de estos vectores se refieren a la talla del inserto ( $\leq$

8 kb) y a los bajos títulos con que se obtienen ( $\sim 10^6$  ufc/mL). A pesar de esto, los vectores retrovirales se encuentran entre los más ampliamente utilizados (21%) en los ensayos clínicos de terapia génica (Wiley.co.uk, 2009).

Los adenovirus poseen un genoma compuesto por ADN de doble cadena que, a diferencia de los retrovirus, no se integra en el genoma del hospedero y por lo tanto, no presentan riesgo de mutagénesis por inserción. Los vectores adenovirales se han empleado en el 24% de los ensayos clínicos de terapia génica hasta el momento actual (Wiley.co.uk, 2009), lo cual los hace los vectores más ampliamente utilizados. Entre sus bondades se cuentan los altos títulos con que se obtienen y su amplio tropismo tisular (Varenne y cols., 1998). Se ha demostrado que los adenovirus son particularmente efectivos en los tipos celulares vasculares, y que pueden transducir células post-mitóticas de manera eficiente. Sin embargo, estos vectores pueden resultar en la inducción de una respuesta inmune capaz de reducir su propia efectividad. El advenimiento de los llamados “*gutless*” o vectores adenovirales dependientes de un virus auxiliador, los cuales carecen de los elementos genéticos virales, podrían mejorar la transferencia génica a largo plazo mediante la reducción de la respuesta inmune del hospedero. Esta nueva generación de adenovirus también tiene una mayor capacidad con respecto a la talla del inserto, y podría permitir la transferencia múltiple de genes en un único vector (Jozkowicz y Dulak, 2005).

Los AVVs son parvovirus no patogénicos que para replicarse en la naturaleza, requieren que las células sean co-infectadas por un virus auxiliador, como el adenovirus. Han emergido recientemente como vectores de terapia génica, y hasta el momento se han utilizado en el 4% de los ensayos clínicos (Wiley.co.uk, 2009). Los AAVs tienen un genoma pequeño (< 5 kb) compuesto por ADN de simple cadena. En la construcción de los AAVs recombinantes se remueven todos los genes virales, de modo que tienen menor potencial inmunogénico que los adenovirus y por tanto, son más seguros para el hospedero. Pueden infectar células post-mitóticas y logran una expresión génica prolongada y estable. En la naturaleza son capaces de integrarse en el genoma del hospedero, pero esta propiedad está ausente en los AAVs recombinantes, de modo que se elimina el riesgo de mutagénesis por inserción (Young, Jr. y cols., 2000). Por otra parte, presentan limitaciones con respecto a la talla del inserto ( $\leq 4$  kb) y a la complejidad del proceso productivo.

### **2.3.1.2. Vectores no virales**

El ADN plasmídico desnudo se ha utilizado en numerosas investigaciones para transferir genes a tejidos diana. De hecho, estos vectores se han aplicado en el 18% de los ensayos clínicos de terapia génica hasta el momento actual (Wiley.co.uk, 2009). Su purificación se logra mediante una metodología simple y menos costosa que la de otros vectores (Lyon y cols., 2008). Son capaces de transfectar una amplia variedad de células y tienen baja inmunogenicidad, lo cual favorece su seguridad (Muller y cols., 2007). La principal limitación de los vectores de ADN desnudo es su baja eficiencia de transfección. No obstante, el empleo de transgenes de proteínas secretadas, como el VEGF, permite alcanzar efectos biológicamente significativos (Gaffney y cols., 2007).

Los liposomas catiónicos se han utilizado para incrementar la eficiencia de transfección ya que los lípidos positivamente cargados interactúan con el ADN, que tiene carga negativa, para formar complejos estables ADN-lípido capaces de atravesar la membrana celular, de modo que se favorece la captación del transgen por las células diana (Hedman y cols., 2003; Deiner y cols., 2006). Los liposomas pueden empaquetar moléculas de ADN de alta talla, pueden estar dirigidos hacia tipos celulares específicos, y no inducen

reacciones inmunológicas. Sin embargo, solo se logra una expresión transitoria de los transgenes. Por otra parte, los complejos ADN-liposoma pueden ser inhibidos por factores del suero, y pueden resultar tóxicos para ciertos tipos de células.

También se ha propuesto la utilización de varios polímeros para mejorar la transferencia no viral de genes. A nivel sistémico es posible incrementar la transferencia mediante derivados de polilisina, mientras que a nivel de órgano es recomendable el empleo de hidrogeles (Putnam, 2006). Las propiedades biofísicas de estos compuestos pueden favorecer la estabilidad, la concentración, e incluso la captación del ADN por las células diana. La electroporación es un método físico de transferencia de genes, que resulta útil en diversos órganos tales como el músculo esquelético y el hígado. Este procedimiento puede asegurar la captación de los transgenes en la vasculatura después de una transferencia adventicia o luminal (Dean, 2003).

**Vector plasmídico pAEC- $\Delta$ 2:** La familia de vectores pAEC se generó en el CIGB con el objetivo de clonar genes de antígenos, con vistas a la inmunización con ADN (Herrera y cols., 2000). El vector pAEC- $\Delta$ 2 contiene el promotor/potenciador de citomegalovirus (CMV), un sitio múltiple de clonación, las señales de procesamiento y poliadenilación del virus de simio (SV) 40, el origen de replicación *ColE1*, de *Escherichia coli*, y un gen de resistencia a kanamicina. Estos elementos conforman dos bloques funcionales bien definidos: una unidad de transcripción en células de mamíferos, y una unidad de replicación/selección en bacteria.

El pAEC- $\Delta$ 2 se ha empleado como vector para la expresión de varios antígenos: el polipéptido multiepitópico TAB9, que codifica para seis regiones V3 procedentes de diferentes aislamientos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) -1 (Herrera y cols., 2000); los antígenos de superficie y de la nucleocápsida del virus de la Hepatitis B (Musacchio y cols., 2001). Los plasmidios recombinantes se utilizaron para inmunizar ratones BALB/c. En todos los casos, los animales desarrollaron respuestas humorales específicas contra el antígeno correspondiente.

A pesar de haberse diseñado para la inmunización con ADN, este vector presenta características que lo hacen apropiado para la transferencia de genes terapéuticos: Carece de secuencias irrelevantes con respecto al objetivo de la transferencia génica. Tampoco presenta secuencias de homología con el genoma humano, con lo que se reduce la probabilidad de ocurrencia de recombinación homóloga. A diferencia de otros vectores para la inmunización con ADN, el pAEC- $\Delta$ 2 no está enriquecido en secuencias inmunoestimuladoras o motivos CpG, que son capaces de potenciar la respuesta inmune contra la proteína codificada (Rodríguez, 2004). Este efecto, aunque adecuado desde el punto de vista de la inmunización con ADN, resulta inconveniente para la terapia génica, ya que puede conducir a la neutralización del factor expresado y por ende, a la reducción del efecto terapéutico.

### 2.3.2. Vías y procedimientos de transferencia génica

Los principales órganos diana para la terapia génica cardiovascular, además de las arterias y venas, son el miocardio, los músculos esqueléticos de los miembros inferiores, y el hígado. La transferencia génica cardiovascular se puede realizar por vía intravascular, por inyección directa intraórgano, y mediante procedimientos *ex vivo*. Para la transferencia génica intravascular se ha desarrollado una gran variedad de sistemas de cateterismo, tales como el catéter de infusión-perfusión y el catéter de aguja, con el objetivo de mejorar la penetración de los vectores a través de la íntima (Varenne y cols., 1998; Laitinen y cols., 1998). A pesar de estos avances, la transferencia génica efectiva a una lesión avanzada, con una neointima gruesa, calcificación, depósitos de colesterol, e infiltrados de células inflamatorias, continúa siendo un reto.

El *stent* liberador de genes (Walter y cols., 2004; Sharif y cols., 2006) es una novedosa estrategia de transferencia génica intravascular que resulta muy oportuna, teniendo en cuenta la amplia utilización de los *stents* liberadores de drogas. La transferencia génica en implantes vasculares se puede realizar mediante la incubación de una solución de transferencia génica dentro del implante *in situ* o por inmersión *ex vivo* (Gruchala y cols., 2004; Turunen y cols., 2006). Ambos métodos resultan en una alta eficiencia de transferencia génica porque en ausencia de flujo sanguíneo, de los componentes del sistema inmune innato, y de anticuerpos neutralizantes, se favorece la transducción del segmento diana por los vectores.

La administración de vectores de terapia génica mediante inyecciones intramusculares o intramiocárdicas es el modo más eficiente de producir una expresión génica efectiva en un tejido diana. Varios estudios han mostrado que la vía de administración intraarterial es inefectiva a menos que se module la permeabilidad del endotelio, o que se utilice un alto gradiente de presión (Wright y cols., 2001; Rissanen y cols., 2003a). Además, a diferencia de la inyección directa en los tejidos, después de la administración de vectores en la circulación se podría esperar una biodistribución más amplia y una expresión génica ectópica en tejidos distantes. La transferencia génica pericárdica no resulta en una transducción transmural efectiva del miocardio sin tratamiento concomitante con proteasas (Lazarous y cols., 1999). En los músculos esqueléticos de las extremidades inferiores, las inyecciones intramusculares son teóricamente fáciles de realizar. Sin embargo, dado que la mayoría de los efectos de los factores de crecimiento angiogénicos son locales (Rissanen y cols., 2003a; Rissanen y cols., 2003b), las inyecciones deben ser cuidadosamente dirigidas hacia dentro de los músculos diana. La mejor forma de lograr esto es mediante monitorización por ultrasonido. Una inyección mal dirigida entre dos músculos resultará en angiogénesis fundamentalmente en las fascias musculares, y no en el músculo propiamente.

Las inyecciones intramiocárdicas constituyen un reto mucho mayor que las inyecciones en músculo esquelético. Realizar una toracotomía solamente para la transferencia génica intramiocárdica puede ser demasiado riesgoso, a no ser que se requiera para otros propósitos terapéuticos como una cirugía de puente coronario (*bypass*). Varios estudios han demostrado la seguridad y factibilidad del sistema NOGA (Biosense Webster, Markham, Notario, Canada), que permite realizar inyecciones intramiocárdicas por vía transendocárdica mediante un catéter percutáneo, con monitorización a través de un sistema de localización electromecánica (Rutanen y cols., 2004; Kastrup y cols., 2005).

En otros estudios se ha utilizado la inyección intramuscular de células transducidas *ex vivo* para expresar factores terapéuticos de manera constitutiva, pero esta estrategia parece estar obstaculizada por la

insuficiente distribución de las células dentro del tejido diana, lo cual puede conducir a efectos colaterales severos (Lee y cols., 2000b). En el hígado, la transferencia génica por vía intravascular parece ser efectiva y de alta eficiencia (Kankkonen y cols., 2004).

### **2.3.3. Aplicaciones de la terapia génica angiogénica**

La terapia génica angiogénica representa la aplicación de la terapia génica a la estrategia de la angiogénesis terapéutica, o sea, la transferencia de genes de factores de crecimiento angiogénicos para estimular el desarrollo de vasos sanguíneos colaterales en tejidos isquémicos. Este enfoque se ha utilizado fundamentalmente en la enfermedad vascular periférica y en la cardiopatía isquémica, tanto en estudios preclínicos como en ensayos clínicos.

#### **2.3.3.1. Estudios preclínicos en modelos animales de isquemia de miembros inferiores**

Los modelos animales más utilizados para el estudio de la isquemia de miembros inferiores son los practicados en ratón (Hiraoka y cols., 2003), rata (Chang y cols., 2003) o conejo (Wright, 2002). La transferencia génica a los músculos de la extremidad isquémica se ha realizado por medio de vectores virales y no virales. La vía de administración por excelencia ha sido la inyección intramuscular directa. Estos modelos se han utilizado para estudiar la transferencia génica de varios factores de crecimiento, tales como FGF, HGF, IGF, y en particular del VEGF. Se ha experimentado con las diferentes isoformas del VEGF, e incluso se demostró la equivalencia biológica entre las isoformas de 121, 165, y 189 aminoácidos para la angiogénesis terapéutica (Takeshita y cols., 1996b; Cherng y cols., 2000). Por otra parte, el VEGF se ha ensayado en combinación con otros factores, por ejemplo: FGF (Kondoh y cols., 2004), y angiopoyetina (Ang) -1 (Niagara y cols., 2004).

Estos ensayos han aportado numerosas y variadas evidencias del efecto terapéutico de la transferencia génica del VEGF. Por ejemplo: se han obtenido evidencias angiográficas de neovascularización en las extremidades isquémicas (Tsurumi y cols., 1996; Yamauchi y cols., 2003; Chang y cols., 2003). Los análisis histológicos e inmunohistoquímicos han revelado un consecuente incremento en la densidad de capilares y arteriolas (Shimpo y cols., 2002; Hiraoka y cols., 2003; Leong-Poi y cols., 2007). Los estudios hemodinámicos han arrojado aumentos significativos del flujo sanguíneo, el índice de presiones y la reserva vasomotora (Wright, 2002; Yamauchi y cols., 2003; Leong-Poi y cols., 2007). Los ensayos de transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) han permitido detectar el ARNm específico del transgen en el tejido diana (Yamauchi y cols., 2003; Chang y cols., 2003; Leong-Poi y cols., 2007) y, en correspondencia, se han observado incrementos en la concentración de VEGF en el tejido transfectado (Shimpo y cols., 2002; Hiraoka y cols., 2003).

Otros investigadores han empleado modelos en especies más robustas, como el perro y el cerdo. El modelo canino de isquemia de miembros inferiores se utilizó para evaluar los efectos angiogénicos del FGF y del VEGF recombinantes (proteína), administrados por vía intravenosa (Rakue y cols., 1998). Los perros tratados con los factores angiogénicos exhibieron un marcado incremento de la circulación colateral a los 7 días del tratamiento, el cual se mantuvo hasta los 28 días. La densidad de capilares aumentó significativamente con respecto al grupo control (solución salina). El flujo sanguíneo del grupo que recibió VEGF resultó significativamente superior al del grupo control. El modelo porcino por su parte,

permitió demostrar que el estrés de cizallamiento constituye el estímulo inicial y de mayor potencia en la arteriogénesis (Pipp y cols., 2004).

### **2.3.3.2. Estudios clínicos en pacientes con enfermedad vascular periférica**

En los primeros estudios clínicos de angiogénesis terapéutica con el gen del VEGF, se incluyeron pacientes que no eran candidatos a las técnicas de revascularización quirúrgicas ni endovasculares, o que habían fracasado con otras opciones de tratamiento, y estaban en alto riesgo de sufrir amputación. La terapia génica con VEGF se probó inicialmente mediante vectores de ADN plasmídico desnudo, y resultó en la eliminación del dolor de reposo, el incremento de la vasculatura colateral y del índice de presiones tobillo/brazo (Baumgartner y cols., 1998; Isner y cols., 1998).

Por otra parte, se demostró que las inyecciones intramusculares de un adenovirus portador del gen del VEGF<sub>121</sub> fueron bien toleradas y mejoraron la función endotelial y la reserva de flujo a los 30 días (Rajagopalan y cols., 2001). Al año de seguimiento se observaron tendencias positivas en el índice de presiones tobillo/brazo en reposo y en el tiempo máximo de marcha (Rajagopalan y cols., 2002; Mohler, III y cols., 2003).

En un pequeño estudio no controlado, donde se empleó un plasmidio desnudo portador del gen del VEGF<sub>165</sub>, se evidenció una mejoría en el dolor de reposo superior al 80% (Shyu y cols., 2003). En otro estudio fase I no controlado se utilizó la misma estrategia de transferencia génica en pacientes con enfermedad vascular periférica severa (Kim y cols., 2004). Una vez más, las inyecciones fueron bien toleradas y los resultados mostraron un incremento en la formación de vasos colaterales alrededor de los sitios de inyección. Se observó una marcada mejoría en el dolor de reposo y las úlceras isquémicas en un número significativo de pacientes.

La Tabla 2 resume los estudios clínicos fase II/III de transferencia génica del VEGF a pacientes con enfermedad vascular periférica. El primero de estos trabajos fue un estudio fase II controlado y aleatorizado, de transferencia génica de VEGF<sub>165</sub> mediante vectores adenovirales o plasmidio conjugado con liposomas, por vía intraarterial a través de un catéter percutáneo. Los pacientes tratados con adenovirus mostraron mejoría en la vascularidad a los 3 meses, por angiografía, pero no hubo diferencias entre los grupos tratados y placebo en términos de resultados clínicos (Makinen y cols., 2002).

El estudio RAVE (*Regional Angiogenesis with Vascular Endothelial Growth Factor in Peripheral Arterial Disease*) fue un ensayo clínico fase II, aleatorizado, controlado por placebo, donde se probó la seguridad y eficacia de un adenovirus portador del gen del VEGF<sub>121</sub>, administrado por vía intramuscular en 105 pacientes con enfermedad vascular periférica (Rajagopalan y cols., 2003). En este estudio no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en el tiempo máximo de marcha a los 3 meses, ni en las variables secundarias (índice de presiones tobillo/brazo y calidad de vida). No se observaron eventos adversos graves, aunque el edema transitorio estuvo asociado con la transferencia génica intramuscular de AdVEGF<sub>121</sub>.

**Tabla 2. Estudios clínicos fase II/III aleatorizados y controlados, de terapia génica con VEGF en la enfermedad vascular periférica.**

Estudio clínico (referencia)	Agente terapéutico	Administración	Tratamiento control	n	Variable principal	Resultados
------------------------------	--------------------	----------------	---------------------	---	--------------------	------------

VEGF en EVP (Makinen y cols., 2002)	VEGF <sub>165</sub> / adenovirus o plasmidio-liposomas	Intraarterial en el sitio de angioplastia	Ringer's lactato	54	Aumento de la vascularidad a los 3 meses (angiografía)	Positivos
RAVE (Rajagopalan y cols., 2003)	VEGF <sub>121</sub> / adenovirus	Intramuscular	Vehículo	105	Tiempo máximo de marcha a las 12 semanas	Negativos
Groningen (Kusumanto y cols., 2006)	VEGF <sub>165</sub> / plasmidio desnudo	Intramuscular	Solución salina	54	Reducción de la tasa de amputación a los 100 días	Negativos (variables secundarias positivas)

EVP: enfermedad vascular periférica; RAVE: *Regional Angiogenesis with Vascular Endothelial Growth Factor in Peripheral Arterial Disease*.

En el estudio Groningen, un ensayo a doble ciegas, controlado por placebo, de aplicación de un plasmidio desnudo portador del gen del VEGF en pacientes diabéticos con isquemia crítica de miembros inferiores, no se encontraron diferencias para la variable principal (tasa de amputación a los 100 días), pero sí se alcanzaron mejorías significativas en las variables secundarias (índice de presiones tobillo/brazo y condición clínica) (Kusumanto y cols., 2006).

### **2.3.3.3. Estudios preclínicos en modelos animales de isquemia del miocardio**

Las investigaciones de terapia génica relacionadas con la cardiopatía isquémica utilizan en su etapa preclínica modelos animales mayores como el cerdo (Hughes y cols., 2003). Los factores de crecimiento más utilizados en los trabajos de terapia génica para el tratamiento de la cardiopatía isquémica son el VEGF (Laguens y cols., 2002; Zhang y cols., 2002; Nikol y cols., 2002) y el FGF (Grines y cols., 2003; Gao y cols., 2004; Horvath y cols., 2005). También se han realizado estudios con otras moléculas implicadas en los mecanismos de la angiogénesis, como el HIF-1 $\alpha$  (Shyu y cols., 2002; Heinl-Green y cols., 2005). Los efectos beneficiosos de la transferencia génica del VEGF se han demostrado en varios estudios en modelos animales de isquemia del miocardio. La angiografía coronaria ha evidenciado la revascularización de las áreas isquémicas a través de los vasos colaterales de nueva formación (Tio y cols., 1999; Lee y cols., 2000a; Nikol y cols., 2002). La tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT) ha documentado una reducción en los defectos de perfusión miocárdica hasta valores cercanos a la normalidad (Lee y cols., 2000a; Crottogini y cols., 2003; Patila y cols., 2006). Los estudios histológicos e inmunohistoquímicos han mostrado incrementos en la densidad de capilares (Nikol y cols., 2002), así como en el índice mitótico (marcador de la entrada en mitosis) de los cardiomiocitos (Laguens y cols., 2002). Se ha reportado una elevación significativa del flujo sanguíneo en respuesta a la vasodilatación farmacológica (Tio y cols., 1999). En otro estudio se utilizó la ecocardiografía para documentar mejorías significativas en la función ventricular (Bull y cols., 2003). El transcripto específico del gen transferido se ha detectado en el tejido diana mediante RT-PCR (Laguens y cols., 2002; Nikol y cols., 2002), y se han registrado aumentos significativos de los niveles de VEGF en la sangre y en el miocardio (Tio y cols., 1999; Lee y cols., 2000a).

Se ha demostrado que la transferencia génica del VEGF mediante vectores virales no solo estimula la angiogénesis, sino también la "arterialización capilar" (Rissanen y cols., 2005; Parsons-Wingerter y cols., 2006). En este proceso, los capilares preexistentes se dilatan. El flujo sanguíneo incrementado induce el



fortalecimiento de la pared capilar mediante la hipertrofia de las células de músculo liso, lo que conduce a la formación de vasos semejantes a arteriolas (Rissanen y cols., 2005). Las células derivadas de la médula ósea no se incorporan a los vasos en crecimiento, pero pueden contribuir a la angiogénesis a través de mecanismos paracrinos (Zentilin y cols., 2006). Este proceso, caracterizado por una activa proliferación tanto de las células endoteliales como de las células de músculo liso, y por la remodelación de la red capilar, no se ha documentado en el caso de la transferencia génica del VEGF mediante vectores plasmídicos (Hao y cols., 2007).

#### **2.3.3.4. Estudios clínicos en pacientes con cardiopatía isquémica**

Los estudios clínicos iniciales de transferencia génica del VEGF fueron pequeños ensayos fase I, donde se probó un plasmidio desnudo portador del gen del VEGF<sub>165</sub>, administrado por vía intramiocárdica a través de una toracotomía, en pacientes sin opción de tratamiento. En estos ensayos se reportaron incrementos significativos en la capacidad de ejercicio, mejoría en la función contráctil, la perfusión miocárdica en reposo, y el desarrollo de vasos colaterales (Losordo y cols., 1998; Vale y cols., 2000; Sylven y cols., 2001; Sarkar y cols., 2001). Un estudio fase I similar se llevó a cabo con un vector adenoviral que expresaba el VEGF<sub>121</sub>, el cual se administró por inyección intramiocárdica directa en combinación con la cirugía de puente coronario (*bypass*). Los resultados fueron prometedores con respecto a la prueba de ejercicio y la clase funcional a los 6 meses (Rosengart y cols., 1999a; Rosengart y cols., 1999b).

En un ensayo clínico piloto de transferencia génica del VEGF-C mediante un plasmidio desnudo inyectado percutáneamente en el miocardio isquémico de 6 pacientes, mediante el sistema NOGA, se reportó mejoría en el estado clínico, alivio de la angina, y reducción del área isquémica (Vale y cols., 2001). Sucesivamente, se realizó un estudio no controlado de un plasmidio portador del gen del VEGF-C, administrado mediante inyecciones intramiocárdicas a través de una toracotomía a 30 pacientes sin opción terapéutica. Al año de seguimiento se observaron mejorías en la prueba de ejercicio y en la clase funcional, así como una disminución en el uso de medicamentos en comparación con el estado basal (Fortuin y cols., 2003). La máxima mejoría se alcanzó a los 6 meses. A los 2 de años de seguimiento el 88,5% de los pacientes tratados tenía clase funcional I o II, y solo el 11% tenía clase funcional III (Reilly y cols., 2005). A pesar de los resultados alentadores, el bajo número de pacientes y la ausencia de grupo control ha limitado la utilidad de los datos generados en estos estudios.

El primer estudio aleatorizado, controlado por placebo, investigó la seguridad y factibilidad de la transferencia génica del VEGF murino por medio de un vector plasmídico conjugado con liposomas, en pacientes con cardiopatía isquémica sometidos a angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) (Laitinen y cols., 2000). La transferencia génica resultó segura y bien tolerada.

En la Tabla 3 se recogen los estudios clínicos fase II/III de transferencia génica del VEGF a pacientes con cardiopatía isquémica. El estudio KAT (*Kuopio Angiogenesis Trial*) estuvo dirigido a investigar la eficacia de la terapia génica con VEGF<sub>165</sub> en la tasa de restenosis y la perfusión miocárdica, al administrarse en el curso de la ACTP (Hedman y cols., 2003). Un total de 103 pacientes fueron aleatorizados para recibir el transgen por medio de un vector adenoviral (AdVEGF<sub>165</sub>), o de un plasmidio conjugado con liposomas, o placebo en el sitio de la angioplastia antes de la colocación del *stent*. No se detectaron diferencias en la tasa de restenosis (6%) entre los grupos de tratamiento, pero la perfusión miocárdica mostró una mejoría significativa en el grupo tratado con AdVEGF<sub>165</sub>, a los 6 meses.

Otro estudio fase I/II examinó la administración de 3 dosis diferentes de un plasmidio desnudo portador del gen del VEGF-C, o placebo, mediante el sistema NOGA de inyección intramiocárdica percutánea, en 19 pacientes (Losordo y cols., 2002). Como resultado, se reportó una reducción significativa en la clase funcional de los pacientes tratados a las 12 semanas.

**Tabla 3. Estudios clínicos fase II/III aleatorizados y controlados, de terapia génica con VEGF en la cardiopatía isquémica.**

Estudio clínico (referencia)	Agente terapéutico	Administración	Tratamiento control	n	Variable principal	Resultados
KAT (Hedman y cols., 2003)	VEGF <sub>165</sub> / adenovirus o plasmidio-liposomas	Intracoronaria en el sitio de angioplastia	Ringer lactato	103	Mejoría en la perfusión miocárdica a los 6 meses	Positivos (solo grupo adenovirus)
(Losordo y cols., 2002)	VEGF-C / plasmidio desnudo	Intramiocárdica percutánea (sistema NOGA)	Solución salina	19	Clasificación funcional de la angina a las 12 semanas	Positivos
Euroinject One (Kastrup y cols., 2005)	VEGF <sub>165</sub> / plasmidio desnudo	Intramiocárdica percutánea (sistema NOGA)	Plasmidio placebo	74	Mejoría en la perfusión miocárdica a los 3 meses	Negativos
REVASC (Stewart y cols., 2006)	VEGF <sub>121</sub> / adenovirus	Intramiocárdica / mini-toracotomía	Máximo tratamiento médico	67	Tiempo hasta infradesnivel de 1 mm en S-T durante prueba de ejercicio a las 26 semanas	Positivos
GENASIS (Corautus Genetics, 2006) No publicado	VEGF-C / plasmidio desnudo	Intramiocárdica percutánea (catéter Stiletto)	Vehículo	295 (404*)	Prueba de tolerancia al ejercicio a los 3 meses	Negativos (ensayo detenido)
NORTHERN (Stewart y cols., 2009)	VEGF <sub>165</sub> / plasmidio desnudo	Intramiocárdica percutánea (sistema NOGA)	Solución salina	93 (120*)	Cambio en la perfusión miocárdica a los 3 ó 6 meses	Negativos

KAT: *Kuopio Angiogenesis Trial*; REVASC: *Randomized Evaluation of Vascular Endothelial Growth Factor Angiogenesis in Severe Coronary Artery Disease*; GENASIS: *Genetic Angiogenic Stimulation Investigational Study*; NORTHERN: *NOGA Angiogenesis Revascularization Therapy: Evaluation by Radionuclide Imaging*. \* n prevista en el protocolo clínico.

En el estudio Euroinject One, un total de 80 pacientes se distribuyeron aleatoriamente para recibir inyecciones intramiocárdicas de un plasmidio desnudo portador del gen del VEGF<sub>165</sub> o un plasmidio placebo, mediante el sistema NOGA (Kastrup y cols., 2005). Se administró una dosis total de 0,5 mg, y las inyecciones se dirigieron a un área del miocardio con un defecto de perfusión detectado mediante SPECT. A los 3 meses de seguimiento no se detectaron diferencias significativas entre los grupos con respecto a la clasificación funcional ni al tamaño del defecto en reposo o durante el ejercicio. Sin embargo, la motilidad parietal local, estimada por el sistema NOGA y por ventriculografía, mostró mejoría en el grupo tratado con respecto al grupo placebo.

En el estudio REVASC (*Randomized Evaluation of Vascular Endothelial Growth Factor Angiogenesis in Severe Coronary Artery Disease*), 67 pacientes con cardiopatía isquémica y sin opción terapéutica fueron aleatorizados para continuar con el mejor tratamiento médico convencional o para recibir un vector adenoviral portador del gen del VEGF<sub>121</sub> ( $4 \times 10^{10}$  partículas) mediante inyección intramiocárdica directa a través de una toracotomía (Stewart y cols., 2006). El tiempo hasta alcanzar un infradesnivel de 1 mm en el segmento S-T durante la prueba de ejercicio mejoró significativamente a las 26 semanas, en los pacientes tratados con respecto a los controles. Las variables secundarias (clasificación funcional y tiempo de tolerancia al ejercicio) mejoraron a las 12 semanas. Sin embargo, en el análisis de estos resultados no se puede descartar la contribución de un efecto placebo significativo, debido a la toracotomía.

El estudio fase II GENASIS (*Genetic Angiogenic Stimulation Investigational Study*) se diseñó originalmente para incluir 404 pacientes con vistas a investigar la eficacia de la transferencia génica del VEGF-C por medio de un plasmidio desnudo, por vía intramiocárdica percutánea, mediante el catéter Stiletto (Boston Scientific Corporation, Natick, Massachusetts). Sin embargo, este ensayo fue prematuramente detenido, después de incluir 295 pacientes, debido a problemas relacionados con el catéter y a una alta probabilidad de falta de eficacia en la variable principal (Corautus Genetics, 2006).

Recientemente, se publicaron los resultados del estudio fase II/III NORTHERN (*NOGA Angiogenesis Revascularization Therapy: Evaluation by Radionuclide Imaging*), donde se probó la eficacia de la transferencia génica mediada por NOGA de 2 mg de un plasmidio desnudo portador del gen del VEGF<sub>165</sub>, en 93 pacientes sin opción de tratamiento (Stewart y cols., 2009). Este ensayo se diseñó con el propósito de superar las limitaciones del estudio Euroinject One (Kastrup y cols., 2005), en el cual se aplicó una dosis de solo 0,5 mg del vector. A pesar de la alta dosis administrada, no se encontraron diferencias entre los grupos tratado y placebo para la variable principal, que fue el cambio en la perfusión miocárdica a los 3 ó 6 meses; aunque en ambos grupos se observó una reducción significativa del área isquémica. También se observaron mejorías en ambos grupos con respecto al tiempo de ejercicio y a los síntomas anginosos a los 3 y 6 meses, sin diferencias entre grupos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. REACTIVOS QUÍMICOS

Los reactivos químicos utilizados en la preparación de medios de cultivo y soluciones se obtuvieron de las firmas Oxoid (Gran Bretaña), Merck (Alemania), Fluka (EE.UU.) y Sigma (EE.UU.). Los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) se obtuvieron de la firma Boehringer Mannheim (Alemania).

#### 3.2. MEDIOS DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS

Luria Bertani (LB): Triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L. El medio sólido contiene además 15 g/L de agar.

LBK: LB suplementado con 50 mg/L de Kanamicina (Sigma, EE.UU.).

DMEM (Sigma, EE.UU.): Suplementado con 584 mg/L de L-glutamina, 110 mg/L de piruvato de sodio y 5 mg/L de Gentamicina (Gibco, EE.UU.).

RPMI 1640 (Sigma, EE.UU.): Suplementado con 300 mg/L de L-glutamina, 110 mg/L de piruvato de sodio y 50 mg/L de Gentamicina (Gibco, EE.UU.).

MCDB 131 (Sigma, EE.UU.): Suplementado con 300 mg/L de L-glutamina, 110 mg/L de piruvato de sodio y 50 mg/L de Gentamicina (Gibco, EE.UU.).

Suero fetal bovino (SFB): Suministrado por la firma Hyclone (EE.UU.).

#### 3.3. ENZIMAS

La enzima *Taq* polimerasa fue suministrada por la firma Heber Biotec (Cuba). Las enzimas *Xba*I, *Bgl*II, *Klenow*, *Pvu*II, *Bam*HI y T4 ADN ligasa se obtuvieron de la firma New England Biolabs (EE.UU.). La Termo Sequenase fue suministrada por la firma Amersham Biosciences (EE.UU.). Todas las enzimas se utilizaron según las recomendaciones del fabricante correspondiente.

#### 3.4. PLASMIDIOS

hVEGF<sub>121</sub> (Weindel y cols., 1992): Plasmidio derivado del pBluescript KS, que porta el gen del VEGF<sub>121</sub>. Fue donado por el Instituto Max-Planck de Investigaciones Fisiológicas y Clínicas, de Alemania.

pLITMUS-29 (Promega, EE.UU.): Vector comercial, que posee un sitio múltiple de clonaje.

pAEC-Δ2 (Herrera y cols., 2000): Plasmidio derivado del vector pUC19, que contiene el promotor/potenciador de CMV, las señales de procesamiento y poliadenilación del SV40, el origen de replicación *ColE1* de *E. coli*, y el gen de resistencia a kanamicina (transposón 903). Su secuencia está depositada en la Base de Datos de Secuencia de la EMBL con el número AJ278714.

#### 3.5. OLIGONUCLEÓTIDOS

4920: 5'- GCTCTAGATGAACTTTCTGCTGTCTTGGGTGCATTGG -3' (la secuencia subrayada corresponde a un sitio de restricción *Xba*I).

4921: 5'- GAAGATCTTCACCGCCTCGGCTTGTCACAATTTTCTT -3' (la secuencia subrayada corresponde a un sitio de restricción *Bgl*II).

3295: 5'- AGTGAACCGTCAGATC -3'

Todos los oligonucleótidos se obtuvieron en el Departamento de Síntesis Química del CIGB mediante un equipo de síntesis automática de oligonucleótidos (Pharmacia, Suecia).

### 3.6. MICROORGANISMOS

Cepa DH10B de *Escherichia coli* K12 [F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu) 7697 galU galK rpsL nupG] (Durfee y cols., 2008).

### 3.7. CÉLULAS DE MAMÍFEROS

CHO-K1 (ATCC CCL-61, EE.UU.): Células de ovario de hámster chino.

HUVEC (PromoCell, Alemania): Células endoteliales humanas de vena umbilical.

HMEC (CDC, EE.UU.): Células endoteliales microvasculares humanas.

### 3.8. ANIMALES

Ratas (*Rattus norvegicus*) sublínea Sprague-Dawley: Fueron suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Se utilizaron animales de ambos sexos, con pesos de 150 a 200 g para las hembras, y entre 200 y 250 g para los machos.

Perros (*Canis familiaris*) raza Beagle: Fueron suministrados por CENPALAB. Se utilizaron animales de ambos sexos, con un peso de 11-13 kg.

Cerdos (*Sus scrofa*) raza Yorkshire: Fueron suministrados por el Instituto de Investigaciones Porcinas. Se utilizaron animales del sexo femenino, con un peso de 25-30 kg.

Estos animales se mantuvieron y manipularon de acuerdo con la “Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio” (Bayne, 1998). A su llegada al área experimental, pasaron por un período de adaptación de 7-15 días. Se ubicaron a razón de un animal por jaula, con condiciones normales de temperatura y humedad relativa, y con un ciclo natural de luz-oscuridad. Los animales recibieron la dieta adecuada (pienso suministrado por CENPALAB), según los requerimientos diarios de cada especie, y tuvieron acceso al agua las 24 horas.

### 3.9. CONSTRUCCIÓN GENÉTICA DEL VECTOR PVEGF<sub>121</sub>

La Figura 2 representa los pasos seguidos para la clonación del gen del VEGF<sub>121</sub> en el vector pAEC-Δ2. Brevemente, el gen del VEGF<sub>121</sub> humano, con su péptido señal de secreción correspondiente, se obtuvo como producto de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El fragmento de ADN obtenido se digirió con las endonucleasas *Xba*I y *Bgl*II, en sitios de restricción generados por los oligonucleótidos utilizados (4920 y 4921), y se insertó en el vector pLITMUS-29, previamente digerido con las mismas enzimas. A continuación, el fragmento correspondiente al gen del VEGF<sub>121</sub> se extrajo por digestión con *Xba*I-Klenow-*Bgl*II y se clonó en el vector de expresión pAEC-Δ2 (Herrera y cols., 2000), previamente digerido con *Pvu*II y *Bam*HI.

#### 3.9.1. Técnicas generales de Biología Molecular

La purificación de ADN plasmídico a pequeña escala, las digestiones de ADN con endonucleasas de restricción, las electroforesis de ADN en geles de agarosa, la recuperación y purificación de ADN de geles de agarosa de bajo punto de fusión, las reacciones de ligamiento de ADN, la preparación de células competentes, y la transformación de dichas células con ADN plasmídico, se realizaron de acuerdo a los

procedimientos previamente descritos (Sambrook y cols., 1989), y según las recomendaciones de los fabricantes de las diferentes enzimas utilizadas.

### **3.9.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

El plasmidio hVEGF<sub>121</sub> (Weindel y cols., 1992) se utilizó como ADN molde. Se emplearon los oligonucleótidos 4920 y 4921, que hibridan con las regiones 5' y 3', respectivamente, del gen VEGF<sub>121</sub>. Se utilizó la enzima *Taq* polimerasa. La reacción se desarrolló en un termociclador MiniCycler de la firma MJ Research (EE.UU.), según el siguiente programa:

1. Desnaturalización inicial: 94°C por 5 min
2. Desnaturalización: 94°C por 1 min
3. Hibridación: 55°C por 1 min
4. Extensión: 72°C por 1 min
5. Ir al paso 2 (29 veces)
6. Extensión final: 72°C por 5 min

### **3.9.3. Secuenciación de ADN**

La secuencia del gen del VEGF<sub>121</sub> se confirmó mediante secuenciación automática de ADN por el método de Sanger (Sanger y cols., 1977). Se utilizó un equipo ALFexpress II de la firma Amersham Biosciences (EE.UU.), y un juego de reactivos Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator, suministrado por la misma firma. Se empleó el oligonucleótido 3295, que hibrida con la región 3' del promotor/potenciador de CMV. Para el procesamiento de la información se empleó el programa ALFwin Sequence analyser 2.00.

## **3.10. PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO**

### **3.10.1. Purificación de ADN plasmídico a mediana escala**

Se utilizó el juego de reactivos EndoFree Plasmid Mega Kit (Qiagen, Alemania), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Brevemente: La cepa DH10B de *E. coli* K12, transformada con los clones recombinantes, se cultivó en un volumen de 500 mL de medio LBK. La biomasa resultante se sometió a lisis alcalina y subsiguiente neutralización. El lisado se filtró y se incubó en hielo con una solución tampón para la remoción de endotoxinas durante 30 min. A continuación, se realizó una cromatografía de intercambio aniónico. El ADN plasmídico, eluído a una alta concentración de sales, se concentró y desalinizó mediante precipitación con isopropanol. En el Anexo 1 se presenta un esquema del protocolo de purificación.

### **3.10.2. Purificación de ADN plasmídico a gran escala**

El ADN plasmídico con vistas a los estudios preclínicos y clínicos se purificó a partir de fermentaciones de 5 L de medio LBK de la cepa DH10B de *E. coli* K12 transformada con el clon recombinante seleccionado. El fermentador se inoculó a una  $DO_{620\text{ nm}}$  inicial de 0,3. La temperatura, el pH y la velocidad de agitación, se controlaron de forma automática. El cultivo se dejó crecer a 37°C, pH 7,0 y 500 rpm durante 5 horas. Transcurrido este tiempo se cambió la temperatura a 42°C y se dejó crecer durante una hora adicional. La purificación se realizó según el procedimiento descrito por Horn y colaboradores (Horn y cols., 1995). Brevemente, la biomasa resultante de la fermentación se sometió a ruptura celular mediante lisis alcalina. Después de neutralizar la mezcla, se realizó la diafiltración y concentración del material. A continuación se realizó una cromatografía de intercambio aniónico seguida por una cromatografía de tamiz molecular, para separar las diferentes conformaciones del ADN plasmídico. El diagrama de flujo del proceso de purificación se muestra en el Anexo 2.

El ADN plasmídico purificado y formulado en solución salina (NaCl 0,9%), se envasó en viales de crioconservación a razón de 1 mL/vial, a una concentración de 0,5 mg/mL; y se almacenó a -20°C. Un lote de purificación se definió como el material obtenido a partir de una fermentación de 5 L de la cepa DH10B de *E. coli* K12, transformada con el clon de interés. Las especificaciones de calidad definidas para los lotes de pVEGF<sub>121</sub>, así como los límites de aceptación establecidos para cada una de ellas, se relacionan en el Anexo 3.

### **3.11. MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS PREPARACIONES DE ADN PLASMÍDICO PURIFICADO A GRAN ESCALA**

#### **3.11.1. Determinación de la concentración de ADN plasmídico**

Las preparaciones de ADN plasmídico se diluyeron 1/50, 1/100 y 1/1000. Se midió la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro UV/visible, previamente calibrado contra un blanco de agua destilada estéril. Se analizaron tres réplicas por cada muestra. El cálculo de la concentración de ADN plasmídico se realizó a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de ADN} = \text{Abs}_{260\text{ nm}} \times \text{factor de dilución} \times 50 \mu\text{g/mL}$$

#### **3.11.2. Determinación del porcentaje de ADN plasmídico superenrollado**

La conformación superenrollada del ADN plasmídico se cuantificó mediante Densitometría. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0,8%, en la cual se aplicó 1 µg de cada muestra de ADN plasmídico. Se tomó una fotografía del gel con una cámara fotográfica digital Cyber-shot (Sony, Japón). Esta imagen se analizó mediante el programa 1D-Manager versión 2.0 para determinar el área bajo la curva correspondiente a cada banda electroforética, y el porcentaje que representa cada banda con respecto al total aplicado. Se analizaron tres réplicas por cada muestra.

#### **3.11.3. Determinación de la concentración de proteínas**

El contenido de proteínas presente en las preparaciones de ADN plasmídico se cuantificó mediante el método del ácido bicinonínico (BCA) (Walker, 1994). Se utilizó una curva patrón de albúmina de suero

bovino (BSA) entre 50 y 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En tubos de ensayo se añadió 0,1 mL de las muestras sin diluir, y de cada punto de la curva patrón. Como control negativo de la reacción se utilizó 0,1 mL de agua destilada. A continuación se añadieron 2 mL de una solución de bicinconinato de sodio 0,1%, sulfato de cobre II 0,08% y se incubó durante 30 min a 60°C en un baño termostatado. Seguidamente se midió la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro UV/visible. Cada punto experimental se analizó por duplicado. El cálculo de la concentración de proteínas se realizó a través de la ecuación de la recta ( $y=mx+n$ , donde  $y=\text{Abs}_{562\text{ nm}}$ ,  $m$ =pendiente,  $x$ =concentración, y  $n$ =intercepto) tomando como base los valores de la curva patrón.

### 3.12. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS CON ADN PLASMÍDICO

Se transfectaron células de la línea CHO-K1 (ATCC CCL-61) por el método de la polietilenimina (PEI) (Boussif y cols., 1995). Las células se sembraron 24 h antes de la transfección en una placa de 24 pocillos, en medio DMEM suplementado con 10% de SFB. Se sembró de modo que en el momento de la transfección las células estuvieran alrededor de un 70% de confluencia. Para cada transfección se utilizaron 2  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  de NaCl 150 mM. Se preparó una solución de PEI (Aldrich, EE.UU.) que contenía 1,5  $\mu\text{L}$  de PEI 10 mM /  $\mu\text{g}$  de ADN (5 equivalentes) en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  de NaCl 150 mM. Después de 5 min, ambas soluciones se mezclaron goteando la PEI sobre el ADN, con agitación vigorosa (vórtex). Se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Simultáneamente, se eliminó el medio de cultivo a las células, las cuales se lavaron con medio sin SFB. A continuación, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de medio sin SFB a las mezclas ADN-PEI, las cuales a su vez, fueron añadidas a las células. La placa se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min. Seguidamente, se incubó durante 1-2 h a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Cada pocillo se completó hasta un volumen de 1 mL con medio DMEM suplementado con 1% de SFB. Finalmente, se incubó durante 48 h a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ .

### 3.13. ELISA ANTI-VEGF

Se utilizó el juego de reactivos Quantikine (R&D Systems, EE.UU.), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Brevemente: Las muestras y los controles se añadieron a los pocillos previamente recubiertos con un anticuerpo monoclonal anti-VEGF. Se utilizó una curva patrón de VEGF<sub>165</sub> humano recombinante entre 15,6 y 2000  $\text{pg}/\text{mL}$ . Los sobrenadantes de cultivo de las células CHO-K1 transfectadas se diluyeron 1/5000. En el caso de las muestras de suero humano, se realizó una dilución 1/2. Cada punto experimental se ensayó por duplicado. La detección se realizó con un anticuerpo policlonal anti-VEGF conjugado con peroxidasa. Por último, se añadió el sustrato específico ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en presencia de un cromógeno y se desarrolló la reacción de color, que se midió a una absorbancia de 450 nm. La concentración de las muestras se calculó sobre la base de los valores de la curva patrón, mediante la ecuación de la recta ( $y=mx+n$ , donde  $y=\text{Abs}_{450\text{ nm}}$ ,  $m$ =pendiente,  $x$ =concentración, y  $n$ =intercepto). El valor obtenido se multiplicó por el factor de dilución para calcular la concentración real de la muestra.

### 3.14. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

#### 3.14.1. Ensayo de proliferación de células endoteliales

Se realizó un ensayo de proliferación de células endoteliales humanas de vena umbilical (HUVEC) (Morera y cols., 2008). Las HUVEC (PromoCell, Alemania) se cosecharon en medio RPMI 1640 suplementado con 2% de SFB y 10 U/mL de heparina (Sigma, EE.UU.). Se sembraron  $4 \times 10^3$  células, en un volumen de 100  $\mu\text{L}$ ,



en placas de cultivo de 96 pocillos (Costar, EE.UU.). Las placas se incubaron durante 16-20 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación se añadieron 100 µL/pocillo de los sobrenadantes colectados a las 48 h de cultivo de las células CHO-K1 transfectadas, diluidos 1/10. Como control positivo se utilizaron 10 ng/mL de VEGF<sub>121</sub> humano recombinante (Peprotech, EE.UU.). Como control de la proliferación celular independiente de VEGF, se empleó el medio sin SFB. Se realizaron tres réplicas por cada punto experimental. Las placas se incubaron durante 72 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Seguidamente, se eliminó el medio de cultivo, y las células adheridas a la placa se tiñeron con 100 µL de una solución de violeta cristal 0,5% en metanol 20% durante 10 min. La placa se lavó abundantemente con H<sub>2</sub>O destilada y se dejó secar. El colorante incorporado a las células se disolvió en 100 µL de metanol, y se realizó la lectura de la absorbancia a 562 nm en un lector de placas BioRad. El porcentaje de proliferación correspondiente a las muestras se calculó con respecto al control de medio sin SFB.

### 3.14.2. Ensayo de actividad angiogénica *in vitro*

Se utilizó un modelo de angiogénesis *in vitro* descrito anteriormente (Benelli y Albin, 1999). Se recubrieron placas Terasaki (Nunc, EE.UU.) con 2,5 µL/pocillo de la matriz Matrigel (Becton Dickinson, EE.UU.) diluida 1/2 en medio MCDB 131 frío, y se dejó gelificar durante 1-3 h a 37°C. Las células endoteliales microvasculares humanas (HMEC) (CDC, EE.UU.) se cosecharon en medio MCDB 131. Se añadieron aproximadamente 10<sup>3</sup> células en un volumen de 12,5 µL a cada pocillo de las placas recubiertas con Matrigel. A continuación, se añadieron 12,5 µL/pocillo de los sobrenadantes colectados a las 48 h de cultivo de las células CHO-K1 transfectadas, diluidos 1/400. Como control positivo se utilizaron 10 ng/mL de VEGF<sub>121</sub> humano recombinante (Peprotech, EE.UU.). Como control negativo se empleó el medio de cultivo sin SFB. Se realizaron tres réplicas por cada punto experimental. Las placas se incubaron durante 16-20 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, los pocillos se fotografiaron bajo el microscopio invertido, y se realizó el conteo de los nodos, que son las intersecciones de tres o más cordones celulares.

### 3.15. ANÁLISIS EXPLORATORIO DE LA TOXICIDAD EN RATAS SANAS

El estudio se realizó en las instalaciones del Bioterio del CIGB. Se utilizaron 140 ratas Sprague-Dawley de ambos sexos, aleatoriamente distribuidas entre siete grupos experimentales de n=20 (10 hembras y 10 machos). Se exploraron varios niveles de dosis del plasmidio pVEGF<sub>121</sub> en una única administración, por dos vías diferentes (Tabla 4).

Tabla 4. Diseño experimental del análisis exploratorio de la toxicidad en ratas sanas.

Grupo	Tratamiento	Vía de administración	Dosis	
			x DT	(µg/kg)
I	Placebo	i.m.	-	-
II	pVEGF <sub>121</sub>	i.m.	10xDT <sup>a</sup>	280
III	pVEGF <sub>121</sub>	i.m.	20xDT <sup>a</sup>	560
IV	pVEGF <sub>121</sub>	i.m.	30xDT <sup>a</sup>	840
V	Placebo	i.m.c.	-	-

VI	pVEGF <sub>121</sub>	i.m.c.	10xDT <sup>b</sup>	70
VII	pVEGF <sub>121</sub>	i.m.c.	20xDT <sup>b</sup>	140

i.m.: intramuscular; i.m.c.: intramúsculo cardiaco; DT: Dosis terapéutica.

<sup>a</sup> DT para administración i.m.: 28 µg/kg de peso corporal.

<sup>b</sup> DT para administración i.m.c.: 7 µg/kg de peso corporal.

Las dosis terapéuticas se calcularon sobre la base de las correspondientes al humano: 2 mg para la administración intramuscular y 0,5 mg para la vía intramiocárdica. Se utilizó un valor de 70 kg como peso promedio del humano adulto.

Se realizó la evaluación de los animales con respecto al peso corporal, el consumo de alimento y los síntomas clínicos. A las 48 horas de la administración se realizó un sacrificio intermedio de 10 animales por grupo (5 hembras y 5 machos) con el propósito de detectar reacciones agudas. Los animales restantes se sacrificaron a los 14 días. En todos los casos se realizó la necropsia para la observación macroscópica de los órganos internos, y se tomaron muestras para los análisis histopatológicos.

### 3.15.1. Administración de pVEGF<sub>121</sub>

El plasmidio pVEGF<sub>121</sub> se administró por dos vías: intramuscular e intramúsculo cardiaco. En ambos casos se utilizaron jeringuillas de 1 mL con agujas de 26 G. La administración intramuscular se realizó en el cuádriceps femoral de la extremidad posterior derecha. Las inyecciones se realizaron de forma lenta para evitar la pérdida de fluido del epimisio.

Previo a la administración intramúsculo cardiaco los animales se anestesiaron con Ketamina 100 mg/kg por vía intraperitoneal. Para la inyección del pVEGF<sub>121</sub>, la aguja se insertó entre la segunda y tercera costillas desde el abdomen al tórax. Al retraer el émbolo, la aparición de sangre en la jeringuilla indicó que la punta de la aguja estaba situada en la cavidad cardiaca. La aguja se retiró aproximadamente 2 mm para garantizar que la inoculación se realizara en la musculatura. La inyección se realizó muy lentamente para evitar la pérdida de fluido y el daño al corazón.

En ambos casos el placebo consistió en solución salina (NaCl 0,9%) estéril. En el caso de la administración intramuscular, se inyectó un volumen de 340 µL, igual al que recibió el grupo tratado con la dosis más alta de pVEGF<sub>121</sub>. El volumen administrado intramúsculo cardiaco fue de 100 µL.

### 3.15.2. Determinación del peso corporal y del consumo de alimento

El peso corporal de los animales se registró en los días 0 (antes de la administración de los tratamientos), 2, 7, y 14 del ensayo. El consumo de alimento se calculó diariamente como la diferencia entre la cantidad de alimento suministrada a cada animal (25 g) y la cantidad no ingerida. Adicionalmente, se calculó el promedio del consumo diario en los días 2-7 (Semana 1) y 8-14 (Semana 2) para determinar el consumo semanal de cada animal.

### 3.15.3. Observación de los animales

Los animales se observaron al menos una vez al día con el fin de registrar cualquier signo de toxicidad o variación en el comportamiento. Las observaciones incluyeron piel, pelo, ojos, orejas, almohadilla plantar, uñas, membranas mucosas y temperatura corporal. Se prestó atención a posibles alteraciones de los sistemas circulatorio y respiratorio, incluyendo bradicardia, taquicardia, vasodilatación, vasoconstricción y

disnea; así como a cambios en el sistema nervioso central y autónomo, la actividad somatomotora y el comportamiento. Se observó también el sitio de administración para evaluar la reacción local.

#### **3.15.4. Preparación de muestras para estudios histopatológicos**

Se tomaron muestras del sitio de administración, corazón, pulmón, hígado, riñón, bazo, timo, médula ósea, ganglios mesentéricos y encéfalo de cada animal. Las muestras colectadas se fijaron en solución de formol al 10% y fueron embebidas en parafina. Mediante un micrótomo (Leika, Alemania) se obtuvieron cortes semifinos (2-3  $\mu\text{m}$ ), que se tiñeron con hematoxilina 0,6% y eosina 1%.

#### **3.16. APLICACIÓN DEL PVEGF<sub>121</sub> EN UN MODELO CANINO DE ISQUEMIA DE MIEMBROS INFERIORES**

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Bioterio del Instituto de Angiología y Cirugía Vascular. Se utilizaron 12 perros Beagle, a los cuales se les practicó la inducción quirúrgica de una isquemia de miembros inferiores unilateral. A continuación, se permitió un intervalo de 10 días para el desarrollo espontáneo de vasos colaterales. Al cabo de ese tiempo se confirmó la condición isquémica de los animales a través de la medición del índice de presiones. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 2 grupos de  $n=6$  para recibir inyecciones de pVEGF<sub>121</sub> o placebo por vía intramuscular. Los efectos anatómicos y fisiológicos de la transferencia génica se evaluaron en el transcurso de los 30 días siguientes a la transfección, a través de estudios hemodinámicos, angiográficos y hematológicos.

##### **3.16.1. Modelo de isquemia de miembros inferiores en perro**

Se provocó una isquemia severa de la extremidad posterior en perros Beagle de acuerdo con un procedimiento previamente descrito (Pu y cols., 1994). Los animales se anestesiaron con Tiopental a razón de 20 mg/kg de peso por vía intravenosa mediante un suero de Dextrosa 5%. Se les realizó una incisión longitudinal desde un punto 3 cm por encima de la arcada crural hasta la región prepatelar del miembro inferior. Se realizó la apertura de la aponeurosis y la disección de la arteria femoral en toda su longitud. Se disecaron todas las ramas de la arteria femoral: epigástrica inferior, femoral profunda, circunfleja lateral y epigástrica superficial. Después de realizar la disección distal de las arterias poplítea y safena, se procedió a ligar la arteria ilíaca externa, así como el resto de las arterias anteriormente mencionadas. La ligadura de las arterias se realizó con seda 3/0. Por último, la arteria femoral se removió totalmente desde su origen como rama de la arteria ilíaca externa hasta donde se bifurca para formar las arterias poplítea y safena. Se realizó la hemostasia y el cierre de la aponeurosis y la piel en dos planos con sutura nylon 2/0 mm. En el período postoperatorio se administró un bulbo de penicilina ( $10^6$  unidades) diario durante 7 días como medida preventiva para evitar los procesos infecciosos.

##### **3.16.2. Administración intramuscular de pVEGF<sub>121</sub>**

Se utilizaron jeringuillas de 1 mL con agujas de 26 G. Las inyecciones se realizaron de forma lenta para evitar la pérdida de fluido del epimisio. Se administró una dosis única de 2 mg de pVEGF<sub>121</sub>, contenidos en un volumen de 2 mL, que se distribuyó entre 4 sitios del músculo isquémico (0,5 mg/sitio). El placebo consistió en solución salina (NaCl 0,9%) estéril. De manera similar a la sustancia de ensayo, se inyectó un volumen total de 2 mL por vía intramuscular en 4 puntos del miembro isquémico de los animales controles.

### **3.16.3. Estudios hemodinámicos**

La evaluación hemodinámica se realizó mediante fotopleletismografía digital (Allen, 2007) (ver Anexo 4), antes y después del tratamiento, a los 15 y 30 días. Se utilizó un equipo Angiodin PD 3000 (Cuba).

#### **3.16.3.1. Índice de presiones**

El índice de presiones se refiere al cociente resultante de dividir la presión sistólica de la extremidad isquémica entre la correspondiente al miembro intacto (Chekanov y cols., 2002). En un animal sano este índice es aproximadamente igual a 1. Al inducir una isquemia unilateral, la presión sistólica del miembro isquémico se reduce con respecto a la del miembro intacto, por lo que el índice de presiones es inferior a 1. Para determinar la presión sistólica, se colocó un brazalete neumático apropiado por encima de la rodilla de cada pata trasera del animal, y un detector de velocidad de flujo (Sonicaid, Gran Bretaña) en la pata correspondiente. El brazalete se insufló hasta valores de presión supra-sistólicos. A continuación se desinfló lentamente, y se registró el primer flujo mediante el detector de velocidad de flujo. Con los valores de presión sistólica de ambas extremidades se calculó el índice de presiones del animal.

#### **3.16.3.2. Reserva vasomotora**

La reserva vasomotora o hiperemia reactiva es la respuesta que se produce ante una oclusión arterial transitoria (3 min), evaluada en términos de la amplitud de la señal fotopleletismográfica durante 6,5 min a partir del momento en que se libera la oclusión (Heron y cols., 1995). Se registraron los valores de amplitud máxima de la señal fotopleletismográfica y de tiempo total de hiperemia, antes y después de la administración de 2 mg de Nitroglicerina por vía intravenosa. Las respuestas de los animales a la vasodilatación se clasificaron como:

- No respuesta: No modificación de la amplitud de la señal fotopleletismográfica con respecto a la obtenida antes de la infusión de Nitroglicerina.
- Respuesta parcial: Incremento de la amplitud de la señal fotopleletismográfica, con un tiempo total de hiperemia menor que 10 min.
- Respuesta total: Incremento de la amplitud de la señal fotopleletismográfica, con un tiempo total de hiperemia de 10 min o más.

#### **3.16.4. Angiografía**

El procedimiento se realizó bajo anestesia, según se describió anteriormente (Acápite 3.16.1). Mediante palpación se detectó el latido de la arteria aorta, por donde se introdujo una aguja 18 G larga, y se inyectaron 20 mL de solución de contraste diatrizoato de sodio (Chinoin, China) en una sola punción. Se utilizó un equipo convencional de Rayos X, Siemens de 500 mA. Las imágenes se imprimieron en placas de 11 x 14 pulgadas. Se realizaron 2 angiografías, una inmediatamente antes del tratamiento (10 días después de la inducción de la isquemia), y otra a los 30 días de administrados el pVEGF<sub>121</sub> o el placebo.

#### **3.16.5. Estudios hematológicos**

Los animales se evaluaron de acuerdo con la siguiente batería de variables hematológicas: hemoglobina, hematocrito, glicemia, creatinina, proteínas totales, albúmina, fosfatasa alcalina, transaminasas glutámico-pirúvica (TGP) y glutámico-oxaloacética (TGO), tiempo de coagulación, tiempo de sangramiento, y conteo de plaquetas. Las mediciones se realizaron antes y después del tratamiento, a los 10 y 30 días.

#### **3.16.6. Observación de los animales**

La observación de los animales se realizó básicamente según lo descrito en el Acápite 3.15.3 con adecuación a la especie utilizada. Se prestó atención al sitio de administración, la piel, el pelo, los ojos, las orejas, las membranas mucosas, la temperatura corporal, los sistemas circulatorio, respiratorio y nervioso, la actividad somatomotora y el comportamiento.

### **3.17. APLICACIÓN DEL PVEGF<sub>121</sub> EN UN MODELO PORCINO DE ISQUEMIA DEL MIOCARDIO**

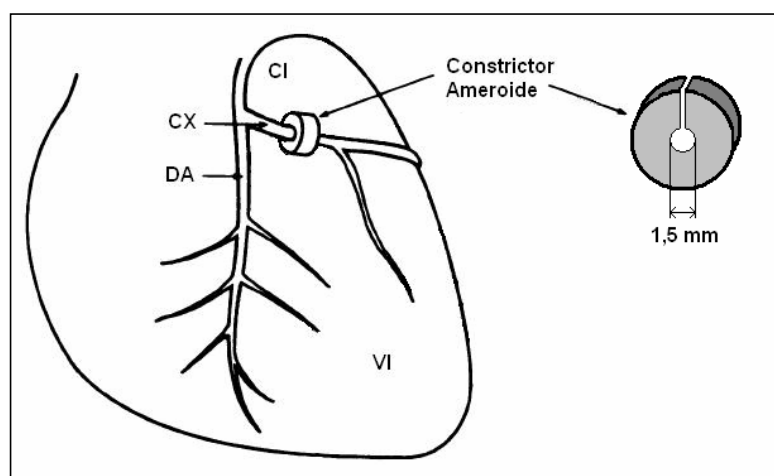
El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Porcinas. Se utilizaron 9 cerdos Yorkshire sanos, a los cuales se les practicó la inducción quirúrgica de una isquemia miocárdica crónica. Tres semanas después se les realizó un estudio gammagráfico para detectar y localizar los defectos de perfusión. Una semana después del SPECT (a las 4 semanas de la inducción de la isquemia) los animales fueron sometidos a una segunda intervención quirúrgica en la cual se les administró el plasmidio pVEGF<sub>121</sub> (n=5) o el placebo (n=4), según una distribución aleatoria, por vía intramiocárdica. El efecto del tratamiento sobre la perfusión miocárdica de los animales se evaluó mediante SPECT a las 4 semanas de la transferencia génica.

#### **3.17.1. Modelo de isquemia del miocardio en cerdo**

Se indujo una isquemia miocárdica crónica en cerdos Yorkshire mediante la colocación de un dispositivo constrictor Ameroide en la arteria circunfleja proximal, según se ha descrito previamente (Harada y cols., 1994). En la etapa preoperatoria los animales recibieron sedación con Flunitrazepan 0,1 mg/kg de peso y Ketamina 1,5 mg/kg, por vía intramuscular. A continuación, se realizó la inducción anestésica con Flunitrazepan 0,2 mg/kg, Ketamina 1,5 mg/kg, y Succinilcolina 1 mg, por vía endovenosa. Seguidamente, se procedió a la intubación endotraqueal con ventilación mecánica en volumen control con PO<sub>2</sub> de 1.

En la etapa operatoria se realizó una incisión de 10-12 cm de longitud, paralela al borde costal, por planos, hasta la apertura de la pleura. Se colocó un retractor costal, se separó el pulmón izquierdo mediante una compresa húmeda y se localizó la orejuela izquierda a través del pericardio. Se realizó una incisión pericárdica de 4-5 cm paralela a la base de implantación de la orejuela. La arteria circunfleja se disecó y se montó en dos suturas de seda 3/0.

Se colocó un constrictor Ameroide (Research Instruments & MFG, Oregón; EE.UU.) de 1,5 mm de diámetro, en la arteria circunfleja a 1-1,5 cm del punto de emergencia del tronco de la arteria coronaria izquierda (Fig. 3). El pericardio se cerró con dos puntos de afrontamiento. Se realizó el cierre por planos de la toracotomía y se aplicó yodo povidona sobre la herida.



**Figura 3. Colocación de un constrictor Ameroide en la arteria circunfleja.** CI: arteria coronaria izquierda; CX: arteria circunfleja; DA: arteria descendente anterior; VI: ventrículo izquierdo.

En la etapa post-operatoria, los animales recibieron un bulbo de vitaminas del complejo B por vía endovenosa. Al despertar, se procedió a la extubación y vigilancia post-operatoria. Como profilaxis de la sepsis, se administraron  $2 \times 10^6$  U de Penicilina rapilenta intramuscular, diariamente por 3 días.

### 3.17.2. Administración intramiocárdica de pVEGF<sub>121</sub>

La etapa pre-operatoria se realizó de acuerdo con lo descrito para la primera intervención quirúrgica (Acápites 3.17.1). Después de preparar la zona quirúrgica, se localizó el sitio de la incisión, 2 espacios intercostales por debajo de la incisión anterior. Se realizó una toracotomía izquierda de 12-14 cm de longitud, profundizando por planos con electrobisturí, hasta la cavidad pleural. Seguidamente se procedió a la incisión del pericardio y la disección de la región isquémica, previamente ubicada mediante SPECT. Se realizó la inyección intramiocárdica directa de una dosis única de 0,5 mg de pVEGF<sub>121</sub> en un volumen de 1 mL, que se distribuyó entre 4 sitios del área isquémica (125 µg/sitio). Las inyecciones se realizaron a una profundidad de 0,5 cm, con jeringuillas de 1 mL y agujas de 26 G. El placebo consistió en solución salina (NaCl 0,9%) estéril. De manera similar a la sustancia de ensayo, se inyectó un volumen total de 1 mL por vía intramiocárdica en 4 puntos del área isquémica de los animales controles. Por último, se practicó el

cierre por planos de la toracotomía y la asepsia de la herida con yodo povidona. La etapa post-operatoria de la intervención se llevó a cabo según se describió anteriormente (Acápites 3.17.1).

### **3.17.3. Tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT)**

Los estudios gammagráficos se realizaron en el Centro de Investigaciones Clínicas. Los animales recibieron sedación con Pentobarbital sódico intramuscular. Se administró una infusión intravenosa de 29-35 mCi del radiofármaco metoxi-isobutil-isonitrilo marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  ( $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI). Las imágenes gatilladas de perfusión miocárdica se adquirieron 1 hora después. Se utilizó una cámara gamma DS-7 (Sopha Medical Systems, Francia) de un cabezal circular, con acoplamiento a la señal electrocardiográfica del sujeto para identificar el ciclo cardiaco. Para la adquisición tomográfica de las imágenes se utilizó una órbita de rotación circular de 180°, desde la posición oblicua anterior izquierda hasta la oblicua posterior derecha, con 32 imágenes de 50 s cada una, y una ventana del 20% centrada en el fotopico de 140 keV. El procesamiento de las imágenes se realizó mediante el sistema Workstation Power Vision (GE-SMV, Canadá) con el programa Emory Cardiac Toolbox (Emory University, Atlanta, EE.UU.).

La perfusión miocárdica se evaluó en términos de la presencia, número, topografía y severidad de los defectos de perfusión. Para la interpretación visual de los resultados, el ventrículo izquierdo se dividió en 17 segmentos. Aquellas regiones que abarcaran 2 o más segmentos con déficit de perfusión (menos del 70% del máximo valor de captación de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI) se consideraron como defectos de perfusión. Los defectos se clasificaron de acuerdo al índice de captación del radiofármaco con respecto al valor máximo como: ligeros (60-69%), moderados (50-59%) o severos (menor que 50%). Se realizaron tres estudios gammagráficos: el primero se llevó a cabo antes de la inducción de la isquemia, como control del patrón de perfusión normal de cada animal; el segundo se realizó 3 semanas después de la inducción de la isquemia (basal), para detectar y localizar el área isquémica; y el tercero, 4 semanas después de administrado el tratamiento, para evaluar la evolución de la isquemia.

### **3.17.4. Observación de los animales**

La observación de los animales se realizó según lo descrito en los Acápites 3.15.3 y 3.16.6, con adecuación a la especie utilizada. Se prestó especial atención a la cicatrización de las heridas quirúrgicas y a la ocurrencia de complicaciones cardiovasculares.

## **3.18. APLICACIÓN DEL PVEGF<sub>121</sub> EN PACIENTES CON CARDIOPATÍA ISQUÉMICA CRÍTICA**

La aplicación del vector en estudio a pacientes con cardiopatía isquémica se llevó a cabo en el marco de un estudio clínico piloto, realizado en las instalaciones del Servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital Hermanos Ameijeiras.

### **3.18.1. Consideraciones éticas**

El estudio clínico se realizó conforme a los principios éticos para la investigación médica en seres humanos establecidos en la Declaración de Helsinki con sus modificaciones vigentes (Asociación Médica Mundial, 2008), la Guía de Buenas Prácticas Clínicas planteada por la Conferencia Internacional de Armonización (ICH, 1996), y su versión correspondiente editada por el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) de Cuba (CECMED, 2000). Tanto el protocolo clínico como las modificaciones

surgidas en el transcurso de su ejecución fueron evaluados y aprobados por el Comité de Ética en la Investigación Científica (CEIC) del Hospital Hermanos Ameijeiras y por el CECMED. El documento de Consentimiento Informado utilizado se presenta en el Anexo 5.

### **3.18.2. Diseño general**

Se realizó un estudio clínico piloto no controlado. Se estudiaron 6 pacientes con cardiopatía isquémica crítica, clasificación funcional III/IV según la Sociedad Cardiovascular Canadiense (SCC) (Anexo 6), a los cuales se les administró una dosis única de 0,5 mg de pVEGF<sub>121</sub> por vía intramiocárdica en el curso de una toracotomía izquierda. Los pacientes se evaluaron desde el punto de vista clínico e imagenológico en el transcurso de 6 meses.

### **3.18.3. Pacientes**

Se partió de un universo constituido por pacientes adultos, ciudadanos cubanos, de cualquier sexo y color de la piel, que se recibieron en la consulta de Cardiología del Hospital Hermanos Ameijeiras con cardiopatía isquémica crítica, refractarios al tratamiento médico convencional, y no candidatos a procedimientos de revascularización miocárdica.

- **Criterios de Inclusión:** 1- Diagnóstico de cardiopatía isquémica con clasificación funcional III o IV, según la SSC. 2- Demostración imagenológica de áreas de miocardio viable. 3- Refractariedad al tratamiento médico convencional. 4- Pacientes no candidatos a procedimientos de revascularización miocárdica (ACTP y cirugía de revascularización coronaria). 5- Edad entre 18 y 75 años, ambos inclusive. 6- Voluntariedad del paciente.
- **Criterios de Exclusión:** 1- Fracción de eyección menor que 30%. 2- Arritmias graves y sostenidas. 3- Retinopatía diabética u otra severa. 4- Evidencia de cáncer. 5- Aneurisma cardíaco. 6- Dilatación ventricular severa o signos avanzados de remodelación ventricular. 7- Creatinina > 200 mmol/L, leucograma fuera del rango  $5-10 \times 10^9$  /L, hemoglobina < 100 g/L, hematocrito < 30%, conteo de plaquetas fuera del rango  $150-350 \times 10^9$  /L, o alteraciones del coagulograma. 8- Incapacidad mental para emitir el consentimiento.

Como criterios de interrupción o salida del estudio, se tomaron en cuenta el abandono voluntario, los eventos adversos graves en el momento de la administración, y el fallecimiento. La no mejoría en los parámetros evaluados y el fallecimiento se consideraron criterios de fracaso terapéutico.

### **3.18.4. Tratamiento**

Se realizó la administración intramiocárdica del pVEGF<sub>121</sub> en el curso de una toracotomía. El proceder quirúrgico de la toracotomía se practicó según se describe en el Anexo 7. Una vez abierto el pericardio y expuesta la cara anterolateral del ventrículo izquierdo, se identificaron por inspección ocular macroscópica las áreas de isquemia viable previamente localizadas mediante SPECT. Se procedió a la inyección intramiocárdica directa de una dosis de 0,5 mg de pVEGF<sub>121</sub>. El contenido de un vial (0,5 mg



diluido en 1 mL) se extrajo con una jeringuilla de 1 mL, y se inyectó en 4 sitios definidos sobre la base del estudio imagenológico previo, a razón de 0,25 mL (125 µg) por cada sitio de punción. Posteriormente se continuó con los procedimientos operatorios y postoperatorios de rutina (Anexo 7). Como datos operatorios se registraron el tiempo quirúrgico, el tiempo de administración del pVEGF<sub>121</sub>, la frecuencia cardíaca y la tensión arterial medidas inmediatamente antes y después de efectuar las inyecciones intramiocárdicas.

### **3.18.5. Evaluación de la seguridad**

#### **3.18.5.1. Eventos adversos**

Se consideró como evento adverso cualquier manifestación médica indeseable y no intencionada que se presentara en los sujetos de investigación, independientemente de su relación de causalidad con el tratamiento en estudio. La información se obtuvo mediante el examen físico y el interrogatorio exhaustivo del paciente en el transcurso de los 180 días posteriores a la administración del pVEGF<sub>121</sub>. Se registró la duración, intensidad, relación de causalidad, medidas adoptadas, y resultado de cada evento adverso. Los eventos adversos se clasificaron con respecto a su intensidad, relación de causalidad, y resultado, según se describe en el Anexo 8. Los eventos adversos graves ocurridos en el transcurso del estudio se notificaron antes de las 48 horas al CEIC del Hospital Hermanos Ameijeiras y al CECMED.

#### **3.18.5.2. Parámetros de laboratorio clínico**

Los parámetros de laboratorio clínico incluyeron hemoglobina, hematocrito, eritrosedimentación, leucograma con diferencial, conteo de plaquetas, aspartato amino-transferasa (ASAT), bilirrubina total, fosfatasa alcalina, albúmina, glicemia, creatinina, urea, deshidrogenasa láctica (LDH), y colesterol. Estas variables se controlaron al inicio del estudio, a los 7, 30, 60 y 180 días de administrado el tratamiento.

### **3.18.6. Determinación de la concentración sérica de VEGF**

La concentración sérica de VEGF de los pacientes se determinó mediante un ELISA anti-VEGF (Quantikine, R&D Systems, EE.UU.), según se describió en el Acápite 3.13. Las determinaciones se realizaron antes y después del tratamiento, a los 2, 4, 7, y 15 días.

### **3.18.7. Evaluación del efecto terapéutico**

#### **3.18.7.1. Evaluación clínica**

Las variables clínicas evaluadas fueron la clasificación funcional según la SCC (Anexo 6), el número de episodios de angina por semana y el consumo semanal de Nitroglicerina (tabletas). La información se obtuvo por medio del interrogatorio y el examen físico practicado a los pacientes antes (basal) y después del tratamiento, a los 30, 60, 90, y 180 días.

#### **3.18.7.2. Tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT)**

El SPECT gatillado se realizó básicamente según se describió en el Acápite 3.17.3. La dosis de <sup>99m</sup>Tc-MIBI administrada fue de 25-30 mCi. La adquisición tomográfica de las imágenes se realizó desde la posición oblicua anterior derecha a la oblicua posterior izquierda del tórax del paciente, con 32 imágenes de 60 s cada una.

En la etapa inicial del ensayo (antes del tratamiento), el procedimiento de SPECT estuvo compuesto por dos estudios separados por 24 horas, ambos en reposo, pero el segundo sensibilizado con 1 mg de Nitroglicerina sublingual, con el objetivo de precisar la existencia de defectos de perfusión reversibles (viables). Los defectos se consideraron reversibles si la captación del radiofármaco se encontraba entre el 30 y el 50% en el estudio basal, y mejoraba un 10% o más en el estudio sensibilizado con Nitroglicerina; o si la captación en el estudio basal estaba entre el 50 y el 70%, aunque no se modificara en el estudio sensibilizado. Los defectos se consideraron irreversibles (necróticos) si la captación era inferior al 30%, o si estaba entre el 30 y el 50%, pero no se modificaba en el estudio sensibilizado. En caso de defectos con características mixtas (isquemia y necrosis coexistentes en un área) se tuvo en cuenta la magnitud del tejido viable en comparación con la magnitud del no viable para expresar la predominancia de una de esas características. Los estudios de seguimiento se realizaron en condiciones de reposo (no sensibilizado) a los 30, 60, y 180 días del tratamiento.

### **3.19. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos se procesaron por medio del programa GraphPad Prism versión 5.0 (Motulsky, 2007). En el caso de las variables cuantitativas, se estimaron las medidas de tendencia central y dispersión. Para las comparaciones entre grupos de tratamiento, se realizaron las pruebas de bondad de ajuste a la distribución normal (pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk) y de homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). En caso de cumplirse los supuestos anteriores, se aplicó la prueba t de Student no pareada o un análisis de varianza (ANOVA) paramétrico seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. De lo contrario, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney o la prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

Adicionalmente, para cada grupo se realizaron análisis pareados entre tiempos. En caso de cumplimiento del supuesto de aproximación por una distribución normal, se aplicó la prueba t de Student pareada o el ANOVA de medidas repetidas seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. En caso contrario, se utilizó la prueba de Wilcoxon o la prueba de Friedman seguida por la prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

Para las variables cualitativas, se estimó la distribución de frecuencias, se construyeron las tablas de clasificación cruzada con respecto a la variable “grupo de tratamiento”, y se realizó la prueba exacta de Fisher. En todos los casos, los valores de  $p < 0,05$  se interpretaron como indicadores de diferencias estadísticamente significativas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DEL VECTOR PVEGF<sub>121</sub>

#### 4.1.1. Generación de plasmidios codificantes para el gen del VEGF<sub>121</sub>

El gen que codifica para el VEGF<sub>121</sub> humano, con su péptido señal de secreción correspondiente, se insertó en el vector de expresión pAEC-Δ2 según se describió anteriormente (Acápite 3.9). Como resultado de la construcción genética, se seleccionaron cuatro clones recombinantes: pVEGF<sub>121</sub>-1, -2, -3 y -4. Estos plasmidios tienen una talla de 4039 pb y contienen el gen del VEGF<sub>121</sub> bajo el control del promotor/potenciador de CMV. Incluyen además, las señales de procesamiento y poliadenilación del ARNm del SV40, que favorecen la expresión del gen insertado; y el origen de replicación *ColE1*, de *E. coli*. Como marcador de selección, portan el gen de resistencia a la Kanamicina. La identidad de los clones recombinantes se comprobó mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN.

Los plasmidios pVEGF<sub>121</sub>-1, -2, -3, y -4 y el vector pAEC-Δ2 se digirieron con las endonucleasas *NcoI* (Fig. 4 A) y *PvuII* (Fig. 4 B). Los clones recombinantes presentan dos sitios de restricción *NcoI*, uno en la posición 361 del promotor/potenciador de CMV y otro en la posición 83 del gen del VEGF<sub>121</sub>; mientras que el vector pAEC-Δ2 posee solamente el primero de estos sitios (ver Fig. 2). Consistentemente, las digestiones de los clones pVEGF<sub>121</sub>-1, -2, -3, y -4 con *NcoI* generaron dos bandas, una de aproximadamente 480 pb y otra de alrededor de 3559 pb (Fig. 4 A, líneas 3, 5, 7 y 9). El vector pAEC-Δ2 digerido con esta enzima rindió una sola banda a una altura intermedia entre 3000 y 4000 pb, de acuerdo con la talla del plasmidio lineal (3595 pb) (Fig. 4 A, línea 11).

La endonucleasa *PvuII* por su parte, no digirió ninguno de los cuatro clones recombinantes (Fig. 4 B, líneas 3, 5, 7 y 9), puesto que el sitio de restricción correspondiente se pierde en el proceso de clonación, de modo que no está presente en la construcción final (ver Fig. 2). En el caso del vector pAEC-Δ2, se obtuvo una banda en correspondencia con el plasmidio lineal (Fig. 4 B, línea 11).

La secuencia nucleotídica completa del gen del VEGF<sub>121</sub> insertado en los cuatro clones se muestra en la Figura 5, junto a la secuencia de aminoácidos correspondiente. En todos los casos se obtuvo un 100% de concordancia entre el resultado obtenido y el esperado, según la secuencia publicada del VEGF<sub>121</sub> (Leung y cols., 1989; Tischer y cols., 1991). Se verificó en particular la unión del gen clonado al extremo 3' del promotor y la presencia del codón de iniciación de la traducción ATG en el extremo 5' del gen. Se comprobó también la presencia del codón de terminación de la traducción TGA en el extremo 3' del gen.

1	<b>ATG AAC TTT CTG CTG TCT TGG GTG CAT TGG AGC CTC GCC TTG CTG CTC TAC</b>
-26	<b>Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu Tyr</b>
52	<b>CTC CAC CAT GCC AAG TGG TCC CAG GCT</b> GCA CCC ATG GCA GAA GGA GGA GGG
-9	<b>Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala</b> Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly
103	CAG AAT CAT CAC GAA GTG GTG AAG TTC ATG GAT GTC TAT CAG CGC AGC TAC
9	Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr
154	TGC CAT CCA ATC GAG ACC CTG GTG GAC ATC TTC CAG GAG TAC CCT GAT GAG
26	Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu
205	ATC GAG TAC ATC TTC AAG CCA TCC TGT GTG CCC CTG ATG CGA TGC GGG GGC
43	Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly
256	TGC TGC AAT GAC GAG GGC CTG GAG TGT GTG CCC ACT GAG GAG TCC AAC ATC
60	Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile
307	ACC ATG CAG ATT ATG CGG ATC AAA CCT CAC CAA GGC CAG CAC ATA GGA GAG
77	Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu
358	ATG AGC TTC CTA CAG CAC AAC AAA TGT GAA TGC AGA CCA AAG AAA GAT AGA
94	Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg
409	GCA AGA CAA GAA AAT TGT GAC AAG CCG AGG CGG TGA
111	Ala Arg Gln Glu Asn Cys Asp Lys Pro Arg Arg Stop

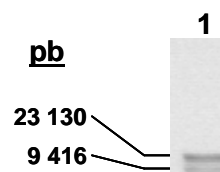
**Figura 5. Secuencia nucleotídica del gen del VEGF<sub>121</sub> y secuencia de aminoácidos de la proteína codificada.** El fragmento señalado en negritas corresponde al péptido señal de secreción.

#### 4.1.2. Purificación a mediana escala de los plasmidios codificantes para el gen del VEGF<sub>121</sub>

Los plasmidios pVEGF<sub>121</sub>-1, -2, -3, y -4 y el vector pAEC-Δ2 se purificaron a partir de la cepa DH10B de *E. coli* K12 transformada (Acápite 3.10.1). Las preparaciones de ADN plasmídico se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% (Fig. 6).

**Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 0,8% de las preparaciones de ADN plasmídico.**

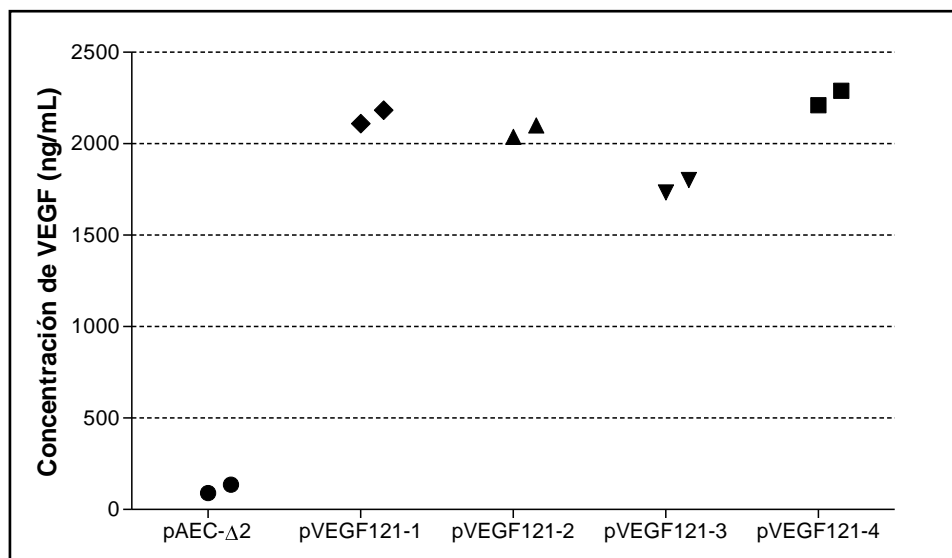
- 1- PPM Lambda *Hind*III (Promega, EE.UU.)
- 2- Clon pVEGF<sub>121</sub>-1
- 3- Clon pVEGF<sub>121</sub>-2
- 4- Clon pVEGF<sub>121</sub>-3
- 5- Clon pVEGF<sub>121</sub>-4
- 6- pAEC-Δ2



En todos los casos se observaron dos bandas, una superior minoritaria y otra inferior mayoritaria, correspondientes a las conformaciones circular abierta y superenrollada del ADN plasmídico, respectivamente. No se observaron bandas contaminantes de ARN, ni de ADN cromosomal de *E. coli*.

#### 4.1.3. Expresión del gen del VEGF<sub>121</sub> en células CHO-K1 transfectadas con los plasmidios recombinantes

Los plasmidios pVEGF<sub>121</sub>-1, -2, -3, y -4 y pAEC-Δ2 purificados se utilizaron para transfectar la línea celular CHO-K1 (ATCC CCL-61) (Acápite 3.12). La ocurrencia de las transfecciones se comprobó a través de la medición de los niveles de VEGF en los sobrenadantes a las 48 h de cultivo, mediante un ELISA anti-VEGF (Acápite 3.13). Los niveles de expresión de VEGF correspondientes a los cuatro clones resultaron similares entre sí, y fueron de 15 a 20 veces superiores a las concentraciones de las muestras provenientes de células transfectadas con el vector pAEC-Δ2 (Fig. 7).

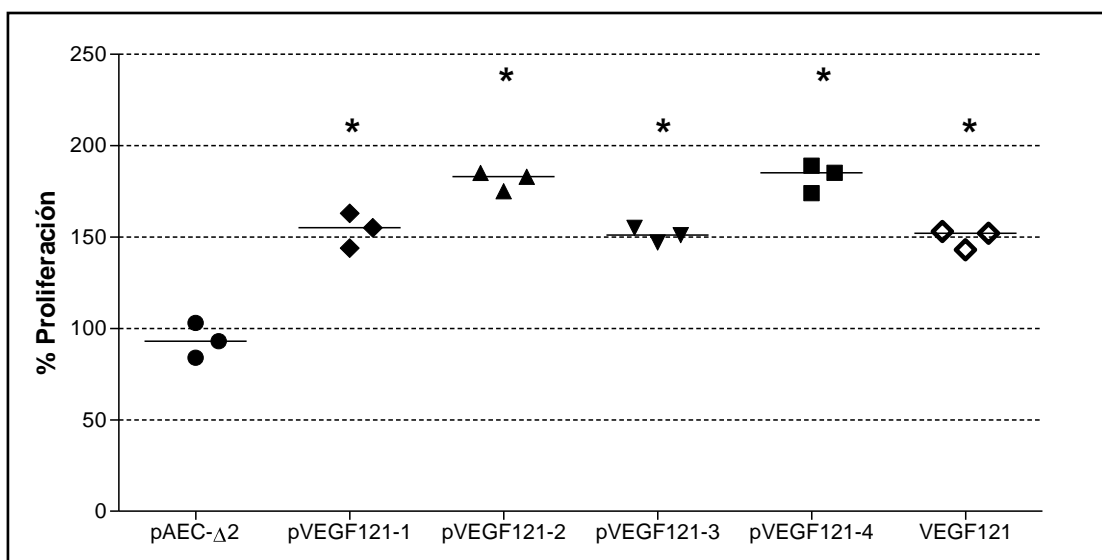


**Figura 7. Expresión de VEGF<sub>121</sub> en células CHO-K1 transfectadas con cuatro clones de pVEGF<sub>121</sub>.** La concentración de VEGF en los sobrenadantes de cultivo de las células transfectadas se determinó mediante un ELISA. Como control negativo se utilizó el plasmidio pAEC-Δ2. Se presentan los datos de dos réplicas de cada punto experimental.

#### 4.1.4. Actividad biológica del VEGF<sub>121</sub> expresado en células CHO-K1

Con el propósito de evaluar la actividad biológica del VEGF<sub>121</sub> expresado en las células CHO-K1 transfectadas con los plasmidios pVEGF<sub>121</sub>-1, -2, -3, y -4, se realizaron dos experimentos en células endoteliales humanas: un ensayo de proliferación de células HUVEC (Acápite 3.14.1) y un estudio de actividad angiogénica *in vitro* sobre células HMEC (Acápite 3.14.2).

Las células HUVEC cultivadas en presencia de los sobrenadantes de cultivo de células CHO-K1 transfectadas con los clones recombinantes exhibieron porcentajes de proliferación en un rango entre 150 y 185% con respecto a las células cultivadas en ausencia de aditivos. Este comportamiento estuvo en correspondencia con la proteína VEGF<sub>121</sub>, que se utilizó como control positivo (Fig. 8). Los porcentajes de proliferación obtenidos para los plasmidios pVEGF<sub>121</sub>-1, -2, -3, y -4 fueron significativamente superiores al correspondiente al vector pAEC-Δ2, empleado como control negativo ( $p < 0,05$  según la prueba U de Mann-Whitney). No se detectaron diferencias significativas entre los diferentes clones ( $p > 0,05$  según la prueba de Kruskal-Wallis).



**Figura 8. Proliferación de células HUVEC en presencia del VEGF<sub>121</sub> expresado en células CHO-K1.** Las células HUVEC se cultivaron en presencia de los sobrenadantes de cultivo de las células CHO-K1 transfectadas con los cuatro clones de pVEGF<sub>121</sub>. El porcentaje de proliferación se calculó con respecto al control de medio sin aditivos (100%). Como control negativo se utilizó el plasmidio pAEC-Δ2. Como control positivo se empleó VEGF<sub>121</sub> humano recombinante (10 ng/mL). Se muestran los datos de tres réplicas de cada punto experimental, con la mediana representada por una línea. \*  $p < 0,05$  con respecto al control negativo, según la prueba U de Mann-Whitney.

Para evaluar si el VEGF<sub>121</sub> producto de la expresión del transgen era capaz de inducir la formación de estructuras semejantes a capilares, se realizó un ensayo de angiogénesis *in vitro*. Las células HMEC, sembradas en una matriz tridimensional de Matrigel, se estimularon con los sobrenadantes de cultivo de células CHO-K1 transfectadas con los plasmidios pVEGF<sub>121</sub>-1, -2, -3, y -4 (Acápites 3.14.2). Las células endoteliales cultivadas en presencia del sobrenadante correspondiente al control negativo pAEC-Δ2 mantuvieron su forma redondeada, tamaño pequeño, y formaron escasos cordones celulares (Fig. 9 A). En contraste, las células tratadas con los sobrenadantes que contenían VEGF<sub>121</sub> exhibieron drásticos cambios morfológicos: se alargaron hasta formar

delgados cordones a través de los cuales se conectaron entre sí, de modo que se originaron numerosos nodos (Fig. 9 B-E). Similares efectos se observaron con 10 ng/mL de VEGF<sub>121</sub>, que se utilizó como control positivo (Fig. 9 F). Los tratamientos con los sobrenadantes correspondientes a los clones pVEGF<sub>121</sub>-1, -3, y -4 resultaron en la formación de un número de nodos significativamente superior al obtenido para el control negativo ( $p < 0,05$  según la prueba U de Mann-Whitney) (Fig. 9 G). No se detectaron diferencias significativas entre los clones ( $p > 0,05$  según la prueba de Kruskal-Wallis).

#### 4.1.5. Purificación a gran escala y caracterización de las preparaciones del plasmidio pVEGF<sub>121</sub>

Tomando como base los resultados de expresión génica y actividad biológica de los clones recombinantes estudiados, se seleccionó el pVEGF<sub>121</sub>-1 para pasar a la siguiente etapa experimental, que incluye los estudios en modelos animales. Este plasmidio, al cual nos referiremos en lo adelante como pVEGF<sub>121</sub>, se purificó a partir de fermentaciones de 5 L de la cepa DH10B de *E. coli* K12 transformada (Acápite 3.10.2). El proceso de purificación se repitió cuatro veces, de modo que se generaron cuatro lotes: 501, 502, 503 y 504. Los rendimientos fueron de: 50,0; 43,6; 56,0 y 52,4 mg de ADN plasmídico / L de cultivo, respectivamente. El rendimiento promedio de los cuatro procesos fue de  $50,5 \pm 5,2$  mg de ADN / L de cultivo.

Los lotes se caracterizaron con respecto a la concentración de ADN plasmídico, el porcentaje de ADN superenrollado, y el contenido de contaminantes tales como: ADN cromosomal bacteriano, ARN y proteínas (Tabla 5). Los parámetros analizados se comportaron de manera homogénea en los cuatro lotes. Las concentraciones de ADN plasmídico, medidas por absorbancia a 260 nm (Acápite 3.11.1), se mantuvieron dentro del rango 0,4-0,6 mg/mL.

**Tabla 5. Caracterización de cuatro lotes del plasmidio pVEGF<sub>121</sub>.**

Parámetros	Lote 501	Lote 502	Lote 503	Lote 504
Concentración de ADN plasmídico (mg/mL)	$0,587 \pm 0,0425$	$0,484 \pm 0,0455$	$0,514 \pm 0,0365$	$0,537 \pm 0,0126$
Porcentaje de ADN superenrollado (%)	$94 \pm 0,6$	$92 \pm 0,0$	$91 \pm 0,6$	$92 \pm 0,6$
Contenido de ADN cromosomal de <i>E. coli</i>	No visible	No visible	No visible	No visible
Contenido de ARN	No visible	No visible	No visible	No visible
Concentración de proteínas	No detectable	No detectable	No detectable	No detectable

Los datos de concentración de ADN plasmídico y porcentaje de ADN superenrollado se presentan como la media  $\pm$  la desviación estándar (DS) de tres réplicas.

Los cuatro lotes se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% (Fig. 10 A). En todos los casos se observaron dos bandas, una superior aproximadamente al nivel de los 6000 pb, correspondiente a la conformación circular abierta del ADN plasmídico; y otra banda al nivel de los 2322 pb, perteneciente al ADN superenrollado. La proporción en que se encontraban las diferentes conformaciones del ADN plasmídico se determinó mediante densitometría (Acápite 3.11.2). En el perfil densitométrico (Fig. 10 B), el pico mayoritario se corresponde con el ADN superenrollado, y el minoritario con el ADN circular abierto. Los lotes del plasmidio pVEGF<sub>121</sub> se obtuvieron con 91-94% de ADN superenrollado y 6-9% de ADN circular abierto (Tabla 5, Fig. 10 C). La conformación lineal no se detectó.

En la electroforesis no se observaron bandas de alto peso molecular correspondientes al ADN cromosomal de *E. coli*, ni bandas inferiores de ARN (Tabla 5, Fig. 10 A). Con respecto a las proteínas contaminantes presentes en las preparaciones, no se detectaron niveles cuantificables por el método del BCA (Tabla 5). Los resultados obtenidos estuvieron dentro de los límites de aceptación definidos para cada una de las variables evaluadas (Anexo 3). En el caso de los restantes parámetros de calidad, a pesar de no formar parte de esta tesis, es oportuno precisar que los cuatro lotes cumplieron con las especificaciones establecidas para el pVEGF<sub>121</sub>.

## **4.2. ANÁLISIS EXPLORATORIO DE LA TOXICIDAD DEL VECTOR PVEGF<sub>121</sub>**

Como paso previo a la evaluación del plasmidio pVEGF<sub>121</sub> en modelos animales, se realizó un estudio exploratorio de la toxicidad en ratas Sprague-Dawley sanas. Se ensayaron varios niveles de dosis administradas por vía intramuscular e intramúsculo cardiaco (Acápite 3.15). Los animales se evaluaron con respecto al peso corporal, el consumo de alimentos, las observaciones clínicas, los hallazgos macroscópicos y microscópicos en relación con el sitio de administración y los órganos internos, en el momento del sacrificio.

### **4.2.1. Peso corporal y consumo de alimento**

El peso corporal de los animales se comportó de modo similar en todos los grupos de tratamiento, tanto para el sexo femenino (Fig. 11 A) como para el masculino (Fig. 11 B). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos para ninguno de los tiempos analizados ( $p > 0,05$  según el ANOVA paramétrico). Por otra parte, se observó un aumento progresivo del peso durante el período de experimentación. A los 14 días del tratamiento, todos los grupos exhibieron incrementos de peso significativos con respecto a su valor medio inicial ( $p < 0,01$  según el ANOVA de medidas repetidas seguido por la prueba comparaciones múltiples de Bonferroni).



En correspondencia con estos resultados, el consumo de alimento también se comportó de manera homogénea entre los grupos de tratamiento para ambos sexos (Fig. 12). En el caso de las hembras, para el día inicial del ensayo no se detectaron diferencias significativas entre los grupos I-IV, tratados por vía intramuscular, ni entre los grupos V-VII, que recibieron los tratamientos intramúsculo cardíaco. Sin embargo, se comprobó que los grupos tratados intramúsculo cardíaco (V-VII) consumieron cantidades de alimento significativamente inferiores a las consumidas por los grupos tratados por vía intramuscular (I-IV) ( $p < 0,01$  según el ANOVA paramétrico seguido por la prueba comparaciones múltiples de Bonferroni).

Durante las dos semanas siguientes, el consumo de alimento se mantuvo estable, entre 18 y 23 g (Fig. 12 A), sin diferencias significativas entre grupos de tratamiento. Al analizar cada grupo en el tiempo, se observaron incrementos significativos en el consumo de alimento de los grupos tratados intramúsculo cardíaco (V-VII) entre el día 1 y la primera semana del ensayo ( $p < 0,05$  según el ANOVA de medidas repetidas seguido por la prueba comparaciones múltiples de Bonferroni).

En el caso de los animales del sexo masculino, el consumo de alimento fue sostenido y estable durante todo el ensayo, con valores alrededor de los 25 g (Fig. 12 B). El análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre los grupos de tratamiento ( $p > 0,05$  según la prueba de Kruskal-Wallis) ni entre los tiempos estudiados ( $p > 0,05$  según la prueba de Friedman).

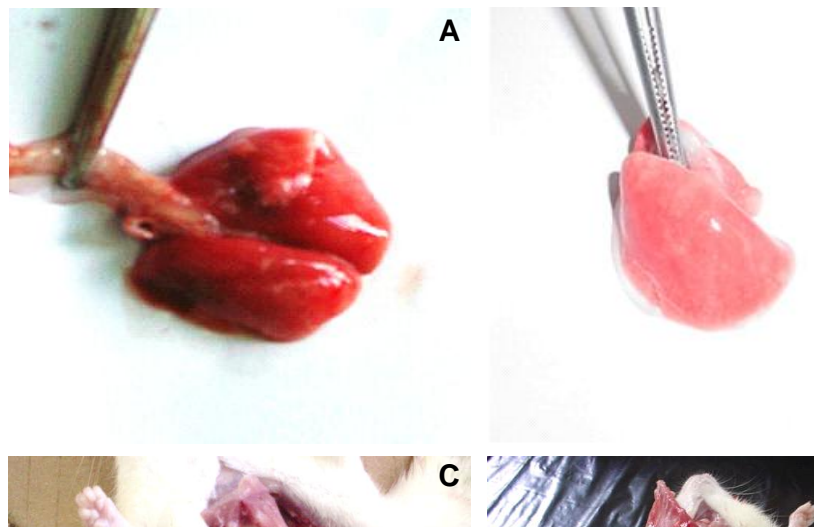
#### **4.2.2. Observaciones clínicas**

No se registraron muertes durante el estudio. En las observaciones clínicas realizadas diariamente no se detectaron signos de toxicidad. Los animales no presentaron cambios en la coloración y apariencia de la piel, el pelo, los ojos, las orejas, las almohadillas plantares, las uñas, y las membranas mucosas. La temperatura corporal no presentó alteraciones a lo largo del estudio. Los animales manifestaron en todo momento una adecuada respuesta ante los estímulos, lo cual indica que la actividad somatomotora y el comportamiento se mantuvieron normales. Con respecto al sitio de administración, no se observó ningún signo clínico atribuible al plasmidio en estudio. En los animales tratados por vía intramúsculo cardíaco no se registraron vasodilatación, vasoconstricción, alteraciones del ritmo cardíaco, ni ningún otro signo adverso que denotara afección del sistema circulatorio, producto de la vía de administración utilizada.

#### **4.2.3. Hallazgos macroscópicos**

En la necropsia de los animales sacrificados a las 48 horas del tratamiento, solo se registraron hallazgos macroscópicos en dos animales del grupo VI (10xDT i.m.c.): uno de ellos presentó

hemorragia en el parénquima pulmonar (Fig. 13 A), y el otro exhibió un coágulo en el lóbulo hepático (Fig. 13 C). Como referencia se muestran órganos de apariencia normal (Fig. 13 B y D).



**Figura 13. Hallazgos macroscópicos correspondientes a las ratas sacrificadas a las 48 horas.**

(A) Hemorragia a nivel del parénquima pulmonar. (B) Pulmón normal. (C) Coágulo en el lóbulo hepático (flecha). (D) Animal con hígado y demás órganos de apariencia normal.

El resto de los animales sacrificados a las 48 horas no presentó ninguna alteración en los órganos y tejidos inspeccionados. No se detectaron lesiones en los sitios de administración (extremidad posterior derecha y musculatura cardíaca). Los pulmones, hígado, bazo, timo, médula ósea, ganglios mesentéricos y riñones de cada animal mostraron una morfología normal (Fig. 13 D). Del mismo modo, las observaciones macroscópicas de los animales sacrificados a los 14 días del tratamiento no evidenciaron ningún signo de toxicidad ni de daño local en ninguno de los grupos evaluados.

#### 4.2.4. Hallazgos microscópicos

El análisis histopatológico de los animales sacrificados a las 48 horas arrojó los resultados que se presentan en la Tabla 6. La Figura 14 muestra imágenes representativas de los eventos más frecuentes. En el caso de los animales tratados por vía intramuscular en la extremidad posterior

(grupos I-IV), los hallazgos más notables fueron la reacción inflamatoria intersticial a células redondas (Fig. 14 A), la necrosis de fibras musculares asociada a tejido de cicatrización (Fig. 14 B), ambas en el sitio de administración; y la eosinofilia perivascular y peribronquial en el pulmón (Fig. 14 C y D). Ninguno de ellos se presentó en el grupo tratado con placebo.

La reacción inflamatoria intersticial a células redondas (Tabla 6, Fig. 14 A) se registró en los grupos II, III y IV, de manera dosis-dependiente. El análisis estadístico arrojó diferencias significativas entre los grupos I y IV ( $p=0,0108$  según la prueba exacta de Fisher).

En el grupo IV, que recibió la dosis más elevada de pVEGF<sub>121</sub>, se encontraron tres animales con necrosis de las fibras musculares acompañada de concentraciones de macrófagos (Tabla 6, Fig. 14 B). Sin embargo, no se observó necrosis en los animales tratados con dosis inferiores, ni con placebo. La necrosis estuvo estrechamente vinculada al tejido de cicatrización, que se presentó en los mismos tres animales del grupo IV y en uno del grupo III. Para estos dos eventos no se encontraron diferencias significativas entre los grupos I-IV ( $p>0,05$  según la prueba exacta de Fisher).

Al analizar las muestras de pulmón, se observó una reacción celular perivascular y peribronquial con predominio de eosinófilos (Tabla 6, Fig. 14 C y D) en animales de los grupos II y III. De manera interesante, este hallazgo no se presentó en el grupo IV. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo III y los grupos I y IV ( $p=0,0031$  según la prueba exacta de Fisher). Otro evento de menor incidencia fue la hematopoyesis extramedular en el bazo.

Con respecto a los animales tratados por vía intramúsculo cardiaco (grupos V-VII), los hallazgos más frecuentes fueron el tejido de cicatrización (Fig. 14 E), la necrosis de fibras musculares (Fig. 14 F), ambos en el sitio de administración; y la eosinofilia perivascular y peribronquial en el pulmón. Estos eventos se presentaron en los tres grupos experimentales (Tabla 6).

El tejido de cicatrización se registró en al menos el 50% de los animales de los grupos VI y VII, a diferencia del grupo V (placebo), donde solo el 20% lo presentó (Tabla 6, Fig. 14 E). En algunos de estos animales se observó una cicatriz cuya dirección coincidió con la trayectoria del inóculo, con pequeños focos de necrosis asociados a la reacción de cicatrización (Fig. 14 F).

La eosinofilia perivascular y peribronquial presentó características similares a las observadas en los animales tratados por vía intramuscular (Fig. 14 C y D). Otros hallazgos menos frecuentes fueron la hemorragia focal en el pulmón y la hematopoyesis extramedular en el bazo. El análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre los grupos V-VII para ninguno de los eventos descritos ( $p>0,05$  según la prueba exacta de Fisher).

A las 48 horas del tratamiento no se reportaron alteraciones microscópicas en otros órganos, tales como: hígado, riñones, timo, médula ósea, ganglios mesentéricos y encéfalo, para los grupos estudiados.

En el análisis histopatológico de los animales sacrificados a los 14 días, solo se registraron hallazgos relativos a la cicatrización en el sitio de administración (Tabla 7). La frecuencia de aparición de este evento fue mayor en los grupos inoculados en la musculatura cardíaca (V-VII) que en los tratados por vía intramuscular (I-IV). En ambos casos la cicatrización se caracterizó por un tejido bien definido, sin necrosis de las fibras musculares (Fig. 15 A y B). El análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre los grupos I-IV ni entre los grupos V-VII ( $p > 0,05$  según la prueba exacta de Fisher).

**Figura 15. Alteraciones microscópicas correspondientes a las ratas sacrificadas a los 14 días.**

(A) Tejido de cicatrización en el músculo esquelético de la extremidad (flecha) (40X). (B) Tejido de cicatrización en el músculo estriado cardíaco (flecha) (20X).



**4.3. EVALUACIÓN DEL VECTOR pVEGF<sub>121</sub> EN UN MODELO CANINO DE ISQUEMIA DE MIEMBROS INFERIORES**

El plasmidio pVEGF<sub>121</sub> se ensayó en un modelo canino de isquemia de miembros inferiores, el cual consistió en la inducción quirúrgica de una isquemia unilateral (Acápite 3.16.1). Los tratamientos con pVEGF<sub>121</sub> o placebo se administraron 10 días después de la cirugía, para permitir el desarrollo espontáneo de vasos colaterales en respuesta a la hipoxia.

**4.3.1. Estudios hemodinámicos**

Los parámetros hemodinámicos evaluados fueron el índice de presiones (Acápite 3.16.3.1) y la reserva vasomotora (Acápite 3.16.3.2). En la Tabla 8 se muestran los valores individuales de índice de presiones. Diez días después de la intervención quirúrgica (día 0), los índices de presiones de los animales se encontraban en un rango entre 0,33 y 0,66. Para el total de animales, la media fue de  $0,53 \pm 0,106$ . Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 2 grupos experimentales ( $n=6$ ) con índices de presiones similares entre sí (pVEGF<sub>121</sub>= $0,52 \pm 0,089$ ; control= $0,54 \pm 0,129$ ;  $p > 0,05$  según la prueba t de Student para datos no pareados) (Fig. 16, día 0).

**Tabla 8. Índices de presiones de los perros antes (día 0) y después (días 15 y 30) del tratamiento.**

Grupo	Animal No.	día 0	día 15	día 30
Control	01	0,66	0,67	0,52

	02	0,45	0,58	0,47
	06	0,57	0,39	0,64
	07	0,33	0,68	0,80
	08	0,66	0,52	0,48
	09	0,58	0,77	0,45
pVEGF <sub>121</sub>	03	0,46	0,77	0,74
	04	0,52	0,78	0,80
	05	0,42	0,54	0,84
	10	0,46	0,62	0,79
	11	0,62	0,67	0,72
	12	0,63	0,65	0,84

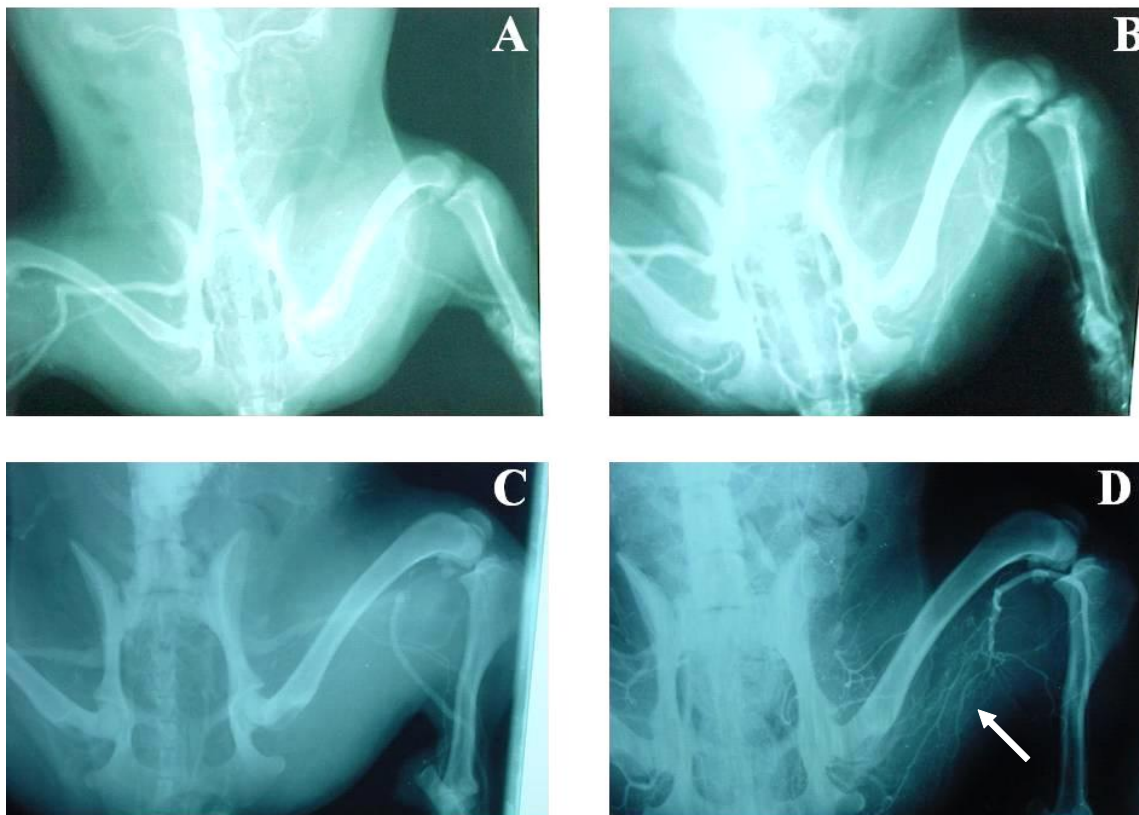
A los 15 días de administrados los tratamientos, los índices de presiones de los grupos pVEGF<sub>121</sub> y control se incrementaron en un 29 y un 11%, respectivamente, con respecto a los valores basales (Fig. 16); pero no se encontraron diferencias significativas entre grupos (pVEGF<sub>121</sub>=0,67±0,092; control=0,60±0,135; p>0,05 según la prueba t de Student para datos no pareados). Sin embargo, 30 días después de la transferencia génica, el índice de presiones del grupo tratado con pVEGF<sub>121</sub> fue significativamente superior al del grupo control (pVEGF<sub>121</sub>=0,79±0,050; control=0,56±0,136; p=0,0031 según la prueba t de Student para datos no pareados).

Por otra parte, al comparar los índices de presiones medidos a los 30 días con los basales, se encontró un incremento significativo para el grupo pVEGF<sub>121</sub> (p=0,0017 según la prueba t de Student para datos pareados), pero no para el grupo control (Fig. 16).

En cuanto a la reserva vasomotora, antes de administrar los tratamientos con pVEGF<sub>121</sub> o placebo (día 0) no se observó respuesta fotopleetismográfica a la vasodilatación con Nitroglicerina en ningún animal (Fig. 17). A los 15 días, el 50% de los animales controles respondieron de forma parcial, mientras que dos terceras partes de los tratados con pVEGF<sub>121</sub> respondieron parcial o totalmente. A los 30 días, los animales respondedores permanecieron en el 50% para el grupo control. En contraste, el 100% de los animales tratados con pVEGF<sub>121</sub> mostraron respuestas parciales (33%) o totales (67%). El análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre los grupos a los 15 ni a los 30 días post-tratamiento (p>0,05 según la prueba exacta de Fisher).

#### 4.3.2. Estudio angiográfico

El estudio angiográfico se realizó con el propósito de corroborar los resultados hemodinámicos desde el punto de vista imagenológico. En la Figura 18 se muestran angiografías representativas de ambos grupos, antes y 30 días después del tratamiento.



**Figura 18. Efecto de la transferencia génica con pVEGF<sub>121</sub> sobre el desarrollo de vasos colaterales en un modelo canino de isquemia de miembros inferiores.** Imágenes angiográficas de un animal del grupo control (A) antes, y (B) 30 días después del tratamiento; y de un animal tratado con pVEGF<sub>121</sub> (C) antes, y (D) 30 días después de la transferencia génica. La flecha indica los vasos colaterales de nueva formación.

En ambos casos, la angiografía previa al tratamiento sirvió como referencia de la angiogénesis fisiológica producida por el estímulo isquémico. Para el grupo placebo no se observó ninguna modificación del cuadro angiográfico a los 30 días (Fig. 18 B) con respecto al observado antes del tratamiento (Fig. 18 A). En contraste, para los animales tratados con pVEGF<sub>121</sub> se observó la aparición de circulación colateral de tipo convergente a los 30 días de la transferencia génica (Fig. 18 D), que no se observa en la angiografía previa al tratamiento (Fig. 18 C).

#### 4.3.3. Estudios hematológicos y observaciones clínicas

Con el objetivo de evaluar los efectos del pVEGF<sub>121</sub> sobre la homeostasia de los animales, se midió un conjunto de variables hematológicas, cuyos valores medios se muestran en la Tabla 9. Todos los parámetros se mantuvieron dentro de los rangos fisiológicos normales de la especie utilizada (Tvedten, 1981). El análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre grupos de tratamiento para las variables evaluadas en ningún momento del estudio ( $p > 0,05$  según el ANOVA paramétrico).

Con respecto a las observaciones clínicas, durante los 30 días de evaluación post-tratamiento no se detectaron reacciones locales en el sitio de administración. Los animales no presentaron cambios en la coloración y apariencia de la piel, el pelo, los ojos, las orejas y las membranas mucosas. La temperatura corporal no presentó alteraciones. No se observaron temblores ni piloerección. En relación con el sistema

circulatorio, no se registraron vasodilatación, vasoconstricción, ni alteraciones del ritmo cardíaco. Tampoco se reportó la ocurrencia de disnea ni de ningún otro signo que denotara afección del sistema respiratorio. La respuesta de los animales ante los estímulos fue adecuada y su comportamiento se mantuvo normal durante todo el estudio.

#### 4.4. EVALUACIÓN DEL VECTOR pVEGF<sub>121</sub> EN UN MODELO PORCINO DE ISQUEMIA DEL MIOCARDIO

Con el propósito de explorar una nueva aplicación terapéutica, el plasmidio pVEGF<sub>121</sub> se ensayó en un modelo porcino de isquemia del miocardio, la cual se indujo quirúrgicamente mediante la colocación de un constrictor Ameroide en la arteria circunfleja (Acápite 3.17.1). Cuatro semanas después de esta intervención, se administraron los tratamientos con pVEGF<sub>121</sub> o placebo a través de una segunda toracotomía (Acápite 3.17.2). La perfusión miocárdica se estudió mediante SPECT gatillado con el radiofármaco <sup>99m</sup>Tc-MIBI (Acápite 3.17.3).

El índice de captación de <sup>99m</sup>Tc-MIBI es un parámetro que permite estudiar la perfusión miocárdica en la zona afectada. La perfusión normal se corresponde con un índice de captación mayor o igual que el 70%. Antes de la inducción de la isquemia, los animales presentaban índices de captación superiores al 80%. Los defectos de perfusión inducidos se clasificaron con respecto a su severidad atendiendo a esta variable, como ligeros (60-69%), moderados (50-59%), o severos (menor que 50%). En la Tabla 10 se presentan los valores individuales del índice de captación de <sup>99m</sup>Tc-MIBI, así como la topografía y severidad de los defectos de perfusión.

**Tabla 10. Caracterización de la perfusión miocárdica de los cerdos antes (Basal) y después (Semana 4) del tratamiento.**

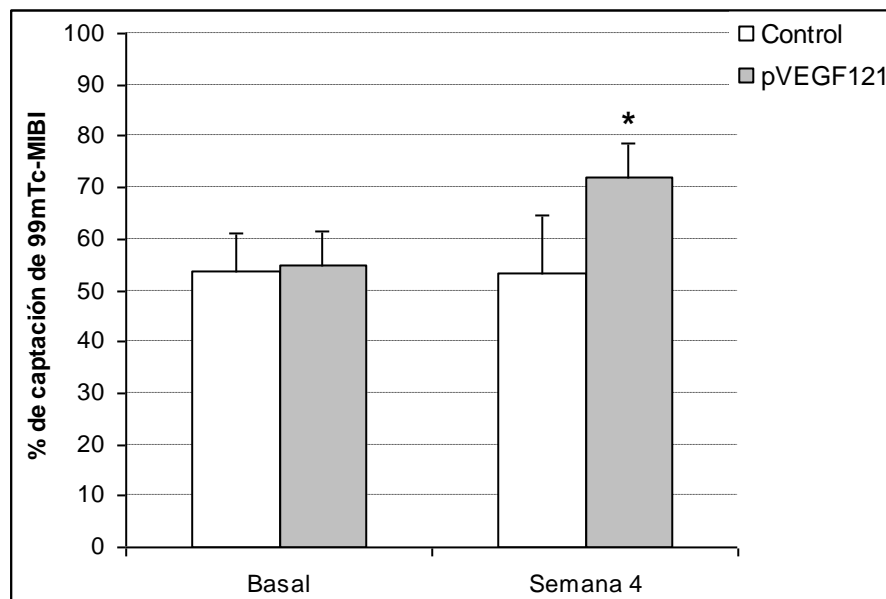
Grupo	Animal No.	Basal		Semana 4	
		IC <sup>99m</sup> Tc-MIBI (%)	Perfusión	IC <sup>99m</sup> Tc-MIBI (%)	Perfusión
Control	02	43,0	Isquemia infero-lateral severa	37,1	Isquemia infero-lateral severa
	05	58,6	Isquemia inferior moderada	56,6	Isquemia inferior moderada
	07	58,6	Isquemia infero-lateral moderada	64,4	Isquemia infero-lateral ligera
	08	54,7	Isquemia infero-lateral moderada	54,5	Isquemia infero-lateral moderada
pVEGF <sub>121</sub>	01	58,6	Isquemia antero-apical moderada	76,2	Perfusión normal
	03	50,8	Isquemia apical ligera Isquemia infero-lateral moderada	80,0	Perfusión normal

	04	44,9	Isquemia inferior severa	62,5	Isquemia inferior ligera
	06	58,6	Isquemia infero-lateral moderada	68,3	Isquemia infero-lateral ligera
	09	60,5	Isquemia infero-lateral ligera	72,3	Perfusión normal

IC: Índice de captación

En el estudio gammagráfico basal (previo al tratamiento), se detectaron defectos de perfusión en todos los animales, (Tabla 10 Basal). Los valores de índice de captación del radiofármaco se comportaron de manera similar para ambos grupos ( $p\text{VEGF}_{121}=54,7\pm 6,62\%$ ; control= $53,7\pm 7,38\%$ ;  $p>0,05$  según la prueba t de Student para datos no pareados) (Fig. 19).

A las 4 semanas de administrados los tratamientos, 3 de los 4 animales controles mantuvieron la severidad de sus defectos de perfusión, y solo uno evolucionó de una isquemia moderada a ligera (Animal No. 07) (Tabla 10). En contraste, de 5 animales que recibieron la terapia génica con  $\text{VEGF}_{121}$ , 3 progresaron hasta una perfusión normal y 2 mostraron disminución en la severidad de sus defectos (Animales No. 04 y 06). En la semana 4, los índices de captación de  $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$  del grupo  $p\text{VEGF}_{121}$  fueron significativamente superiores a los del grupo control ( $p\text{VEGF}_{121}=71,9\pm 6,81\%$ ; control= $53,2\pm 11,52\%$ ;  $p=0,0185$  según la prueba t de Student para datos no pareados) (Fig. 19). La perfusión miocárdica de los animales que recibieron el transgen mejoró en un 35% con respecto a los controles.



**Figura 19.** Efecto de la transferencia génica intramiocárdica de  $\text{VEGF}_{121}$  sobre el índice de captación de  $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$  en el área isquémica de los cerdos. Los datos se expresan como la media  $\pm$  DS de 4



animales para el grupo control, y de 5 animales en el caso del grupo pVEGF<sub>121</sub>. \*  $p < 0,05$  con respecto al grupo control, según la prueba t de Student para datos no pareados; y con respecto al nivel basal, según la prueba t de Student para datos pareados.

Al comparar los índices de captación de <sup>99m</sup>Tc-MIBI a las cuatro semanas con los valores basales, se evidenció un incremento estadísticamente significativo para el grupo pVEGF<sub>121</sub> ( $p = 0,0071$  según la prueba t de Student para datos pareados), a diferencia del grupo control que mantuvo niveles similares antes y después del tratamiento (Fig. 19).

La Figura 20 muestra imágenes gammagráficas representativas de ambos grupos antes y después del tratamiento. Para el grupo control, los defectos de perfusión detectados en el estudio basal (Fig. 20 A) persistieron cuatro semanas después del tratamiento (Fig. 20 B). Por el contrario, en el grupo tratado con pVEGF<sub>121</sub> se observó regresión de las isquemias (Fig. 20 C y D). Las imágenes correspondientes a los restantes animales se muestran en el Anexo 9.

En cuanto a las observaciones clínicas, no se reportaron complicaciones en el período post-quirúrgico. No se detectaron signos de toxicidad durante las 4 semanas de evaluación. Los animales no presentaron cambios en la coloración y apariencia de la piel, el pelo, los ojos, las orejas y las membranas mucosas. La temperatura corporal se mantuvo normal. No se observaron temblores ni piloerección. No se registraron vasodilatación, vasoconstricción, alteraciones del ritmo cardíaco, ni disnea. Los animales mantuvieron una respuesta apropiada ante los estímulos y un comportamiento normal durante todo el estudio.

#### **4.5. APLICACIÓN DEL VECTOR pVEGF<sub>121</sub> A PACIENTES CON CARDIOPATÍA ISQUÉMICA CRÍTICA**

Las primeras evidencias del efecto de la transferencia génica del VEGF<sub>121</sub> en humanos se obtuvieron en el marco de un estudio clínico piloto en pacientes con cardiopatía isquémica crítica, sin opción terapéutica. Este ensayo se desarrolló entre junio de 2004 y agosto de 2005.

##### **4.5.1. Caracterización demográfica y clínica de los pacientes**

En la Tabla 11 se resumen las características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio. La edad promedio fue de  $59,2 \pm 7,11$  años y estuvo en un rango entre 49 y 71 años. Predominaron el sexo masculino (83%) y el color de la piel blanco (67%). De los 6 pacientes incluidos, 5 (83%) habían sufrido infarto agudo del miocardio anteriormente (Tabla 11). Además de este, los antecedentes patológicos personales más frecuentes fueron: el tabaquismo (83%), el estrés (67%) y la hipertensión arterial (50%). Otros factores identificados fueron: la hiperlipidemia (33%), la diabetes mellitus (17%) y el alcoholismo (17%). Todos los pacientes presentaban factores de riesgo que predisponen a la cardiopatía isquémica y a los desórdenes vasculares en general.

En relación con las características clínicas, todos los pacientes incluidos presentaban clasificación funcional III, según la SCC (Anexo 6), y padecían entre 1 y 7 episodios de angina semanales, que cedían al consumo de Nitroglicerina (Tabla 11). Con respecto a la terapia de base, el 100% de los pacientes tenía tratamiento con medicamentos antianginosos y antiagregantes plaquetarios. Otros fármacos indicados fueron los hipotensores (67%) e hipolipemiantes (33%). Un paciente llevaba tratamiento con antiarrítmicos (17%), y otro con diuréticos (17%) e hipoglucemiantes (17%).

#### **4.5.2. Curso operatorio**

Los pacientes se sometieron a una toracotomía para recibir una dosis única de 0,5 mg de pVEGF<sub>121</sub> por vía intramiocárdica en una región isquémica previamente identificada mediante SPECT (Acápite 3.18.4). La Tabla 12 resume la información relacionada con el curso operatorio. La duración de las intervenciones quirúrgicas estuvo en un rango de 50 a 110 min, para un promedio de  $81 \pm 23,3$  min. La inyección intramiocárdica del pVEGF<sub>121</sub> tomó entre 2 y 10 min. La frecuencia cardíaca se mantuvo estable en cuatro de los seis pacientes estudiados, mientras que en los otros dos (HA05 y HA06) se incrementó durante la administración del vector. Tres pacientes mantuvieron una tensión arterial estable, dos (HA03 y HA06) experimentaron hipotensión durante las inyecciones intramiocárdicas, y uno (HA05) tuvo aumento de la tensión arterial. Estas variaciones no resultaron estadísticamente significativas ( $p > 0,05$  según la prueba t de Student para datos pareados).

#### **4.5.3. Evaluación de la seguridad**

Tomando en cuenta que se trata de un ensayo clínico piloto, la seguridad se consideró como la variable principal. Esta evaluación abarcó la seguridad no solo del plasmidio en estudio, sino también del proceder utilizado para su administración. La necesidad de aplicar el vector directamente en el miocardio de los pacientes precisó el empleo de la toracotomía, una técnica quirúrgica invasiva que implica riesgos adicionales. Estos riesgos se acentúan particularmente en pacientes del tipo estudiado, que se encontraban en una fase crítica de la enfermedad, con un sistema cardiovascular muy deteriorado y un delicado estado hemodinámico.

##### **4.5.3.1. Eventos adversos**

El término evento adverso se refiere a cualquier manifestación médica indeseable y no intencionada que se presente en los pacientes, independientemente de su relación de causalidad con el tratamiento en estudio. Los principales eventos adversos que se presentaron a lo largo del estudio para los seis pacientes incluidos fueron dos fallecimientos, antecedidos por infarto del miocardio y *shock* cardiogénico (ver Anexo 4). También ocurrieron tres eventos de arritmia, que consistieron en cambios eléctricos de intensidad leve o moderada. Todos los eventos anteriores

ocurrieron en el curso perioperatorio. Adicionalmente, al mes del tratamiento se presentó un episodio respiratorio de origen alérgico de intensidad moderada.

En la Tabla 13 se muestra la información referida a los eventos adversos de manera individual. Los pacientes HA01, HA02 y HA03 no presentaron eventos adversos durante los 180 días de seguimiento. El paciente HA04 presentó una arritmia (bradicardia) durante el proceso de preparación anestésica, relacionada con una irritación en la colocación del catéter intracoronario. Se le administró atropina y se recuperó rápidamente. A las 12 horas de la intervención quirúrgica sufrió un infarto del miocardio, diafragmático con extensión al ventrículo derecho, no relacionado con el sitio de administración del pVEGF<sub>121</sub>. Posteriormente cayó en *shock* cardiogénico, estado en que se mantuvo hasta su fallecimiento 4 días después de la intervención quirúrgica. La causa de muerte se reportó como complicación isquémica posterior a la cirugía, con una cardiopatía isquémica clase III como enfermedad de base.

**Tabla 13. Eventos adversos de los pacientes tratados con pVEGF<sub>121</sub>.**

Pacientes	Eventos adversos	Intensidad	Causalidad	Resultados
HA01	-	-	-	-
HA02	-	-	-	-
HA03	-	-	-	-
HA04	Arritmia	Moderada	Dudosa	Resuelto
	Infarto del miocardio	Grave	Posible	Peligro para la vida
	<i>Shock</i> cardiogénico	Grave	Posible	Fallecimiento
	Fallecimiento	Grave	Posible	-
HA05	Arritmia	Leve	Posible	Resuelto
	Alergia	Moderada	Dudosa	Resuelto
HA06	Arritmia	Leve	Posible	Resuelto
	Infarto del miocardio	Grave	Posible	Peligro para la vida
	<i>Shock</i> cardiogénico	Grave	Posible	Fallecimiento
	Fallecimiento	Grave	Posible	-

La clasificación de los eventos adversos con respecto a su intensidad, relación de causalidad, y resultado, se describe en el Anexo 8. Los términos médicos se definen en el Anexo 4.

El paciente HA05 sufrió una arritmia (taquicardia) durante la administración del pVEGF<sub>121</sub>, de la cual se recuperó espontáneamente. Al mes del tratamiento presentó un episodio alérgico respiratorio de intensidad moderada, que requirió tratamiento con broncodilatadores y remisión a la consulta de Alergia. Este evento no tuvo relación con el plasmidio en estudio.

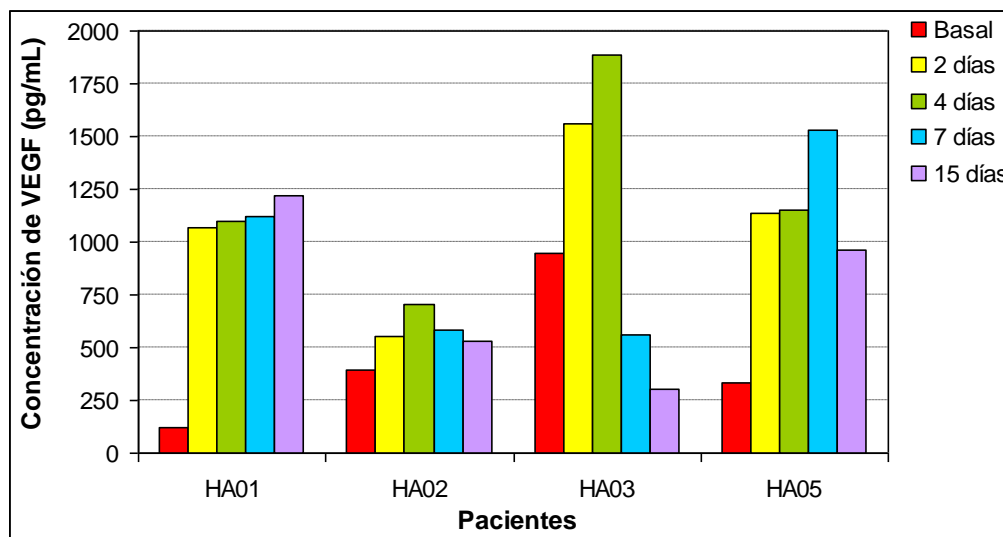
El paciente HA06 también presentó una arritmia (extrasístoles) durante la administración del pVEGF<sub>121</sub>, de la cual se recuperó espontáneamente. Sin embargo, inmediatamente después de concluir el acto quirúrgico sufrió un infarto del miocardio. Consecutivamente, cayó en *shock* cardiogénico y falleció a las 29 horas de la intervención. Como causa de muerte, se reportó infarto del miocardio en el curso post-quirúrgico.

#### 4.5.3.2. Parámetros de laboratorio clínico

Como parte de la evaluación de la seguridad del pVEGF<sub>121</sub>, se midió una serie de parámetros de laboratorio (Acápites 3.18.5.2). En el Anexo 10 se muestran los resultados individuales. Solamente se detectó una alteración en el caso del paciente HA05, que presentó un nivel elevado de eosinófilos a los 30 días del tratamiento, el cual se corresponde con el evento adverso de alergia que se reportó para ese paciente en el mismo momento. Los parámetros restantes se mantuvieron dentro de los rangos no patológicos definidos para cada variable. En ningún caso se encontraron diferencias significativas entre los valores basales y los datos registrados después de la terapia ( $p > 0,05$  según la prueba de Wilcoxon).

#### 4.5.4. Concentración sérica de VEGF

La concentración de VEGF en el suero de los pacientes se determinó mediante un ELISA anti-VEGF (Acápites 3.18.6), como indicador de la ocurrencia de los procesos de transfección y expresión del gen. En la Figura 21 se muestran los resultados de los cuatro pacientes que sobrevivieron.



**Figura 21. Niveles séricos de VEGF de los pacientes tratados con pVEGF<sub>121</sub>.**

Al inicio del ensayo, las concentraciones séricas de VEGF se encontraban en un rango de 124 a 946 pg/mL. Dos días después del tratamiento, los niveles de VEGF se incrementaron entre 1,4 y 8,6 veces con

respecto a los valores basales. En el caso del paciente HA01, la concentración de VEGF en sangre continuó ascendiendo hasta los 15 días, en que se registró su máximo nivel (9,9 veces el valor basal), al menos hasta donde se midió en este ensayo. Los pacientes HA02 y HA03 alcanzaron sus máximas concentraciones de VEGF en sangre a los 4 días (1,8 y 2 veces el valor basal, respectivamente). El paciente HA05 por su parte, alcanzó su máximo nivel a los 7 días de la terapia (4,6 veces el valor basal). Estos incrementos, aunque no fueron estadísticamente significativos ( $p > 0,05$  según la prueba de Wilcoxon), constituyen indicios de la expresión del gen transferido.

Después de alcanzar la máxima concentración, se observó una disminución en los niveles séricos de VEGF de los pacientes HA02 y HA05, aunque sin regresar a su condición inicial (Fig. 21). En el caso del paciente HA03, el nivel de VEGF se redujo por debajo de su valor basal.

#### **4.5.5. Evaluación del efecto terapéutico**

##### **4.5.5.1. Evaluación clínica**

La respuesta clínica de los pacientes a la terapia angiogénica con pVEGF<sub>121</sub> se evaluó atendiendo a la clasificación funcional según la SCC (Anexo 6), al número de episodios de angina, y al consumo de Nitroglicerina. Los cuatro pacientes fueron incluidos en el estudio con clase funcional III (Fig. 22 A). Todos sufrían frecuentes crisis anginosas (3-7 episodios/semana) (Fig. 22 B), que controlaban mediante el consumo de Nitroglicerina (1-14 tabletas/semana) (Fig. 22 C). Al mes del tratamiento, los pacientes HA01 y HA05 mejoraron a clase funcional I, mientras que los otros dos pacientes evolucionaron a clase II (Fig. 22 A). Todos mantuvieron la misma clasificación funcional desde los 30 días hasta la evaluación final a los 180 días.

Los cuatro pacientes experimentaron una drástica reducción en los episodios semanales de angina. Treinta días después de la terapia, tres de ellos estaban libres de angina y solo uno (HA02) refirió haber sufrido una crisis anginosa semanal (Fig. 22 B). El paciente HA01 permaneció libre de angina hasta los 90 días. A los 180 días refirió una crisis anginosa por semana. El paciente HA02 presentó 2-3 episodios semanales de angina desde los 60 hasta los 180 días. El paciente HA03 sufrió una crisis anginosa semanal a los 60 días del tratamiento. No obstante, a partir de los 90 y hasta los 180 días, este paciente se mantuvo libre de angina. El paciente HA05 por su parte, permaneció libre de angina desde los 30 hasta los 180 días.

En correspondencia con lo anterior, el consumo de Nitroglicerina se redujo a cero a los 30 días del tratamiento (Fig. 22 C). Tres de los pacientes se mantuvieron sin consumir el medicamento hasta los 180 días. Solo el paciente HA03 refirió el uso de Nitroglicerina a los 60 días, después de lo cual no volvió a tener necesidad de utilizarla. Debe notarse que después de la terapia los pacientes todavía presentaban algunos episodios de angina. Sin embargo, el consumo de Nitroglicerina se eliminó casi por completo. Esto se traduce en una reducción de la intensidad de la angina, puesto que el dolor cedió al reposo sin necesidad del medicamento, y en ocasiones se limitó a situaciones específicas tales como el período postprandial, ejercicio de cierta intensidad, o estrés emocional.

##### **4.5.5.2. Evaluación de la perfusión miocárdica**

La perfusión miocárdica se evaluó mediante la técnica de SPECT gatillado (Acápite 3.18.7.2), atendiendo fundamentalmente a la extensión y severidad de los defectos isquémicos, ya que el pVEGF<sub>121</sub> no ejerce

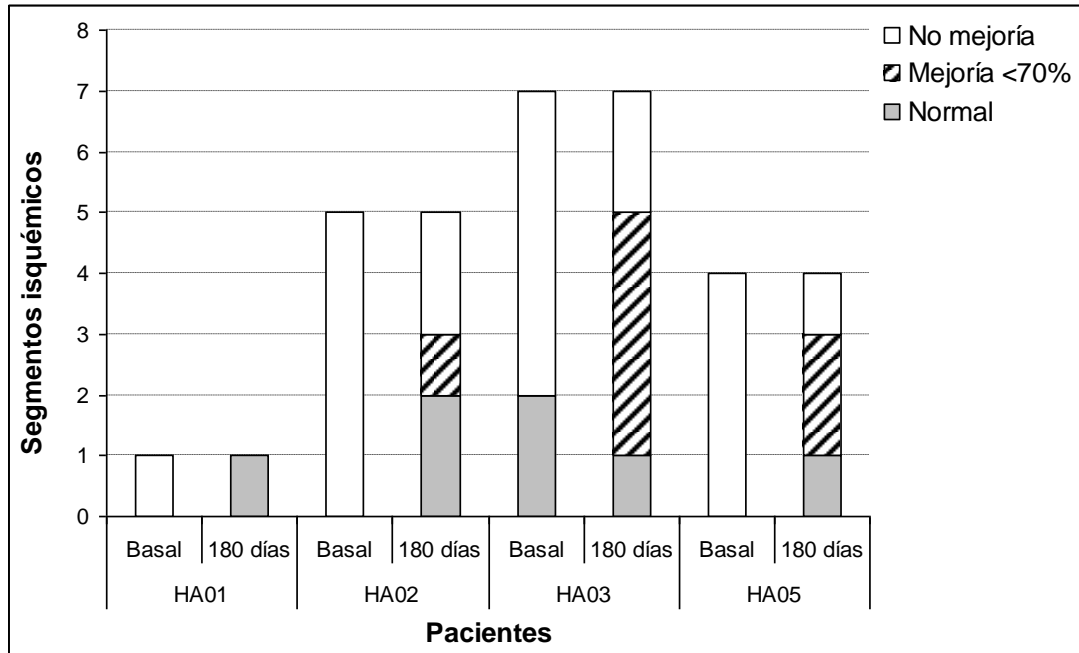
acción terapéutica sobre el tejido necrótico asociado a los infartos sufridos anteriormente por los pacientes. En la Figura 23 se presentan las imágenes gammagráficas de los pacientes antes y después del tratamiento con pVEGF<sub>121</sub>.

En el momento de su inclusión los pacientes HA01 y HA05 presentaban isquemias ligeras de topografía inferior y antero-septal, respectivamente. Ambos pacientes experimentaron regresión parcial de las isquemias a los 180 días del tratamiento. El paciente HA02 comenzó el estudio con una isquemia antero-septal apical ligera a moderada, que en el curso de 180 días evolucionó a una isquemia antero-septal ligera, con recuperación de la perfusión en el ápex. Al inicio del estudio el paciente HA03 presentaba una isquemia inferior severa. A los 180 días de la terapia este defecto había mejorado a ligero. Sin embargo, apareció una nueva isquemia infero-lateral apical ligera, no relacionada con el territorio de administración del pVEGF<sub>121</sub> (Fig. 23 cabeza de flecha).

De manera interesante, 3 de los 4 pacientes estudiados experimentaron mejorías adicionales en la perfusión de regiones no relacionadas con el área de inyección del pVEGF<sub>121</sub> (Fig. 23 flechas). El paciente HA02, inyectado en la zona antero-septal apical, experimentó mejoría en la región inferior media. El paciente HA03, que recibió el tratamiento en la cara inferior, presentó mejoría en las regiones antero-septal basal e infero-lateral basal. El paciente HA05, tratado en el área antero-septal, exhibió mejoría en la perfusión de la región infero-lateral.

Para el análisis de las imágenes gammagráficas, el ventrículo izquierdo se dividió en 17 segmentos. Con el objetivo de estimar la magnitud del efecto ejercido por el pVEGF<sub>121</sub>, el análisis se circunscribió a los segmentos correspondientes a las áreas isquémicas viables. Los segmentos implicados en zonas de infarto no se tuvieron en cuenta puesto que el VEGF no tiene efecto sobre ellos. Además, fueron excluidos los segmentos que presentaban perfusión normal antes de la terapia, excepto en un caso en que esta perfusión disminuyó en el transcurso del ensayo. Los segmentos isquémicos se clasificaron según su evolución a una perfusión normal ( $\geq 70\%$ ), a una perfusión aún defectuosa pero incrementada con respecto a la basal (mejoría  $< 70\%$ ), o a una perfusión sin cambios en relación con la inicial (no mejoría).

Los cuatro pacientes estudiados mostraron algún grado de mejoría en la perfusión de los segmentos isquémicos. En la Figura 24 se presentan los datos correspondientes al inicio y final del ensayo para cada paciente. El paciente HA01 comenzó con un segmento isquémico que a los 180 días tenía perfusión normal. El paciente HA02 fue incluido con 5 segmentos afectados, de los cuales 2 se normalizaron, uno mejoró sin llegar al 70% de perfusión, y los otros 2 permanecieron sin mejoría.



**Figura 24. Cambios en la perfusión de las áreas isquémicas viables después de la terapia génica intramiocárdica con pVEGF<sub>121</sub>.** Los segmentos isquémicos se clasificaron según su evolución a lo largo del estudio. Los datos se expresan como número de segmentos.

En el caso del paciente HA03, al inicio tenía 2 segmentos con perfusión normal, que se tornaron isquémicos (como se describió anteriormente); además de 5 segmentos afectados inicialmente, de los cuales uno se normalizó y los otros 4 tuvieron alguna mejoría sin llegar a la normalidad (Fig. 24). El paciente HA05 comenzó con 4 segmentos isquémicos, de los cuales uno se normalizó, 2 mejoraron sin llegar al 70%, y uno no mejoró.

## 5. DISCUSIÓN

En la presente investigación se abordó la combinación de dos estrategias novedosas: la angiogénesis terapéutica y la terapia génica. Los elementos claves a considerar dentro de este enfoque son el gen terapéutico que se desea transferir y el vector que se utilizará para la transferencia génica. En este trabajo se utilizaron, como gen terapéutico, el que codifica para la isoforma 121 del VEGF; y como vector, el plasmidio pAEC- $\Delta$ 2 (Herrera y cols., 2000).

El VEGF es uno de los factores de crecimiento mejor estudiados en relación con la terapia génica angiogénica. Los genes de las isoformas 121 y 165 han sido los más utilizados en estudios de transferencia génica. Estas isoformas difieren entre sí con respecto a su capacidad de unión a la heparina, su solubilidad, y su afinidad por los co-receptores NP-1 y -2, que amplifican las señales intracelulares (Yla-Herttuala y cols., 2007). El VEGF<sub>121</sub> es un polipéptido débilmente ácido que no se une a la heparina, se encuentra soluble en el medio extracelular, y no tiene afinidad por NP-1 y -2. En contraste, el VEGF<sub>165</sub> es una glicoproteína básica con capacidad de unión a heparina que, aunque se secreta, permanece unida a la superficie celular y a la matriz extracelular en una proporción significativa. Además, el VEGF<sub>165</sub> interactúa con NP-1 y -2.

Sobre la base de la unión a estos co-receptores, algunos autores atribuyen una mayor potencia mitogénica al VEGF<sub>165</sub> en comparación con el VEGF<sub>121</sub> (Ferrara, 2004). Por otra parte, dada la mayor solubilidad del VEGF<sub>121</sub>, cabría esperar una mejor distribución en el tejido isquémico, lo cual favorecería el efecto terapéutico. Sin embargo, en estudios de transferencia génica se ha demostrado que estas isoformas son equivalentes con respecto a su capacidad angiogénica *in vivo* (Takeshita y cols., 1996b; Cherng y cols., 2000).

Se ha observado que la plasmina es capaz de escindir el VEGF<sub>165</sub> y el VEGF<sub>189</sub>, de modo que se liberan fragmentos proteolíticos solubles y activos con una talla similar o menor que la de la isoforma 121 (Lauer y cols., 2002; Gutierrez y cols., 2008). Tomando en cuenta que la cascada proteolítica de activación del plasminógeno juega un papel clave en la angiogénesis (Ebisch y cols., 2008), se ha especulado que estas moléculas similares al VEGF<sub>121</sub> constituyen los mediadores finales de la angiogénesis.

Con relación a los vectores utilizados para la transferencia génica de estas isoformas, el VEGF<sub>121</sub> se ha transferido a los tejidos isquémicos por medio de vectores adenovirales (Rosengart y cols., 1999b; Rajagopalan y cols., 2002; Rajagopalan y cols., 2003; Stewart y cols., 2006). En cambio, la terapia génica con el VEGF<sub>165</sub> se ha realizado mediante vectores plasmídicos desnudos (Kolsut y cols., 2003; Kim y cols., 2004; Kastrup y cols., 2005; Kusumanto y cols., 2006).

En teoría, un vector de terapia génica óptimo debe cumplir múltiples requerimientos relacionados con la seguridad, con la eficiencia de transfección y expresión del transgen, y con el proceso productivo (ver Acápite 2.3.1). En la práctica, no se dispone de este vector ideal. En todo caso, cada tipo de vector tiene sus ventajas y desventajas con respecto a la terapia génica, y corresponde a los investigadores seleccionar el más adecuado a sus fines.

Los vectores adenovirales son  $10^3$ - $10^4$  veces más eficientes (por transgen) que el ADN plasmídico desnudo en la transfección *in vivo* (Crystal y cols., 2002). Sin embargo, la administración de vectores virales puede conducir a una respuesta inmune masiva que a su vez puede provocar una inmunopatología grave, e incluso fatal. La respuesta humana contra los vectores adenovirales presenta una marcada dependencia



de los títulos preexistentes de anticuerpos neutralizantes anti-adenovirus (Harvey y cols., 2002), probablemente debidos a la exposición previa a adenovirus de tipo salvaje de un serotipo similar. Estos anticuerpos pueden reducir significativamente la eficiencia de la transferencia génica. Incluso cuando el vector se administra en cantidades relativamente pequeñas, las proteínas foráneas presentadas por el virus pueden inducir respuestas inmunes capaces de reducir la sensibilidad del receptor a los efectos del transgen. Por tanto, la administración repetida del adenovirus recombinante puede resultar inefectiva. Esta respuesta contra los vectores adenovirales pudiera también mediar la destrucción de las células transfectadas, y provocar inflamación hepática y del miocardio (Epstein y cols., 2001). De hecho, en 1999 la autoridad regulatoria de EE.UU. (*Food & Drug Administration*) interrumpió numerosos ensayos clínicos de terapia génica, al ocurrir la muerte de un paciente de 18 años incluido en un estudio de terapia génica adenoviral en pacientes con deficiencia de ornitina transcarbamilasa (Lehrman, 1999).

A diferencia de los vectores virales, el ADN plasmídico desnudo se caracteriza por su baja inmunogenicidad y por una toxicidad reducida (Muller y cols., 2007). Se ha sugerido que una proporción significativa de la antigenicidad asociada al ADN se le podría atribuir a las histonas (Andreassen y cols., 2002). No obstante, en el caso de los plasmidios generados a partir de *E. coli*, las preparaciones de ADN recombinante no presentan histonas, con lo cual se reduce aún más la probabilidad de una respuesta inmune no deseada. Por otra parte, los vectores plasmídicos permiten la expresión transitoria del gen terapéutico insertado, lo cual es importante desde el punto de vista de la seguridad, ya que la expresión de VEGF a largo plazo podría conducir a una angiogénesis no deseada. Otras ventajas de los vectores plasmídicos son su capacidad de transfectar una amplia variedad de células, y que su purificación se logra mediante una metodología simple y menos costosa que la de los vectores virales (Lyon y cols., 2008). Tomando en cuenta los elementos antes expuestos acerca del gen terapéutico y del vector, se decidió estudiar la transferencia génica del VEGF<sub>121</sub> por medio de un vector plasmídico que, a pesar de su menor eficiencia de transfección, ofrece mayor seguridad para el paciente. Se utilizó específicamente el plasmidio pAEC-Δ2 (Herrera y cols., 2000). Aunque estaba inicialmente concebido para la inmunización con ADN, este vector resulta especialmente atractivo para la transferencia de genes terapéuticos, debido a su diseño compacto y a la ausencia de secuencias homólogas al genoma humano.

El vector pAEC-Δ2 consta de dos bloques funcionales bien definidos: una unidad de transcripción en células de mamíferos, compuesta por el promotor/potenciador de CMV y las señales de procesamiento y poliadenilación del SV40; y otra unidad de replicación/selección en bacteria, formada por el origen de replicación *ColE1* y un gen de resistencia a kanamicina (Herrera y cols., 2000). La unidad de expresión eucariota y el gen de resistencia a kanamicina se encuentran en orientaciones opuestas para evitar la superposición de ambas unidades, con lo cual se logra mayor estabilidad de la información genética eucariota dentro del hospedero bacteriano. Se ha demostrado que el promotor/potenciador de CMV es capaz de inducir una mayor expresión génica en el miocardio de ratas, que el promotor de CMV solamente (sin potenciador), y que otros tres promotores virales y celulares (Jeong y cols., 2002). El pAEC-Δ2 carece de secuencias irrelevantes con respecto al objetivo de la transferencia génica. Este vector tampoco presenta secuencias de homología con el genoma humano, para evitar los eventos de

recombinación homóloga *in vivo*. Dado que el gen del VEGF<sub>121</sub> es un gen propio, su inserción en este vector aportaría una fuente de homología. Sin embargo, el gen clonado es una versión de ADNc del gen original que, al no contener las secuencias correspondientes a los intrones, dificulta el proceso de recombinación homóloga.

Otros grupos de investigación han abordado la transferencia génica del VEGF<sub>165</sub> por medio del vector plasmídico phVEGF<sub>165</sub> (Hedman y cols., 2003; Kastrup y cols., 2005; Kusumanto y cols., 2006). El pAEC-Δ2 posee algunos elementos en común con este vector, como el promotor/potenciador de CMV y las señales de procesamiento y poliadenilación del SV40. El vector phVEGF<sub>165</sub> se deriva del pUC118 (Isner y cols., 1995), de modo que incluye el origen de replicación del bacteriófago filamentosos f1, que constituye una secuencia innecesaria en relación con la transferencia génica. El pAEC-Δ2, derivado del pUC19, no contiene dicho elemento. El phVEGF<sub>165</sub> posee además el origen de replicación del SV40, que incluye una repetición de 72 pb que contribuye a la entrada del ADN plasmídico al núcleo. Esta secuencia, que sí es relevante para la expresión del transgen, tampoco está presente en el pAEC-Δ2.

Otra diferencia entre ambos vectores es el marcador de resistencia a antibiótico. En el caso del phVEGF<sub>165</sub>, porta el gen de resistencia a ampicilina, el cual contiene dos secuencias inmunoestimuladoras o motivos CpG, capaces de potenciar la respuesta inmune contra el agente terapéutico codificado. Estas secuencias pueden mediar respuestas inflamatorias, que a su vez producirían una disminución del efecto terapéutico en términos del nivel y la persistencia de la síntesis proteica, por lo que se consideran inconvenientes con relación a la terapia génica. El gen de resistencia a kanamicina no presenta tales secuencias, de modo que el pAEC-Δ2 resulta ventajoso en este aspecto. Por otra parte, la presencia de trazas de ampicilina en el producto final puede provocar reacciones alérgicas en los pacientes tratados con phVEGF<sub>165</sub>. Estos eventos ocurren con menor frecuencia cuando se utiliza la kanamicina como antibiótico para la selección. Por último, la mayor talla del phVEGF<sub>165</sub> (5651 pb) con respecto al pAEC-Δ2 (4171 pb considerando el vector más el gen del VEGF<sub>165</sub>) implica que, para administrar igual número de moléculas de ADN plasmídico, es necesario aplicar una dosis de phVEGF<sub>165</sub> superior a la de pAEC-Δ2 en un 35%. Todos estos elementos señalan al pAEC-Δ2 como un vector más compacto y más seguro en relación con su posible aplicación en el humano.

Con posterioridad al inicio de la presente investigación se reportó el empleo del vector pCK para transferir el gen del VEGF<sub>165</sub> a pacientes con enfermedad vascular periférica (Kim y cols., 2004). Este vector es muy similar al pAEC-Δ2, con el cual comparte el promotor/potenciador de CMV y el gen de resistencia a kanamicina. Sin embargo, contiene la región 5' no traducida del gen inmediato-temprano de CMV, también conocida como intrón A, que tiene la capacidad de aumentar los niveles de expresión del transgen hasta dos veces. Esta secuencia no se presenta en el pAEC-Δ2. La superioridad del pCK con respecto al pAEC-Δ2 sugiere que los vectores para terapia génica se pueden continuar optimizando para lograr una mayor eficiencia, tanto en la transferencia del gen a las células diana, como en su expresión, con el objetivo final de lograr un efecto terapéutico superior.

El factor limitante asociado al empleo de vectores plasmídicos para la transferencia génica es su baja eficiencia de transfección. A pesar de esta limitación, las características del transgen, la proteína y el tejido diana pueden contribuir a la modulación fenotípica del hospedero. De hecho, se ha demostrado que el VEGF<sub>121</sub> y el VEGF<sub>165</sub> se sintetizan eficientemente (hasta 3 ng/mL de medio) en células de músculo liso vascular, independientemente de la baja eficiencia de transfección (5%) de los vectores plasmídicos utilizados (Dulak y cols., 2000).

La característica del VEGF<sub>121</sub> de ser una proteína secretada y soluble es otro factor que contribuye al éxito de la transferencia génica con ADN desnudo, puesto que el producto génico es capaz de ejercer efectos paracrinos. En un estudio previo con genes reporteros se demostró que las transfecciones con genes de proteínas secretadas, a pesar de ocurrir con baja eficiencia, pueden alcanzar efectos biológicamente significativos, que no se logran con genes de proteínas intracelulares (Losordo y cols., 1994). Por ende, incluso si la transferencia génica del VEGF<sub>121</sub> se limitara a un número relativamente pequeño de células, los niveles de expresión y los efectos paracrinos del producto génico secretado podrían ser suficientes para lograr un efecto biológico relevante.

Otro elemento importante es la especificidad del VEGF por las células endoteliales, dado que sus receptores están restringidos a este tipo de células (Yla-Herttuala y cols., 2007). Por lo tanto, toda la actividad del VEGF se concentra en el elemento celular crítico responsable de la formación de nuevos vasos sanguíneos.

El ambiente isquémico del músculo transfectado es otro factor que favorece la captación del transgen por parte de las células. En estudios previos de transferencia génica intramuscular se ha demostrado que la eficiencia de transfección se incrementa en más de 5 veces cuando el músculo inyectado está isquémico, en comparación con el músculo normoperfundido (Takeshita y cols., 1996a; Tsurumi y cols., 1997).

Además, la isquemia induce la expresión endógena de VEGF en las células endoteliales y regula positivamente los receptores de VEGF en la superficie celular (Ferrara, 2004). La proliferación de las células endoteliales en el territorio isquémico crea nuevos sitios potenciales de síntesis y secreción de VEGF. De esta manera, la isquemia contribuye a amplificar el efecto de una pequeña cantidad de VEGF exógeno.

Por último, el VEGF inhibe la apoptosis (Ruixing y cols., 2007), y media un incremento en las células progenitoras endoteliales circulantes después de la transferencia génica (Kalka y cols., 2000). Tales efectos complementan la acción mitogénica del VEGF, lo cual podría resultar en un incremento adicional en la viabilidad de las células endoteliales.

La clonación del gen del VEGF<sub>121</sub> en el vector pAEC-Δ2 dio lugar a cuatro clones recombinantes denominados pVEGF<sub>121</sub>-1, -2, -3, y -4, cuya identidad se confirmó a través de un análisis de restricción y de la secuenciación del gen de interés. En todos los casos, los patrones de restricción estuvieron en correspondencia con las predicciones teóricas, tanto en el número de bandas como en sus respectivas tallas. Las secuencias obtenidas para los cuatro clones coincidieron totalmente con la reportada (Leung y cols., 1989; Tischer y cols., 1991).

Los clones recombinantes se purificaron a mediana escala con vistas a su caracterización *in vitro*. El juego de reactivos EndoFree Plasmid Mega Kit (Qiagen, Alemania) permite obtener, a nivel de laboratorio, hasta 5 mg de ADN plasmídico por litro de cultivo, con una elevada pureza y libre de endotoxinas (QIAGEN, 2009). Este procedimiento posibilitó la obtención de los plasmidios en preparaciones de alta calidad, óptimas para transfectar células de mamíferos.

La expresión del transgen en los sobrenadantes de cultivo de células CHO-K1 se comportó de manera similar en los cuatro clones recombinantes y fue entre 15 y 20 veces superior a la obtenida para el vector vacío (Fig. 7). Estos resultados evidencian la capacidad de los clones para transfectar células de mamíferos, y sugieren su potencial utilidad para la transfección *in vivo* de las células diana. Los niveles de expresión estuvieron en correspondencia con los reportados por otros investigadores para el plasmidio pVEGF<sub>165</sub> (Hedman y cols., 2003; Kastrup y cols., 2005; Kusumanto y cols., 2006).

Los productos génicos derivados de los cuatro clones recombinantes demostraron ser biológicamente activos en células endoteliales humanas. El VEGF<sub>121</sub> expresado y secretado en los sobrenadantes de cultivo fue capaz de estimular la proliferación de las células HUVEC de manera significativa con respecto al vector pAEC-Δ2 (Fig. 8). En el modelo de angiogénesis *in vitro*, los sobrenadantes derivados de los clones indujeron modificaciones en las células HMEC, con formación de estructuras semejantes a capilares (Fig. 9 A-F). Los clones pVEGF<sub>121</sub>-1, -3, y -4 mostraron efectos significativamente superiores al del vector pAEC-Δ2, a diferencia del clon pVEGF<sub>121</sub>-2, que no se distinguió del vector vacío desde el punto de vista estadístico (Fig. 9 G).

Los resultados indican que la proteína expresada es capaz de mediar no solo la proliferación celular, sino también los drásticos cambios morfológicos y la reorganización celular que se requieren para la formación de nuevos vasos sanguíneos por las células endoteliales *in vivo*.

Una vez demostradas las capacidades proangiogénicas de los clones recombinantes *in vitro*, se pasó a la siguiente etapa experimental, los estudios en animales. En este sentido era necesario disponer de mayores cantidades de ADN plasmídico, que cumpliera con los requerimientos de calidad establecidos para su administración en animales, y posteriormente en humanos. Por este motivo fue preciso trabajar con un solo clon recombinante. Se seleccionó el clon pVEGF<sub>121</sub>-1, sobre la base de sus resultados en los experimentos de expresión génica y actividad biológica, aunque los clones pVEGF<sub>121</sub>-3, y -4 mostraron resultados similares.

El plasmidio pVEGF<sub>121</sub>-1, renombrado pVEGF<sub>121</sub>, se purificó a gran escala a partir de fermentaciones de la cepa DH10B de *E. coli*. El cambio en la temperatura de cultivo de 37°C a 42°C durante la última hora del proceso fermentativo se introdujo con el objetivo de incrementar el número de copias del plasmidio. Se ha reportado que el rendimiento de ADN plasmídico a 42°C puede ser hasta tres veces superior al obtenido a 37°C (Lahijani y cols., 1996). Esta variación de la temperatura no solo incrementa el número de copias, sino que también reduce el contenido de ARN bacteriano y proteínas contaminantes, lo cual tiene gran importancia para el proceso de purificación subsiguiente, y para la calidad de la preparación final de ADN plasmídico.

Los cuatro lotes de pVEGF<sub>121</sub> generados mostraron resultados similares en relación con la concentración de ADN plasmídico, el porcentaje de ADN superenrollado y el contenido de contaminantes, lo que evidencia la reproducibilidad y consistencia del proceso de purificación. Los resultados estuvieron en correspondencia con las especificaciones de calidad definidas para el plasmidio pVEGF<sub>121</sub> (Anexo 3). De esta manera se aseguró que los lotes de pVEGF<sub>121</sub> cumplieran también lo establecido por las autoridades regulatorias a nivel internacional para la administración de ADN plasmídico desnudo en animales y humanos (Voss, 2007).

Se prestó especial atención al porcentaje de ADN superenrollado presente en las preparaciones finales, puesto que es esta la conformación más eficiente en la transfección de las células diana. La presencia de más del 90% de ADN superenrollado garantiza la máxima eficiencia de transfección y contribuye así al efecto terapéutico del vector.

Tomando en cuenta la demostración de la capacidad proangiogénica del plasmidio pVEGF<sub>121</sub> y las evidencias experimentales relativas a la calidad de las preparaciones, se decidió realizar un estudio exploratorio de la toxicidad del vector en animales sanos, como paso previo a su evaluación en modelos animales de enfermedades isquémicas.

Las vías de administración evaluadas (intramuscular e intramúsculo cardiaco) estuvieron en función de los modelos animales que se ensayarían posteriormente (isquemia de miembros inferiores e isquemia del miocardio, respectivamente). Se ha reportado que el músculo estriado es capaz de captar y expresar genes transferidos en forma de ADN plasmídico desnudo (Wolff y cols., 1992). En el caso de la transferencia génica intramiocárdica, se ha demostrado que el miocardio es capaz de captar el ADN más eficientemente que otros tejidos. Se ha documentado que la inyección de genes en el corazón de ratas resulta en niveles de expresión génica hasta 50 veces superiores a los obtenidos en músculo esquelético (Buttrick y cols., 1992). La transferencia génica intramuscular, en comparación con la intraarterial por ejemplo, propicia una menor distribución del plasmidio administrado hacia regiones diferentes del sitio de aplicación.

Las dosis ensayadas fueron lo suficientemente altas (al menos 10 y hasta 30 veces la dosis terapéutica) con el propósito de evaluar los posibles efectos tóxicos que pudiera provocar la administración del vector pVEGF<sub>121</sub> en ratas Sprague-Dawley. La dosis terapéutica correspondiente a cada vía de administración se determinó sobre la base de las dosis administradas a pacientes con enfermedad vascular periférica (Makinen y cols., 2002) y con cardiopatía isquémica (Vale y cols., 2000), respectivamente, en estudios anteriores con plasmidios portadores del gen del VEGF<sub>165</sub>.

El peso corporal y el consumo de alimento son indicadores del estado general de los animales, así como de su bienestar. Los incrementos de peso registrados en todos los grupos se corresponden con las curvas de crecimiento de animales sanos para ambos sexos (Charles River Laboratories, 2008). La disminución en el consumo de alimento de los grupos de animales hembras tratados intramúsculo cardiaco con respecto a los tratados por vía intramuscular, que se observó el día inicial del ensayo (Fig. 12 A), es atribuible al estrés causado por la administración en el corazón, que es más cruenta que la realizada en el músculo esquelético y requiere anestesia (ver Acápite 3.15.1). Este efecto no se observó en los animales del sexo masculino. Esta diferencia entre sexos puede deberse a que las hembras son más sensibles al estrés que los machos (Vidal y Jacob, 1986). En todos los momentos del estudio el comportamiento de los grupos tratados con las diferentes dosis del pVEGF<sub>121</sub> fue similar al de su control correspondiente, lo que indica que la administración del vector no afectó estos parámetros.

El hecho de que no se registraran observaciones clínicas durante todo el experimento en los grupos de tratamiento, es otro hallazgo a favor de la seguridad del vector en estudio. Los hallazgos macroscópicos observados en dos animales del grupo VI (10xDT i.m.c.) a las 48 horas del tratamiento, fueron probablemente consecuencia de fallos en el procedimiento de administración intramúsculo cardiaco.

Dada la baja frecuencia de aparición de estos hallazgos, y el hecho de que no se presentaron en el grupo VII (20xDT i.m.c.), es posible inferir que no están relacionados con el plasmidio administrado.

A nivel microscópico, la reacción inflamatoria intersticial observada a las 48 horas en los grupos tratados con pVEGF<sub>121</sub> por vía intramuscular parece estar relacionada con el tratamiento recibido, puesto que la frecuencia de aparición del evento se incrementó en función de la dosis administrada (Tabla 6). Esta reacción puede ser un resultado de la acción del VEGF<sub>121</sub> expresado por los miocitos transformados. El papel del VEGF como mediador de los mecanismos de inflamación se ha descrito con anterioridad tanto para condiciones fisiológicas (Zittermann y Issekutz, 2006) como para una serie de patologías tales como: colon irritable (Scaldeferri y cols., 2009), inflamación vesical (Saban y cols., 2008), y psoriasis (Simonetti y cols., 2006).

El tejido de cicatrización, acompañado o no por focos de necrosis, se presentó con mayor frecuencia en grupos que recibieron tratamiento con pVEGF<sub>121</sub>: los grupos IV (30xDT i.m.), VI (10xDT i.m.c.) y VII (20xDT i.m.c.) (Tabla 6). Se aprecia cierta tendencia a una relación con el tratamiento en estudio. Sin embargo, el análisis estadístico no confirmó esta observación. Dado que ambos eventos se presentaron en animales del grupo tratado con placebo en el músculo cardiaco, es posible especular que este tejido de cicatrización, aún desorganizado (Fig. 14 E, F), aparezca como mecanismo de reparación del trauma causado por la administración. En este sentido, resulta interesante la diferencia entre los grupos tratados con placebo por vías diferentes: grupo I (i.m.)=0 contra grupo V (i.m.c.)=2. Esto puede estar relacionado con la mayor agresividad del tratamiento intramúsculo cardiaco en comparación con la vía intramuscular. La eosinofilia perivascular y peribronquial se presentó en el grupo III (20xDT i.m.) con una frecuencia significativamente superior a la correspondiente al grupo placebo (Tabla 6). Sin embargo, no se observó en el grupo IV, que recibió la mayor dosis. En la literatura no aparecen reportes que describan al VEGF como agente desencadenante o mediador de los procesos alérgicos. Por el contrario, se reportan niveles elevados de VEGF como consecuencia de enfermedades como la rinitis alérgica y el asma (Yuksel y cols., 2007; Matsune y cols., 2008). Este evento, que también se presentó en los grupos inoculados en el músculo cardiaco, podría tratarse de una reacción alérgica inespecífica durante las primeras horas post-tratamiento. En cuanto a otros hallazgos de menor incidencia, es poco probable que estén relacionados con el vector en estudio.

A los 14 días del tratamiento, los hallazgos microscópicos se limitaron al tejido de cicatrización en el sitio de administración, como respuesta al trauma causado por el procedimiento. La no aparición de otros eventos registrados a las 48 horas evidencia la reversión de efectos tales como la reacción inflamatoria intersticial a células redondas, y la eosinofilia perivascular y peribronquial. En el caso de la necrosis, es posible inferir que el propio tejido de cicatrización, ya maduro y bien definido, haya reemplazado los focos necróticos (Fig. 15 A y B).

El conjunto de resultados de este estudio indica que el vector pVEGF<sub>121</sub> es seguro en ratas Sprague-Dawley cuando se administra por vía intramuscular en dosis hasta 30 veces superiores a la dosis terapéutica, o por vía intramúsculo cardiaco en dosis hasta 20 veces la dosis terapéutica. Sobre esta base, se pasó a la evaluación del vector en modelos animales de enfermedades vasculares isquémicas, con vistas a obtener evidencias del efecto terapéutico de la transferencia génica del VEGF<sub>121</sub>, así como elementos adicionales acerca de su seguridad.

Se utilizaron un modelo canino de isquemia de miembros inferiores y un modelo porcino de isquemia del miocardio. En estos ensayos se mantuvieron las vías de administración intramuscular e intramiocárdica, respectivamente, puesto que constituyen alternativas mucho más eficientes que la vía intravascular con respecto a la transfección y a la angiogénesis en el tejido diana (Yla-Herttuala y cols., 2007). Estas estrategias se caracterizan además, por una menor expresión del transgen en regiones diferentes del sitio de administración, por lo que son más seguras. En el caso del modelo de isquemia de miembros inferiores, la vía intramuscular es menos invasiva que la intraarterial.

Las dosis administradas se seleccionaron tomando en cuenta la experiencia de otros grupos de investigación, que han aplicado la transferencia génica del VEGF<sub>165</sub> por medio de vectores plasmídicos a pacientes con enfermedades vasculares isquémicas. En el caso de la isquemia de miembros inferiores, se reporta que 1,2 mg del plasmidio pVEGF<sub>165</sub> es la mínima dosis efectiva

para una única administración (Shyu y cols., 2003). En otros estudios se ha observado que una dosis de 2 mg de ADN plasmídico es apropiada para lograr mejoría clínica y hemodinámica en pacientes con enfermedad vascular periférica (Makinen y cols., 2002; Kim y cols., 2004).

Con respecto a la isquemia del miocardio, se han ensayado dosis entre 125 µg y 1 mg (Symes y cols., 1999; Sylven y cols., 2001; Kolsut y cols., 2003; Kastrup y cols., 2005). Por otra parte, se han realizado estudios de transferencia génica del VEGF-C en un rango de dosis de 0,2 a 2 mg de ADN plasmídico (Losordo y cols., 2002; Fortuin y cols., 2003; Reilly y cols., 2005). Dado que en estos estudios no se han encontrado diferencias significativas entre dosis, se seleccionó 0,5 mg como una dosis intermedia dentro del rango explorado. En ambos experimentos se utilizó la dosis correspondiente al humano, sobre la base de la demostración de seguridad del vector en dosis hasta 20 veces superiores a la dosis terapéutica.

El empleo del perro Beagle como soporte del modelo de isquemia de miembros inferiores constituye un elemento novedoso, puesto que la especie más comúnmente utilizada en este tipo de experimentos es el conejo. El modelo canino tiene varias ventajas en comparación con el modelo en conejo. En el perro, los vasos sanguíneos se encuentran más accesibles para la disección. El sistema anatómico de los vasos del sector ilíaco e inferiores, permite inducir una isquemia más severa (Rakue y cols., 1998). El perro tiene mayor resistencia que el conejo a la anestesia, a los procedimientos quirúrgicos, y al daño isquémico inherente al modelo. Con respecto a los estudios angiográficos, en el perro es posible localizar el latido de la aorta mediante palpación, sin necesidad de equipamiento de última generación.

Por otra parte, se plantea que la eficiencia de la transferencia génica es inversamente proporcional al tamaño de la especie receptora, debido a las limitaciones que presentan los vectores para distribuirse en grandes volúmenes de tejido (Yla-Herttuala y cols., 2004). Este postulado sugiere que el modelo canino tiene mayor valor predictivo que su similar en conejo, puesto que la talla del perro es más cercana a la del humano. Además, por tratarse de una especie más robusta, el modelo canino resulta ventajoso desde el punto de vista de la homogeneidad y de la reproducibilidad de los resultados.

Este modelo canino de isquemia de miembros inferiores se caracteriza por una reducida presión de oxígeno, lactato venoso femoral incrementado, y necrosis del músculo esquelético. En nuestro ensayo, las extremidades operadas presentaron una disminución promedio de la presión sistólica del 53%, con respecto a las intactas, 10 días después de la intervención quirúrgica.

El sistema circulatorio posee al menos, dos componentes básicos en su segmento arterial: uno correspondiente a la macrocirculación, que incluye los vasos de grande y mediano calibre; y otro que concierne a la microcirculación, relacionado con los pequeños vasos y capilares. El segmento de la macrocirculación cumple, entre otras, las funciones de conducción y amortiguación del flujo sanguíneo; mientras que el segmento microcirculatorio tiene como principal función el intercambio de nutrientes con los tejidos (Rissanen y Yla-Herttuala, 2007). Ambos componentes son necesarios y se complementan entre sí. Se requiere un sistema competente de grandes y medianos vasos para lograr una cantidad y calidad de sangre adecuada en la microcirculación, pero al mismo tiempo una microcirculación eficiente es imprescindible para lograr una óptima nutrición de los tejidos.

El índice de presiones proporciona información acerca del estado de la circulación a nivel de los vasos de grande y mediano calibre. A los 30 días de la transferencia génica, se evidenció un incremento estadísticamente significativo, de 0,23 unidades, en el grupo tratado con pVEGF<sub>121</sub> con respecto al grupo control. En la práctica médica, un incremento del índice de presiones mayor que 0,15 se considera un indicador importante de mejoría clínica (Sontheimer, 2006). El incremento promedio observado a los 30 días post-tratamiento para los animales tratados con pVEGF<sub>121</sub> fue de 0,27 con respecto al nivel basal (Fig. 16), lo cual supera de forma amplia lo aceptado como variación biológicamente relevante. Dicho aumento equivale a una elevación de 20 mm Hg en la presión sistólica de la extremidad, lo cual provoca un efecto notable sobre el flujo arterial por dos vías: directamente por aumento del gradiente de presiones, e indirectamente por los efectos sobre el diámetro arterial. Esto se traduce en una mejoría de alto valor clínico en la circulación de las extremidades tratadas.

El estudio de reserva vasomotora aporta información básica sobre la capacidad de la pequeña circulación tisular de utilizar el aporte de sangre. A pesar de que las diferencias entre grupos de tratamiento no fueron estadísticamente significativas, es importante destacar la relevancia biológica de estos resultados. El hecho de que todos los animales tratados con pVEGF<sub>121</sub> respondieran a la infusión de Nitroglicerina (en contraste con el 50% para el grupo control) indica cierta tendencia hacia un efecto positivo del vector en estudio. Además, las respuestas en el grupo pVEGF<sub>121</sub> fueron parciales en el 33% y totales en el 67% de los animales. Sin embargo, en el grupo control, de 3 animales respondedores, 2 lo hicieron parcialmente (67%) y solo uno (33%) mostró una respuesta total (Fig. 17).

Este hallazgo pudiera tener importantes implicaciones en relación con el establecimiento de una estrategia terapéutica para la isquemia de miembros inferiores. Los resultados sugirieron que el pVEGF<sub>121</sub> es capaz de mejorar las condiciones de disponibilidad de sangre a nivel de los pequeños vasos de la circulación más superficial de la extremidad. Esto pudiera ser de gran importancia en personas con



deficiencias marcadas de la circulación arterial. Las mejorías observadas en el grupo control probablemente se deben a la angiogénesis endógena inducida por la isquemia (Semenza, 2001). Los resultados hemodinámicos fueron confirmados por el estudio angiográfico, donde se obtuvieron evidencias anatómicas de incremento en la circulación colateral de tipo convergente en la extremidad tratada, a los 30 días de la transferencia génica (Fig. 18). Este tipo de circulación se considera la forma más útil de aparición de vasos de neoformación compensatorios.

Los resultados combinados a nivel de macro- y microcirculación, así como las evidencias angiográficas, sugieren que el tratamiento con pVEGF<sub>121</sub> produjo un importante efecto sobre la circulación arterial de los animales tratados. Estos resultados están en concordancia con estudios previos que han aplicado con éxito la transferencia génica intramuscular del VEGF<sub>165</sub> en un modelo de isquemia de miembros inferiores en conejo (Tsurumi y cols., 1996; Tsurumi y cols., 1997). En estos trabajos se reportan incrementos de 0,21-0,24 unidades en el índice de presiones de los animales transfectados con respecto a los controles. En un estudio posterior, se evaluaron los efectos de la transferencia génica del VEGF<sub>165</sub> y del VEGF-B sobre la reserva vasomotora, en un modelo similar (Wright, 2002). El grupo tratado con VEGF<sub>165</sub> exhibió una recuperación significativa de la reserva vasomotora con respecto a su condición inicial. En todos estos trabajos se han obtenido evidencias angiográficas de formación de vasos colaterales.

El modelo porcino de isquemia del miocardio se estableció mediante la técnica del constrictor Ameroide, que produjo una oclusión gradual (2-4 semanas) en la arteria circunfleja proximal. Este método permite el desarrollo de una isquemia crónica en el territorio irrigado por dicha arteria y sus ramas (Harada y cols., 1994). La variabilidad en la topografía y la severidad de las isquemias inducidas (Tabla 10) pudo estar relacionada con las características anatómicas de cada animal y la dominancia de la arteria colapsada con respecto al área muscular irrigada.

Los resultados evidenciaron una notable mejoría en la perfusión miocárdica de los animales tratados con pVEGF<sub>121</sub> en comparación con el grupo control, a las 4 semanas de la transferencia génica (Fig. 20). Esta mejoría se caracterizó por la regresión total o parcial de las isquemias tratadas, y por un incremento estadísticamente significativo en el índice de captación de <sup>99m</sup>Tc-MIBI en el área isquémica.

Estos resultados son consistentes con los obtenidos con el modelo de isquemia de miembros inferiores en perro. Nuestros hallazgos también coinciden con un estudio previo donde se aplicó la administración intramiocárdica de un vector adenoviral portador del gen del VEGF<sub>121</sub> en un modelo similar de isquemia del miocardio (Lee y cols., 2000a). En este trabajo, los defectos de

perfusión inducidos se normalizaron casi completamente a las 4 semanas del tratamiento. El grupo tratado presentó índices de isquemia regional significativamente inferiores a los del grupo control. Asimismo, otros investigadores han documentado mejorías en la perfusión miocárdica como resultado de la transferencia génica del VEGF<sub>165</sub> (Crottogini y cols., 2003) y del VEGF-C (Patila y cols., 2006) por medio de vectores plasmídico y adenoviral, respectivamente.

Desde el punto de vista de la seguridad, el principal problema que plantea la angiogénesis terapéutica es la ocurrencia de una angiogénesis patológica. Se plantea que la angiogénesis patológica está implicada en varias enfermedades, tales como: el crecimiento de tumores (Pradeep y cols., 2005), la degeneración macular (Churchill y cols., 2006), la retinopatía proliferativa diabética (Liinamaa y Savolainen, 2008), y la artritis reumatoide (Malemud, 2007). Para lograr la máxima seguridad en la terapia génica con VEGF, lo ideal sería una expresión génica transitoria y localizada, para garantizar que el organismo receptor no se exponga indefinidamente a altos niveles de VEGF, y evitar la angiogénesis patológica en órganos o tejidos diferentes del sitio de transferencia génica.

El elemento fundamental para lograr una expresión transitoria del transgen radica precisamente en el vector. Los vectores plasmídicos, una vez transferidos a las células diana, permanecen en una forma circular, no integrada y no replicativa (Rodríguez, 2004). La no integración del transgen al genoma garantiza que su expresión sea de relativamente corta duración, pues el ADN plasmídico es desnaturalizado y removido, probablemente por el sistema retículo-endotelial.

La localización de la expresión génica en el tejido diana se puede lograr mediante la selección de una vía de administración adecuada. En nuestro caso, como ya se ha explicado, la administración del vector directamente a los músculos isquémicos dificulta su dispersión en la circulación, y por ende, la expresión del transgen en tejidos u órganos diferentes del sitio de administración.

El producto génico es otro factor que contribuye a la seguridad de la terapia génica. El VEGF posee importantes ventajas en este sentido, tales como su especificidad por las células diana, lo que garantiza que la acción angiogénica se localice en las células endoteliales, y no en otros tejidos. Otra característica es su corto tiempo de vida media en la circulación (~34 min) (Eppler y cols., 2002), que asegura un reducido efecto sistémico.

Las observaciones clínicas en ambos experimentos indican que los tratamientos con el vector pVEGF<sub>121</sub> fueron bien tolerados por los animales de experimentación. Los resultados de los estudios hematológicos en el modelo de isquemia de miembros inferiores, confirman estas observaciones y aportan evidencias en favor de la seguridad del vector. Uno de los eventos adversos más comúnmente asociados a la transferencia génica del VEGF a los miembros inferiores es la ocurrencia de edema (Baumgartner y cols., 2000; Shyu y cols., 2003; Rajagopalan y cols., 2003; Kim y cols., 2004), debido a su actividad estimuladora de la permeabilidad vascular. Sin

embargo, en nuestro estudio no se presentó edema en las extremidades tratadas con pVEGF<sub>121</sub>. Estos hallazgos sugieren que el vector pVEGF<sub>121</sub> posee un marco de seguridad adecuado para su aplicación en humanos.

En resumen, los estudios en animales proporcionan evidencias de que la inyección intramuscular o intramiocárdica del vector pVEGF<sub>121</sub> es un método efectivo y seguro para la transferencia génica del VEGF<sub>121</sub> en modelos animales de isquemia de miembros inferiores e isquemia del miocardio. La transfección *in vivo* del músculo esquelético resultó en un incremento del desarrollo de los vasos colaterales y una mejoría en el déficit hemodinámico y fisiológico inducido por la isquemia. La transferencia génica al miocardio isquémico resultó en una mejoría significativa de la perfusión miocárdica. Estos resultados sugieren la factibilidad de la terapia génica con el vector pVEGF<sub>121</sub> para promover la angiogénesis terapéutica en pacientes con enfermedades vasculares isquémicas.

En paralelo con los ensayos en modelos animales, se realizaron los estudios toxicológicos del vector pVEGF<sub>121</sub> por parte de la Unidad Bioterio del CIGB. En todos los casos, la especie utilizada fue la rata Sprague-Dawley. Se llevaron a cabo dos estudios de tolerancia local, uno con una única administración del vector por las vías intramuscular e intramúsculo cardiaco (Unidad Bioterio CIGB, 2003b), y otro con tres administraciones por vía intramuscular (Unidad Bioterio CIGB, 2003a). Se realizó además, un estudio de toxicidad aguda, con administración por ambas vías (Unidad Bioterio CIGB, 2003c). De manera general, estos ensayos arrojaron que el vector pVEGF<sub>121</sub> no es tóxico y es bien tolerado en las dosis terapéuticas, tanto en el músculo esquelético como en el músculo cardiaco, de modo que cumple con los requerimientos de seguridad necesarios para su empleo en ensayos clínicos. Con posterioridad, se realizó un estudio de toxicidad a dosis repetidas durante 14 días, por vía intramuscular, con similares resultados (Unidad Bioterio CIGB, 2006). A pesar de que estos estudios no forman parte de la tesis en cuestión, es importante tenerlos en cuenta como antecedentes de la siguiente etapa de investigación.

Tomando como base la caracterización biológica *in vitro* del pVEGF<sub>121</sub>, la calidad de las preparaciones del vector, el análisis exploratorio de la toxicidad (además de los ensayos toxicológicos anteriormente mencionados), y los estudios en modelos animales, se obtuvo la autorización del CECMED, como autoridad regulatoria, para realizar un estudio clínico piloto en pacientes con cardiopatía isquémica crítica, refractarios al tratamiento farmacológico, y no candidatos a los procedimientos convencionales de revascularización.

La seguridad se consideró como la variable principal, tomando en cuenta el diseño del estudio. Los principales eventos adversos fueron dos fallecimientos precedidos por infartos agudos del miocardio y *shock* cardiogénico. Para establecer una relación de causalidad con respecto a estos eventos es necesario considerar no solo el vector en estudio, sino también otros factores como el proceder quirúrgico utilizado

para su administración, así como el precario estado de salud de los pacientes, que pudo incrementar aún más el riesgo quirúrgico. Una relación de causalidad “posible” (Anexo 8) se refiere a un evento que muestra una relación temporal razonable con el tratamiento en estudio, que puede o no seguir un patrón de respuesta conocido a la droga ensayada, pero que puede estar producido por otros factores, como los anteriormente mencionados.

La toracotomía realizada para la administración intramiocárdica del pVEGF<sub>121</sub> es un procedimiento invasivo que conlleva la administración de anestésicos y otros riesgos quirúrgicos. Tomando en cuenta el delicado estado hemodinámico de los pacientes y su refractariedad al tratamiento médico convencional, la aplicación de cualquier proceder quirúrgico implica un riesgo importante. Por lo tanto, aunque no existen suficientes elementos para atribuir estos eventos adversos al vector en estudio de manera directa, tampoco es posible afirmar que no tengan relación con el tratamiento aplicado, puesto que la toracotomía también forma parte del tratamiento.

Otros investigadores que han utilizado procedimientos quirúrgicos invasivos para administrar vectores de terapia génica también han registrado eventos adversos graves. En un estudio de administración de un plasmidio portador del gen del VEGF<sub>165</sub> a través de una esternotomía (n=8) se reportó un infarto agudo del miocardio dos días después de la cirugía (Kolsut y cols., 2003). En otro ensayo, en el cual se aplicó la toracotomía para administrar un plasmidio portador del gen del VEGF-C (n=30) se produjo una muerte a las 24 horas del tratamiento, y ocurrieron otros eventos adversos graves como infarto agudo del miocardio (2), fallo cardíaco congestivo (2), y accidente vascular encefálico (1) (Fortuin y cols., 2003). También se han reportado eventos adversos graves en estudios de transferencia génica del VEGF<sub>121</sub> mediada por adenovirus. La administración del vector adenoviral en combinación con una cirugía de revascularización coronaria convencional (n=15) resultó en dos muertes perioperatorias a los 5 y 40 días del tratamiento, respectivamente (Rosengart y cols., 1999b). En el estudio fase II REVASC se administró el mismo vector a través de una mini-toracotomía a 32 pacientes (Stewart y cols., 2006). En este caso se registraron dos muertes precedidas por *shock* cardiogénico perioperatorio a los 2 y 18 días de la intervención, respectivamente.

Los grupos de investigación que han llegado a fases clínicas más avanzadas (II/III) en la administración intramiocárdica de factores de crecimiento han utilizado un sistema de localización electromecánica e inyección por catéter, que permite el acceso al área isquémica por vía transendocárdica, sin necesidad de toracotomía (Losordo y cols., 2002; Kastrup y cols., 2005; Stewart y cols., 2009). Este es un sistema menos invasivo, que no requiere anestesia, sino que se aplica al paciente bajo sedación. En la actualidad no se dispone de esta tecnología en nuestro país por ser altamente costosa. Por lo tanto, se hace necesaria la búsqueda de alternativas que permitan reducir al mínimo los riesgos asociados a los procedimientos de administración.

Otros autores han evaluado el efecto angiogénico del VEGF, combinando la terapia génica con procedimientos de revascularización tales como la ACTP o la cirugía de revascularización coronaria (*bypass*) (Rosengart y cols., 1999b; Hedman y cols., 2003; Kolsut y cols., 2003). En tales casos el paciente debe ser tributario de alguno de estos procedimientos, y los beneficios siempre superan el

riesgo quirúrgico. Sin embargo, esta estrategia no responde al verdadero problema de salud, que está dado precisamente para aquellos pacientes que no son candidatos a esas técnicas de revascularización, y que no responden al tratamiento farmacológico convencional. La única opción de tratamiento para estos pacientes es el trasplante cardíaco, pero esta práctica está limitada por la disponibilidad de donantes, de modo que se prioriza a los pacientes más jóvenes. En consecuencia, este tipo de paciente, que de manera general tiene una edad avanzada, se encuentra sin opción terapéutica y con muy baja calidad de vida.

Entre los eventos adversos atribuibles a la administración intramiocárdica de vectores de terapia génica se encuentran las arritmias ventriculares (Losordo y cols., 1999; Kanemitsu y Komeda, 2006). En este ensayo clínico se registraron tres eventos de arritmia, dos de los cuales se resolvieron espontáneamente, y un tercero que requirió tratamiento farmacológico. En este último caso, la arritmia se produjo antes de la administración del pVEGF<sub>121</sub>, por lo que no se relaciona con el vector ni con su administración.

Como ya se ha discutido, el VEGF está implicado en la patogénesis de la retinopatía proliferativa diabética (Liinamaa y Savolainen, 2008) y en el crecimiento y desarrollo de tumores latentes (Pradeep y cols., 2005). No obstante, durante los 180 días de seguimiento no se registró la aparición de retinopatía ni de tumores en los pacientes tratados, lo cual está en correspondencia con una respuesta angiogénica localizada en el sitio de interés, y con una expresión transitoria del gen transferido.

Para la evaluación de la seguridad de un producto, el análisis de los parámetros de laboratorio clínico tiene una gran importancia, ya que permite detectar cualquier alteración hematológica o bioquímica que se produzca como consecuencia del tratamiento en estudio. En nuestro ensayo solamente se detectó un nivel alterado de eosinófilos en un paciente que presentó un episodio alérgico. El resto de los parámetros permaneció dentro de los rangos no patológicos. Este comportamiento apoya la noción de seguridad del pVEGF<sub>121</sub>, dado que su administración no afectó la homeostasia ni las funciones vitales de los pacientes.

Con relación a la seguridad, se puede resumir lo siguiente: Los eventos adversos graves registrados, aunque no son atribuibles al vector en estudio, sí se relacionan con la toracotomía utilizada para su administración, que es un proceder invasivo. Al evaluar la seguridad del tratamiento como un todo, resulta evidente que es de alto riesgo. Además, los pacientes incluidos en este estudio tenían un gran deterioro de su sistema cardiovascular, lo que incrementó aún más el riesgo de eventos adversos. Con vistas a futuros estudios, es importante valorar la estrategia de administración en función de reducir los riesgos al mínimo posible, tomando en consideración el estado inicial de los pacientes. Adicionalmente, la

administración intramiocárdica del pVEGF<sub>121</sub> estuvo asociada a arritmias ventriculares de intensidad leve, que se resolvieron espontáneamente.

El efecto biológico del ADN plasmídico como vector de terapia génica está mediado por los procesos de transfección de las células diana y expresión del gen transferido. El resultado de estos procesos se puede estimar indirectamente en función del aumento en la concentración del producto génico en sangre. La concentración sérica de VEGF se utilizó en este ensayo como un indicador de la ocurrencia de transfección y expresión del gen del VEGF<sub>121</sub> en el miocardio de los pacientes.

Los pacientes estudiados mostraron una alta variabilidad tanto en los niveles basales, como en la magnitud del incremento en la concentración de VEGF post-tratamiento (Fig. 21). Esto se corresponde con lo reportado por otros investigadores en estudios con el VEGF<sub>165</sub> (Freedman y cols., 2002). No obstante, todos los pacientes experimentaron aumentos notables en sus niveles de VEGF (1,8-9,9 veces con respecto al nivel basal) a partir del segundo día posterior a la transferencia génica, lo que indica que el vector administrado fue capaz de transfectar las células diana y de expresar el transgen.

Sin embargo, es probable que los niveles séricos de VEGF no reflejen con fidelidad las concentraciones locales de VEGF<sub>121</sub> en los sitios de administración del vector. En un modelo porcino de isquemia del miocardio, la inyección intramiocárdica de un plasmidio portador del gen del VEGF<sub>165</sub> resultó en niveles máximos de VEGF en sangre de solo 40 pg/mL (Tio y cols., 1999). Sin embargo, la técnica de *Western blot* de muestras de tejido evidenció fuertes bandas de expresión de VEGF, indicadoras de altas concentraciones en el miocardio, aunque estos niveles de proteína no se cuantificaron. En otro estudio se registraron concentraciones miocárdicas de VEGF de  $2,8 \pm 0,2$  ng/mg de proteína, como consecuencia de la transferencia génica adenoviral del VEGF<sub>121</sub> (Lee y cols., 2000a). En un modelo de isquemia de miembros inferiores en rata, los músculos transfectados con un vector adeno-asociado portador del gen del VEGF<sub>165</sub> se removieron y se cultivaron *ex vivo* (Shimpo y cols., 2002). A las 24 horas, en los sobrenadantes de cultivo se detectaron niveles de VEGF de  $5,3 \pm 1,5$  ng/g de tejido. Sin embargo, las concentraciones séricas de VEGF se mantuvieron por debajo del límite de detección del ensayo (15,6 pg/mL). Otro evento que pudo haber influido en los niveles de VEGF observados es la unión del VEGF<sub>121</sub> liberado en la circulación a receptores solubles de VEGF (Yla-Herttuala y cols., 2007), con la consecuente reducción en los niveles de proteína circulante.

La duración del incremento en la concentración sérica de VEGF tiene implicaciones de seguridad ya que, como se explicó anteriormente, la expresión a largo plazo de altos niveles de VEGF pudiera conducir a una angiogénesis patológica. En tres de los cuatro pacientes estudiados, los niveles séricos de VEGF permanecieron elevados por encima del valor basal durante los 15 días posteriores al tratamiento (Fig. 21); aunque dos de ellos (HA02 y HA05) mostraron una tendencia descendente a los 7 y 15 días. Es posible que el período de medición de 15 días haya resultado insuficiente para comprobar la reducción de la concentración de VEGF hasta el nivel basal. En estudios anteriores de transferencia génica del VEGF<sub>165</sub> por medio de vectores plasmídicos, se cuantificó el VEGF en plasma hasta 30 ó 90 días después del tratamiento (Symes y cols., 1999; Sarkar y cols., 2001), con lo que se demostró que los niveles retornaban a su condición inicial. En consecuencia, con vistas a futuros estudios, sería recomendable medir los niveles séricos de VEGF durante un tiempo más prolongado.

Al abordar la evaluación del efecto terapéutico es necesario tener en cuenta que, por tratarse de un ensayo clínico piloto, los elementos aportados por este estudio son limitados, y en modo alguno concluyentes, con respecto a la efectividad del tratamiento estudiado. El análisis del efecto terapéutico incluyó la evaluación clínica y los estudios de perfusión miocárdica por SPECT. Los pacientes estudiados experimentaron mejoría clínica y regresión parcial de las isquemias tratadas.

El objetivo fundamental de la terapia génica angiogénica con el VEGF<sub>121</sub> es el mejoramiento de los parámetros clínicos de los pacientes. Dada su condición inicial, los cambios en cualquiera de estas variables dan una idea del efecto terapéutico del vector. La mejoría clínica observada en los pacientes se caracterizó por una drástica reducción de los episodios semanales de angina y por ende, del consumo de Nitroglicerina, así como por la mejoría en la clasificación funcional según la SCC (Anexo 6). De cuatro pacientes estudiados, que presentaban clase funcional III en el momento de su inclusión, dos mejoraron a clase I, y los dos restantes progresaron a clase II (Fig. 22 A).

Según la SCC, la clase funcional III implica limitaciones manifiestas en la actividad física ordinaria, puesto que la angina puede aparecer en condiciones normales. En cambio, para los pacientes con clase funcional II la angina aparece en circunstancias particulares que implican un esfuerzo adicional. Estos pacientes presentan una limitación leve de la actividad ordinaria. La clase funcional I por su parte, implica que la actividad física ordinaria no produce angina, y esta solo aparece como consecuencia de ejercicios intensos o prolongados. A la luz de lo anterior, los cuatro pacientes estudiados lograron reducir o eliminar las notables limitaciones que presentaban en la actividad física ordinaria al inicio del estudio, al menos durante los 180 días de seguimiento. Esto tiene importantes implicaciones en la calidad de vida de los pacientes.

De acuerdo con lo esperado, las mejores respuestas al tratamiento coincidieron con los mayores incrementos en los niveles séricos de VEGF con respecto a los valores basales (Figs. 21 y 22). Los pacientes HA01 y HA05, cuyas concentraciones de VEGF en suero aumentaron 9,9 y 4,6 veces, respectivamente, mejoraron de clase funcional III a I. En contraste, los pacientes HA02 y HA03, que mostraron incrementos más discretos (1,8 y 2 veces, respectivamente), solo progresaron hasta la clase II. Una mayor elevación en la concentración de VEGF en sangre se corresponde con un mayor nivel de expresión del transgen en las células diana, y con una mayor actividad angiogénica en el sitio de interés.

Sin embargo, en términos de tiempo, no es posible correlacionar las variables de respuesta al tratamiento con los niveles séricos de VEGF. Las respuestas clínica y de perfusión miocárdica no dependen solo de la disponibilidad de VEGF<sub>121</sub> en el miocardio, sino del desarrollo de vasos sanguíneos colaterales. La angiogénesis terapéutica comprende una cascada de eventos que comienza con la unión del VEGF<sub>121</sub> a sus receptores en la superficie de las células endoteliales. La activación de las células endoteliales, acompañada por la degradación de la matriz extracelular,

conduce a la proliferación, y posteriormente a la migración direccional de dichas células. A continuación ocurre la remodelación de la matriz extracelular para iniciar la formación de una estructura tubular por parte de las células endoteliales. Una vez formado el tubo, ocurre una diferenciación que conduce a la formación del lazo que conecta la región irrigada con la isquémica. Finalmente, el nuevo vaso es estabilizado por células de músculo liso (pericitos) que recubren la capa endotelial (Mulligan-Kehoe y Simons, 2007).

Este complejo proceso toma un mínimo de tres semanas. La expresión génica en cambio, no dura mucho más de dos semanas. En estudios en animales se ha detectado la presencia del ARNm correspondiente al transgen en el tejido diana, entre 3 y 14 días después de la transferencia génica (Tsurumi y cols., 1996; Leong-Poi y cols., 2007). En consecuencia, la máxima expresión de VEGF y su máxima concentración en sangre, se producen mucho antes que la máxima respuesta a la terapia. Es por eso que los niveles séricos de VEGF se midieron entre 2 y 15 días después del tratamiento, mientras que las variables de respuesta se evaluaron a partir de los 30 días.

En el estudio de perfusión miocárdica se evidenció una reducción en la severidad de los defectos isquémicos tratados. La mayoría de los segmentos ventriculares analizados experimentó algún tipo de mejoría en la perfusión (Fig. 24). En adición a las mejorías alcanzadas en las áreas de administración del pVEGF<sub>121</sub>, se observaron incrementos de la perfusión miocárdica en regiones no relacionadas con los sitios de inyección (Fig. 23 flechas). Estos efectos pueden deberse a la conexión de los vasos de nueva formación con redes preexistentes que irrigaban otras áreas del miocardio alejadas del sitio donde se administró el pVEGF<sub>121</sub>, de modo que se mejoró el flujo sanguíneo a esas zonas en adición a la seleccionada por los investigadores. Otra posibilidad es la acción paracrina del VEGF<sub>121</sub> que, una vez expresado y secretado por los cardiomiocitos, pudo estimular la angiogénesis en otras regiones diferentes del sitio de inyección. La aparición de un nuevo defecto de perfusión no relacionado con el territorio de administración del pVEGF<sub>121</sub> (Fig. 23 cabeza de flecha) pudo deberse a la cardiopatía isquémica de base que presenta este tipo de paciente, la cual continúa actuando sobre la vasculatura coronaria independientemente de la terapia aplicada.

Estos resultados están en correspondencia con los obtenidos por otros investigadores que han utilizado vectores plasmídicos para transferir los genes del VEGF<sub>165</sub> (Kolsut y cols., 2003) o del VEGF-C (Fortuin y cols., 2003; Reilly y cols., 2005). En el primer caso se trató a ocho pacientes con una dosis de 0,4 mg del plasmidio por vía intramiocárdica (Kolsut y cols., 2003). A los 6



meses de la cirugía, siete de los ocho pacientes estaban libres de angina. Los sujetos refirieron mejoría en su calidad de vida y disminución en el consumo de Nitroglicerina. Se observó una reducción de los defectos isquémicos según SPECT, y mejoría funcional del ventrículo izquierdo. En el segundo caso, los investigadores estudiaron la administración intramiocárdica de un plasmidio portador del gen del VEGF-C a 30 pacientes. Al año de seguimiento se observaron mejorías en la prueba de ejercicio y en la clase funcional, así como una reducción en el uso de medicamentos (Fortuin y cols., 2003). A los 2 de años, el 88% de los pacientes tratados tenía clase funcional I o II, y solo el 12% tenía clase funcional III (Reilly y cols., 2005).

En resumen, con respecto al efecto terapéutico, se obtuvieron evidencias de mejoría en cuanto a la evaluación clínica y a la perfusión miocárdica de los pacientes. Estos elementos se traducen en un mejor estado de salud, mayor calidad de vida, y mayores posibilidades de sobrevivida para los pacientes. No obstante, es útil reiterar que por tratarse de un ensayo clínico piloto, y por el reducido tamaño de la muestra, no es posible hacer aseveraciones definitivas acerca del efecto terapéutico del vector estudiado.

Además, se debe tener en cuenta que los estudios preclínicos que sustentan los elementos de seguridad y eficacia de los factores de crecimiento para la angiogénesis terapéutica se realizan en animales sanos, jóvenes, sin factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares. En contraste, los pacientes que se escogen en la práctica clínica para estos tratamientos son personas de edad avanzada, con múltiples antecedentes patológicos personales y un gran deterioro de su sistema cardiovascular y de su salud en general (Lekas y cols., 2006).

Con posterioridad a la conclusión del estudio clínico, se contactó a los pacientes, y se conoció que los cuatro continuaban vivos dos años después del tratamiento con pVEGF<sub>121</sub>. Dos de ellos mantenían un estado de salud similar al que presentaban al final del estudio, y los dos restantes habían recaído con las crisis anginosas propias de su enfermedad de base. Esta información resulta relevante tomando en cuenta que en el momento del diagnóstico, a estos pacientes se les pronosticaba menos de un año de vida. A pesar de que el concepto de la terapia génica con el pVEGF<sub>121</sub> se demostró en modelos animales de isquemia de miembros inferiores e isquemia del miocardio, la evaluación clínica solo se llevó a cabo en pacientes con cardiopatía isquémica. Sin embargo, los experimentos que conforman esta tesis sientan las bases para realizar un estudio clínico fase I en pacientes con enfermedad vascular periférica. Esta aplicación resulta particularmente relevante para pacientes refractarios al tratamiento farmacológico, no candidatos a los procedimientos de revascularización quirúrgicos o endovasculares, y que se encuentran en riesgo de sufrir la amputación de una extremidad.

La terapia génica con VEGF aplicada al tratamiento de las enfermedades vasculares isquémicas ha sido objeto de exhaustivas investigaciones. Numerosos estudios en modelos animales han probado su eficacia, y los estudios clínicos fase I han demostrado su seguridad. De manera general, estos ensayos fase I no controlados han reportado resultados alentadores (ver Acápites 2.3.3.2 y 2.3.3.4 de la Revisión Bibliográfica). Por el contrario, en la mayoría de los estudios fase II/III aleatorizados y controlados, no se

observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratado y control para las variables principales (Tablas 2 y 3). No obstante, algunas variables secundarias tales como: la condición clínica, el índice de presiones tobillo/brazo (Kusumanto y cols., 2006) y la función ventricular (Kastrup y cols., 2005); sí han mostrado mejoría significativa en el grupo tratado con respecto al grupo control.

El análisis conduce a la evaluación del diseño de los ensayos y también, una vez más, al problema de la selección de los pacientes. Es posible que la terapia génica angiogénica no sea tan efectiva en pacientes de edad avanzada como en los animales jóvenes utilizados en los estudios preclínicos. El principal problema con relación al tejido isquémico pudiera no ser solo la disponibilidad de factores de crecimiento, sino también los defectos en la capacidad de respuesta a los estímulos angiogénicos debidos a una severa aterosclerosis (Khurana y Simons, 2007). Sin embargo, el hecho de que la formación natural de vasos colaterales es capaz de rescatar el miocardio y los miembros inferiores isquémicos en pacientes ancianos, apoya la validez del concepto de angiogénesis terapéutica. Las fallas terapéuticas deben estar más probablemente relacionadas con problemas técnicos o farmacológicos en las estrategias actuales de tratamiento.

Las estrategias futuras de angiogénesis terapéutica apuntan a la estimulación conjunta de la angiogénesis y la arteriogénesis para el tratamiento de las enfermedades vasculares isquémicas. La neovascularización del músculo isquémico requiere la coordinación de ambos procesos (Lahtenvuuo y cols., 2009). Los vasos neoformados en el proceso de angiogénesis, a partir de los preexistentes en el tejido isquémico, no son robustos y a la larga terminan afectados por todos los factores de riesgo que acompañan a las enfermedades vasculares.

La arteriogénesis es el desarrollo o alargamiento de arteriolas colaterales en respuesta adaptativa a la oclusión arterial por un proceso *de novo* a partir de los precursores endoteliales circulantes. A diferencia de la angiogénesis, no existe isquemia en el tejido donde ocurre y no se induce por la hipoxia (Gaffney y cols., 2007). La arteriogénesis ocurre en regiones proximales con respecto al tejido que está en angiogénesis activa (Scholz y cols., 2002). Varios factores parecen tener este efecto: Ang-1 (Siddiqui y cols., 2003), proteína quimioatrayente de los monocitos (MCP) -1 (Muhs y cols., 2004), TGF- $\beta$  (van Royen y cols., 2002), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (Buschmann y cols., 2003), FGF-1 y -2 (Deindl y cols., 2003), y PDGF-BB (Cao y cols., 2003; de Paula y cols., 2009). Las estrategias de administración combinada de factores que estimulen la arteriogénesis y la angiogénesis podrían ser más exitosas (Schaper y Scholz, 2003).

Resulta especialmente interesante un estudio de Whitlock y colaboradores, en el cual se diseñó un vector adenoviral portador de un gen híbrido (ADNc/genómico) del VEGF, capaz de expresar las isoformas 121, 165 y 189 en una proporción 2:2:1. En un modelo murino de isquemia de miembros inferiores, este vector resultó 100 veces más potente que otros similares que expresaban las isoformas individuales (Whitlock y cols., 2004). Estos resultados sugieren que las isoformas del VEGF funcionan de manera sinérgica.

La terapia que utiliza células progenitoras endoteliales circulantes se ha sugerido como perspectiva de tratamiento, ya que estas células podrían, además de recuperar el endotelio después de una lesión, tomar parte en la angiogénesis (Shantsila y cols., 2007; Mendoza, 2007). En modelos animales de infarto del miocardio, cuando se administraron células progenitoras endoteliales, se indujo una neovascularización significativa y una reducción de la apoptosis, con mejoría de la función cardíaca (Khurana y Simons, 2007). Se conoce que las diferentes subpoblaciones derivadas de la médula ósea secretan factores angiogénicos tales como: VEGF, FGF, Ang-1 y HGF; los cuales juegan un papel vital en la neovascularización. Estos

efectos cardioprotectores y el grado de neovascularización dependen del número de células liberadas (Ang y cols., 2006).

Con relación a la terapia celular, es importante hacer referencia a las primeras experiencias de este tipo en nuestro país, llevadas a cabo en el Instituto de Hematología e Inmunología y en el Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. En un primer estudio se obtuvieron evidencias de la efectividad del trasplante de células mononucleares de la médula ósea autólogas en pacientes con infarto del miocardio e insuficiencia cardíaca crónica severa, mediante técnicas de cardiología nuclear (Peix y cols., 2006). En ensayos clínicos más recientes se estimó la seguridad y eficacia de la implantación de células mononucleares procedentes de la médula ósea o de sangre periférica, en las extremidades isquémicas para el tratamiento de la enfermedad vascular periférica (Hernandez y cols., 2007a; Hernandez y cols., 2007b).

La terapia génica angiogénica constituye un área de investigación aún joven, que enfrenta los retos inherentes a toda estrategia terapéutica novedosa. La presente investigación recoge los primeros estudios de terapia génica realizados en Cuba, lo que ubica a nuestro país entre los pioneros en este campo de la investigación científica. Las investigaciones futuras abrirán nuevas posibilidades para abordar la angiogénesis terapéutica de manera exitosa.

## 6. CONCLUSIONES

1. El vector plasmídico pVEGF<sub>121</sub> es capaz de transfectar células de mamíferos y de expresar el transgen. El producto génico tiene actividad proangiogénica *in vitro*. Las preparaciones finales satisfacen los parámetros de calidad establecidos para su administración en animales y humanos. Por tanto, este plasmidio cumple con los requerimientos esenciales para promover la angiogénesis terapéutica en modelos animales de enfermedades isquémicas.
2. La administración aguda del vector pVEGF<sub>121</sub> por vía intramuscular e intramúsculo cardiaco es segura y bien tolerada en ratas Sprague-Dawley, lo que indica que este plasmidio posee un marco de seguridad adecuado para su aplicación en modelos animales.
3. El vector pVEGF<sub>121</sub>, administrado en modelos animales de isquemia de miembros inferiores e isquemia del miocardio, produce un incremento en la perfusión de los tejidos tratados, capaz de conducir a la regresión parcial o total de las isquemias inducidas. Por consiguiente, este plasmidio es potencialmente útil para el tratamiento de pacientes con enfermedad vascular periférica o cardiopatía isquémica.
4. La administración intramiocárdica del vector pVEGF<sub>121</sub> a pacientes con cardiopatía isquémica crítica induce una elevación en los niveles séricos de VEGF, que indica la ocurrencia de los procesos de transfección y expresión del transgen. Aunque la toracotomía, como estrategia de administración, no es lo suficientemente segura para este tipo de paciente; la transferencia génica del VEGF<sub>121</sub> es capaz de mejorar el estado clínico y la perfusión miocárdica, lo que repercute favorablemente sobre la calidad de vida de los pacientes.

## **7. RECOMENDACIONES**

1. Establecer un sistema de localización del área isquémica y administración por catéter con vistas a futuros ensayos clínicos con el pVEGF<sub>121</sub> u otros agentes similares. Esta metodología permitirá realizar las inyecciones intramiocárdicas por vía transendocárdica, sin necesidad de toracotomía, de modo que se eliminará el riesgo de eventos adversos graves asociados al proceder quirúrgico.
2. En futuros ensayos clínicos con el pVEGF<sub>121</sub>, extender el período de medición de la concentración sérica de VEGF durante al menos 90 días después del tratamiento, para verificar si disminuye hasta el nivel basal. Esto permitirá asegurar que el paciente no se expone a concentraciones elevadas de VEGF por tiempo indefinido.
3. Realizar un ensayo clínico fase I de administración del pVEGF<sub>121</sub> a pacientes con enfermedad vascular periférica, para evaluar la seguridad del vector y su efecto terapéutico en relación con esta patología.
4. Diseñar, construir y evaluar un vector para terapia génica que permita la transferencia génica combinada de varios factores de crecimiento para estimular la angiogénesis y la arteriogénesis.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achen,M.G., Jeltsch,M., Kukk,E., Makinen,T., Vitali,A., Wilks,A.F., Alitalo,K., y Stacker,S.A. (1998). Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 548-553.
- Allen,J. (2007). Photoplethysmography and its application in clinical physiological measurement. *Physiol Meas.* 28, R1-39.
- Amano,H., Hayashi,I., Endo,H., Kitasato,H., Yamashina,S., Maruyama,T., Kobayashi,M., Satoh,K., Narita,M., Sugimoto,Y., Murata,T., Yoshimura,H., Narumiya,S., y Majima,M. (2003). Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J. Exp. Med.* 197, 221-232.
- Andreassen,K., Bendiksen,S., Kjeldsen,E., Van Ghelue,M., Moens,U., Arnesen,E., y Rekvig,O.P. (2002). T cell autoimmunity to histones and nucleosomes is a latent property of the normal immune system. *Arthritis Rheum.* 46, 1270-1281.
- Ang,K.L., Shenje,L.T., Srinivasan,L., y Galinanes,M. (2006). Repair of the damaged heart by bone marrow cells: from experimental evidence to clinical hope. *Ann. Thorac. Surg.* 82, 1549-1558.
- Asociación Médica Mundial (2008). Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. *Asociación Médica Mundial* <http://www.wma.net/s/policy/b3.htm>.
- Baker,A.H. (2004). Designing gene delivery vectors for cardiovascular gene therapy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 84, 279-299.
- Baldwin,M.E., Halford,M.M., Roufail,S., Williams,R.A., Hibbs,M.L., Grail,D., Kubo,H., Stacker,S.A., y Achen,M.G. (2005). Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol. Cell Biol.* 25, 2441-2449.
- Bates,D.O., Cui,T.G., Doughty,J.M., Winkler,M., Sugiono,M., Shields,J.D., Peat,D., Gillatt,D., y Harper,S.J. (2002). VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 62, 4123-4131.
- Baumgartner,I., Pieczek,A., Manor,O., Blair,R., Kearney,M., Walsh,K., y Isner,J.M. (1998). Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 97, 1114-1123.
- Baumgartner,I., Rauh,G., Pieczek,A., Wuensch,D., Magner,M., Kearney,M., Schainfeld,R., y Isner,J.M. (2000). Lower-extremity edema associated with gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor. *Ann. Intern. Med.* 132, 880-884.
- Bayne,K. (1998). Developing guidelines on the care and use of animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 862, 105-110.
- Benelli,R. y Albini,A. (1999). In vitro models of angiogenesis: the use of Matrigel. *Int. J. Biol. Markers* 14, 243-246.
- Benjamin,L.E., Golijanin,D., Itin,A., Pode,D., y Keshet,E. (1999). Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J. Clin. Invest* 103, 159-165.
- Berliner,J.A., Subbanagounder,G., Leitinger,N., Watson,A.D., y Vora,D. (2001). Evidence for a role of phospholipid oxidation products in atherogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* 11, 142-147.
- Bogdanov,V.Y., Balasubramanian,V., Hathcock,J., Vele,O., Lieb,M., y Nemerson,Y. (2003). Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat. Med.* 9, 458-462.

- Boussif,O., Lezoualc'h,F., Zanta,M.A., Mergny,M.D., Scherman,D., Demeneix,B., y Behr,J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 7297-7301.
- Brasen,J.H., Kivela,A., Roser,K., Rissanen,T.T., Niemi,M., Luft,F.C., Donath,K., y Yla-Herttuala,S. (2001). Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor-BB expression, iron deposition, and oxidation-specific epitopes in stented human coronary arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1720-1726.
- Broxmeyer,H.E., Cooper,S., Li,Z.H., Lu,L., Song,H.Y., Kwon,B.S., Warren,R.E., y Donner,D.B. (1995). Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *Int. J. Hematol.* 62, 203-215.
- Bull,D.A., Bailey,S.H., Rentz,J.J., Zebrack,J.S., Lee,M., Litwin,S.E., y Kim,S.W. (2003). Effect of Terplex/VEGF-165 gene therapy on left ventricular function and structure following myocardial infarction. VEGF gene therapy for myocardial infarction. *J. Control Release* 93, 175-181.
- Buschmann,I.R., Busch,H.J., Mies,G., y Hossmann,K.A. (2003). Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation* 108, 610-615.
- Buttrick,P.M., Kass,A., Kitsis,R.N., Kaplan,M.L., y Leinwand,L.A. (1992). Behavior of genes directly injected into the rat heart in vivo. *Circ. Res.* 70, 193-198.
- Byzova,T.V., Goldman,C.K., Pampori,N., Thomas,K.A., Bett,A., Shattil,S.J., y Plow,E.F. (2000). A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol. Cell* 6, 851-860.
- Cao,R., Brakenhielm,E., Pawliuk,R., Wariaro,D., Post,M.J., Wahlberg,E., Leboulch,P., y Cao,Y. (2003). Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat. Med.* 9, 604-613.
- CECMED (2000). Guía de Buenas Prácticas Clínicas. *CECMED* <http://www.cecmec.sld.cu>.
- Celletti,F.L., Waugh,J.M., Amabile,P.G., Brendolan,A., Hilfiker,P.R., y Dake,M.D. (2001). Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat. Med.* 7, 425-429.
- Chang,D.S., Su,H., Tang,G.L., Brevetti,L.S., Sarkar,R., Wang,R., Kan,Y.W., y Messina,L.M. (2003). Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer of VEGF normalizes skeletal muscle oxygen tension and induces arteriogenesis in ischemic rat hindlimb. *Mol. Ther.* 7, 44-51.
- Charles River Laboratories (2008). Products and Services. *Charles River Laboratories* <http://www.criver.com/en-US/ProdServ/Pages/ProductsServices.aspx>.
- Chekanov,V.S., Rayel,R., Nikolaychik,V., Kipshidze,N., Baibekov,I., Karakozov,P., Bajwa,T., y Akhtar,M. (2002). Direct fibrin injection to promote new collateral growth in hind limb ischemia in a rabbit model. *J. Card Surg.* 17, 502-511.
- Cherng,J.M., Lin,C.M., Lin,C.L., Huang,S.M., Chang,H.L., Lee,C.C., Chiang,L.C., y Chang,P.Y. (2000). Effects of VEGF121 and/or VEGF165 gene transfection on collateral circulation development. *J. Formos. Med. Assoc.* 99, 603-611.
- Churchill,A.J., Carter,J.G., Lovell,H.C., Ramsden,C., Turner,S.J., Yeung,A., Escardo,J., y Atan,D. (2006). VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. *Hum. Mol. Genet.* 15, 2955-2961.
- Ciancaglini,C.E. (2005). La isquemia crónica de los miembros inferiores (ICMI): Epidemiología, diagnóstico no invasivo, y significado clínico. *Federación Argentina de Cardiología* <http://www.fac.org.ar>.

Clauss,M., Gerlach,M., Gerlach,H., Brett,J., Wang,F., Familletti,P.C., Pan,Y.C., Olander,J.V., Connolly,D.T., y Stern,D. (1990). Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J. Exp. Med.* 172, 1535-1545.

Connolly,D.T., Olander,J.V., Heuvelman,D., Nelson,R., Monsell,R., Siegel,N., Haymore,B.L., Leimgruber,R., y Feder,J. (1989). Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J. Biol. Chem.* 264, 20017-20024.

Corautus Genetics (2006). Corautus announces termination of patient enrollment in GENASIS severe angina clinical trial. *Corautus Genetics* <http://www.corautus.com>.

Crottogini,A., Meckert,P.C., Vera,J.G., Lascano,E., Negroni,J., Del Valle,H., Dulbecco,E., Werba,P., Cuniberti,L., Martinez,V., De Lorenzi,A., Telayna,J., Mele,A., Fernandez,J.L., Marangunich,L., Criscuolo,M., Capogrossi,M.C., y Laguens,R. (2003). Arteriogenesis induced by intramyocardial vascular endothelial growth factor 165 gene transfer in chronically ischemic pigs. *Hum. Gene Ther.* 14, 1307-1318.

Crystal,R.G., Harvey,B.G., Wisnivesky,J.P., O'Donoghue,K.A., Chu,K.W., Maroni,J., Muscat,J.C., Pippo,A.L., Wright,C.E., Kaner,R.J., Leopold,P.L., Kessler,P.D., Rasmussen,H.S., Rosengart,T.K., y Hollmann,C. (2002). Analysis of risk factors for local delivery of low- and intermediate-dose adenovirus gene transfer vectors to individuals with a spectrum of comorbid conditions. *Hum. Gene Ther.* 13, 65-100.

Davis-Smyth,T., Presta,L.G., y Ferrara,N. (1998). Mapping the charged residues in the second immunoglobulin-like domain of the vascular endothelial growth factor/placenta growth factor receptor Flt-1 required for binding and structural stability. *J. Biol. Chem.* 273, 3216-3222.

de Paula,E.V., Flores-Nascimento,M.C., Arruda,V.R., Garcia,R.A., Ramos,C.D., Guillaumon,A.T., y Annichino-Bizzacchi,J.M. (2009). Dual gene transfer of fibroblast growth factor-2 and platelet derived growth factor-BB using plasmid deoxyribonucleic acid promotes effective angiogenesis and arteriogenesis in a rodent model of hindlimb ischemia. *Transl. Res.* 153, 232-239.

De Vries,C., Escobedo,J.A., Ueno,H., Houck,K., Ferrara,N., y Williams,L.T. (1992). The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255, 989-991.

Dean,D.A. (2003). Electroporation of the vasculature and the lung. *DNA Cell Biol.* 22, 797-806.

Deindl,E., Hoefler,I.E., Fernandez,B., Barancik,M., Heil,M., Strniskova,M., y Schaper,W. (2003). Involvement of the fibroblast growth factor system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis. *Circ. Res.* 92, 561-568.

Deiner,C., Schwimmbeck,P.L., Koehler,I.S., Loddenkemper,C., Noutsias,M., Nikol,S., Schultheiss,H.P., Yla-Herttuala,S., y Pels,K. (2006). Adventitial VEGF165 gene transfer prevents lumen loss through induction of positive arterial remodeling after PTCA in porcine coronary arteries. *Atherosclerosis* 189, 123-132.

Demer,L.L. (2002). Vascular calcification and osteoporosis: inflammatory responses to oxidized lipids. *Int. J. Epidemiol.* 31, 737-741.

Dulak,J., Jozkowicz,A., Ratajska,A., Szuba,A., Cooke,J.P., y Dembinska-Kiec,A. (2000). Vascular endothelial growth factor is efficiently synthesized in spite of low transfection efficiency of pSG5VEGF plasmids in vascular smooth muscle cells. *Vasc. Med.* 5, 33-40.

Durfee,T., Nelson,R., Baldwin,S., Plunkett,G., III, Burland,V., Mau,B., Petrosino,J.F., Qin,X., Muzny,D.M., Ayele,M., Gibbs,R.A., Csorgo,B., Posfai,G., Weinstock,G.M., y Blattner,F.R. (2008). The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J. Bacteriol.* 190, 2597-2606.

Ebisch,I.M., Thomas,C.M., Wetzels,A.M., Willemsen,W.N., Sweep,F.C., y Steegers-Theunissen,R.P. (2008). Review of the role of the plasminogen activator system and vascular endothelial growth factor in subfertility. *Fertil. Steril.*



- Eliceiri,B.P., Paul,R., Schwartzberg,P.L., Hood,J.D., Leng,J., y Cheresh,D.A. (1999). Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol. Cell* 4, 915-924.
- Eppler,S.M., Combs,D.L., Henry,T.D., Lopez,J.J., Ellis,S.G., Yi,J.H., Annex,B.H., McCluskey,E.R., y Zioncheck,T.F. (2002). A target-mediated model to describe the pharmacokinetics and hemodynamic effects of recombinant human vascular endothelial growth factor in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 72, 20-32.
- Epstein,S.E., Fuchs,S., Zhou,Y.F., Baffour,R., y Kornowski,R. (2001). Therapeutic interventions for enhancing collateral development by administration of growth factors: basic principles, early results and potential hazards. *Cardiovasc. Res.* 49, 532-542.
- Esser,S., Wolburg,K., Wolburg,H., Breier,G., Kurzchalia,T., y Risau,W. (1998). Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J. Cell Biol.* 140, 947-959.
- Ferrara,N. (2007). Vascular endothelial growth factor: pathophysiology and clinical implications. In *Angiogenesis : from basic science to clinical applications*, N.Ferrara, ed. (Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group), pp. 1-36.
- Ferrara,N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* 25, 581-611.
- Ferrara,N., Carver-Moore,K., Chen,H., Dowd,M., Lu,L., O'Shea,K.S., Powell-Braxton,L., Hillan,K.J., y Moore,M.W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442.
- Ferrara,N., Chen,H., Davis-Smyth,T., Gerber,H.P., Nguyen,T.N., Peers,D., Chisholm,V., Hillan,K.J., y Schwall,R.H. (1998). Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat. Med.* 4, 336-340.
- Ferrara,N. y Henzel,W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 851-858.
- Fong,G.H., Zhang,L., Bryce,D.M., y Peng,J. (1999). Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* 126, 3015-3025.
- Fortuin,F.D., Vale,P., Losordo,D.W., Symes,J., DeLaria,G.A., Tyner,J.J., Schaer,G.L., March,R., Snell,R.J., Henry,T.D., Van Camp,J., Lopez,J.J., Richenbacher,W., Isner,J.M., y Schatz,R.A. (2003). One-year follow-up of direct myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor-2 using naked plasmid deoxyribonucleic acid by way of thoracotomy in no-option patients. *Am. J. Cardiol.* 92, 436-439.
- Freedman,S.B., Vale,P., Kalka,C., Kearney,M., Pieczek,A., Symes,J., Losordo,D., y Isner,J.M. (2002). Plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) levels after intramuscular and intramyocardial gene transfer of VEGF-1 plasmid DNA. *Hum. Gene Ther.* 13, 1595-1603.
- Fuh,G., Garcia,K.C., y de Vos,A.M. (2000). The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J. Biol. Chem.* 275, 26690-26695.
- Fuh,G., Li,B., Crowley,C., Cunningham,B., y Wells,J.A. (1998). Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 273, 11197-11204.
- Fujio,Y. y Walsh,K. (1999). Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 274, 16349-16354.
- Fukumura,D., Gohongi,T., Kadambi,A., Izumi,Y., Ang,J., Yun,C.O., Buerk,D.G., Huang,P.L., y Jain,R.K. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 2604-2609.

- Gabrilovich,D., Ishida,T., Oyama,T., Ran,S., Kravtsov,V., Nadaf,S., y Carbone,D.P. (1998). Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 92, 4150-4166.
- Gaffney,M.M., Hynes,S.O., Barry,F., y O'Brien,T. (2007). Cardiovascular gene therapy: current status and therapeutic potential. *Br. J. Pharmacol.* 152, 175-188.
- Gao,M.H., Lai,N.C., McKirnan,M.D., Roth,D.A., Rubanyi,G.M., Dalton,N., Roth,D.M., y Hammond,H.K. (2004). Increased regional function and perfusion after intracoronary delivery of adenovirus encoding fibroblast growth factor 4: report of preclinical data. *Hum. Gene Ther.* 15, 574-587.
- Geng,Y.J. y Libby,P. (2002). Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1370-1380.
- Gerber,H.P., Condorelli,F., Park,J., y Ferrara,N. (1997). Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 272, 23659-23667.
- Gerber,H.P., Dixit,V., y Ferrara,N. (1998a). Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 273, 13313-13316.
- Gerber,H.P., Hillan,K.J., Ryan,A.M., Kowalski,J., Keller,G.A., Rangell,L., Wright,B.D., Radtke,F., Aguet,M., y Ferrara,N. (1999). VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 126, 1149-1159.
- Gerber,H.P., Malik,A.K., Solar,G.P., Sherman,D., Liang,X.H., Meng,G., Hong,K., Marsters,J.C., y Ferrara,N. (2002). VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 417, 954-958.
- Gerber,H.P., McMurtrey,A., Kowalski,J., Yan,M., Keyt,B.A., Dixit,V., y Ferrara,N. (1998b). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.* 273, 30336-30343.
- Gille,H., Kowalski,J., Li,B., LeCouter,J., Moffat,B., Zioncheck,T.F., Pelletier,N., y Ferrara,N. (2001). Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J. Biol. Chem.* 276, 3222-3230.
- Goldberg,M.A. y Schneider,T.J. (1994). Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 269, 4355-4359.
- Grines,C., Rubanyi,G.M., Kleiman,N.S., Marrott,P., y Watkins,M.W. (2003). Angiogenic gene therapy with adenovirus 5 fibroblast growth factor-4 (Ad5FGF-4): a new option for the treatment of coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 92, 24N-31N.
- Gruchala,M., Bhardwaj,S., Pajusola,K., Roy,H., Rissanen,T.T., Kokina,I., Kholova,I., Markkanen,J.E., Rutanen,J., Heikura,T., Alitalo,K., Bueler,H., y Yla-Herttuala,S. (2004). Gene transfer into rabbit arteries with adeno-associated virus and adenovirus vectors. *J. Gene Med.* 6, 545-554.
- Guo,D., Jia,Q., Song,H.Y., Warren,R.S., y Donner,D.B. (1995). Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 270, 6729-6733.
- Gutierrez,J., Konecny,G.E., Hong,K., Burges,A., Henry,T.D., Lambiase,P.D., Lee,W.W., y Meng,Y.G. (2008). A new ELISA for use in a 3-ELISA system to assess concentrations of VEGF splice variants and VEGF(110) in ovarian cancer tumors. *Clin. Chem.* 54, 597-601.

- Hacein-Bey-Abina,S., Von Kalle,C., Schmidt,M., McCormack,M.P., Wulffraat,N., Leboulch,P., Lim,A., Osborne,C.S., Pawliuk,R., Morillon,E., Sorensen,R., Forster,A., Fraser,P., Cohen,J.I., de Saint,B.G., Alexander,I., Wintergerst,U., Frebourg,T., Aurias,A., Stoppa-Lyonnet,D., Romana,S., Radford-Weiss,I., Gross,F., Valensi,F., Delabesse,E., Macintyre,E., Sigaux,F., Soulier,J., Leiva,L.E., Wissler,M., Prinz,C., Rabbitts,T.H., Le Deist,F., Fischer,A., y Cavazzana-Calvo,M. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419.
- Hao,X., Mansson-Broberg,A., Grinnemo,K.H., Siddiqui,A.J., Dellgren,G., Brodin,L.A., y Sylven,C. (2007). Myocardial angiogenesis after plasmid or adenoviral VEGF-A(165) gene transfer in rat myocardial infarction model. *Cardiovasc. Res.* 73, 481-487.
- Harada,K., Grossman,W., Friedman,M., Edelman,E.R., Prasad,P.V., Keighley,C.S., Manning,W.J., Sellke,F.W., y Simons,M. (1994). Basic fibroblast growth factor improves myocardial function in chronically ischemic porcine hearts. *J. Clin. Invest* 94, 623-630.
- Hariawala,M.D., Horowitz,J.R., Esakof,D., Sheriff,D.D., Walter,D.H., Keyt,B., Isner,J.M., y Symes,J.F. (1996). VEGF improves myocardial blood flow but produces EDRF-mediated hypotension in porcine hearts. *J. Surg. Res.* 63, 77-82.
- Harvey,B.G., Maroni,J., O'Donoghue,K.A., Chu,K.W., Muscat,J.C., Pippo,A.L., Wright,C.E., Hollmann,C., Wisnivesky,J.P., Kessler,P.D., Rasmussen,H.S., Rosengart,T.K., y Crystal,R.G. (2002). Safety of local delivery of low- and intermediate-dose adenovirus gene transfer vectors to individuals with a spectrum of morbid conditions. *Hum. Gene Ther.* 13, 15-63.
- Hattori,K., Dias,S., Heissig,B., Hackett,N.R., Lyden,D., Tateno,M., Hicklin,D.J., Zhu,Z., Witte,L., Crystal,R.G., Moore,M.A., y Rafii,S. (2001). Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 193, 1005-1014.
- Hedman,M., Hartikainen,J., Syvanne,M., Stjernvall,J., Hedman,A., Kivela,A., Vanninen,E., Mussalo,H., Kauppila,E., Simula,S., Narvanen,O., Rantala,A., Peuhkurinen,K., Nieminen,M.S., Laakso,M., y Yla-Herttuala,S. (2003). Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation* 107, 2677-2683.
- Heinl-Green,A., Radke,P.W., Munkonge,F.M., Frass,O., Zhu,J., Vincent,K., Geddes,D.M., y Alton,E.W. (2005). The efficacy of a 'master switch gene' HIF-1alpha in a porcine model of chronic myocardial ischaemia. *Eur. Heart J.* 26, 1327-1332.
- Henry,T.D., Annex,B.H., McKendall,G.R., Azrin,M.A., Lopez,J.J., Giordano,F.J., Shah,P.K., Willerson,J.T., Benza,R.L., Berman,D.S., Gibson,C.M., Bajamonde,A., Rundle,A.C., Fine,J., y McCluskey,E.R. (2003). The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 107, 1359-1365.
- Hernandez,P., Artaza,H., Diaz,A.J., Cortina,L.D., Lam,R.M., Pol,N., Dorticos,E., Macias,C., del Valle,L., y Leon,L. (2007a). Adult stem cell autotransplantation in chronic critical limb ischemia. *Spanish Journal of Surgical Research* X, 204-211.
- Hernandez,P., Cortina,L., Artaza,H., Pol,N., Lam,R.M., Dorticos,E., Macias,C., Hernandez,C., del Valle,L., Blanco,A., Martinez,A., y Diaz,F. (2007b). Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation in patients with severe lower limb ischaemia: a comparison of using blood cell separator and Ficoll density gradient centrifugation. *Atherosclerosis* 194, e52-e56.
- Heron,E., Chemla,D., Megnien,J.L., Pourny,J.C., Levenson,J., Lecarpentier,Y., y Simon,A. (1995). Reactive hyperemia unmasks reduced compliance of cutaneous arteries in essential hypertension. *J. Appl. Physiol* 79, 498-505.
- Herrera,A.M., Rodriguez,E.G., Hernandez,T., Sandez,B., y Duarte,C.A. (2000). A family of compact plasmid vectors for DNA immunization in humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 548-551.

- Hiraoka,K., Koike,H., Yamamoto,S., Tomita,N., Yokoyama,C., Tanabe,T., Aikou,T., Ogihara,T., Kaneda,Y., y Morishita,R. (2003). Enhanced therapeutic angiogenesis by cotransfection of prostacyclin synthase gene or optimization of intramuscular injection of naked plasmid DNA. *Circulation* 108, 2689-2696.
- Hiratsuka,S., Maru,Y., Okada,A., Seiki,M., Noda,T., y Shibuya,M. (2001). Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res.* 61, 1207-1213.
- Horn,N.A., Meek,J.A., Budahazi,G., y Marquet,M. (1995). Cancer gene therapy using plasmid DNA: purification of DNA for human clinical trials. *Hum. Gene Ther.* 6, 565-573.
- Horvath,K.A., Lu,C.Y., Robert,E., Pierce,G.F., Greene,R., Sosnowski,B.A., y Doukas,J. (2005). Improvement of myocardial contractility in a porcine model of chronic ischemia using a combined transmyocardial revascularization and gene therapy approach. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 129, 1071-1077.
- Howell,W.M., Ali,S., Rose-Zerilli,M.J., y Ye,S. (2005). VEGF polymorphisms and severity of atherosclerosis. *J. Med. Genet.* 42, 485-490.
- Hughes,G.C., Post,M.J., Simons,M., y Annex,B.H. (2003). Translational physiology: porcine models of human coronary artery disease: implications for preclinical trials of therapeutic angiogenesis. *J. Appl. Physiol* 94, 1689-1701.
- ICH (1996). Guideline for Good Clinical Practice. *International Conference on Harmonisation* <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA482.pdf>.
- Inoue,M., Itoh,H., Ueda,M., Naruko,T., Kojima,A., Komatsu,R., Doi,K., Ogawa,Y., Tamura,N., Takaya,K., Igaki,T., Yamashita,J., Chun,T.H., Masatsugu,K., Becker,A.E., y Nakao,K. (1998). Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation* 98, 2108-2116.
- Isner,J.M., Baumgartner,I., Rauh,G., Schainfeld,R., Blair,R., Manor,O., Razvi,S., y Symes,J.F. (1998). Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J. Vasc. Surg.* 28, 964-973.
- Isner,J.M., Walsh,K., Symes,J., Pieczek,A., Takeshita,S., Lowry,J., Rossow,S., Rosenfield,K., Weir,L., Brogi,E., y . (1995). Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation* 91, 2687-2692.
- Ivan,M., Kondo,K., Yang,H., Kim,W., Valiando,J., Ohh,M., Salic,A., Asara,J.M., Lane,W.S., y Kaelin,W.G., Jr. (2001). HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science* 292, 464-468.
- Jaakkola,P., Mole,D.R., Tian,Y.M., Wilson,M.I., Gielbert,J., Gaskell,S.J., Kriegsheim,A., Hebestreit,H.F., Mukherji,M., Schofield,C.J., Maxwell,P.H., Pugh,C.W., y Ratcliffe,P.J. (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472.
- Jeong,J.O., Byun,J., Jeon,E.S., Gwon,H.C., Lim,Y.S., Park,J., Yeo,S.J., Lee,Y.J., Kim,S., y Kim,D.K. (2002). Improved expression by cytomegalovirus promoter/enhancer and behavior of vascular endothelial growth factor gene after myocardial injection of naked DNA. *Exp. Mol. Med.* 34, 278-284.
- Jingjing,L., Xue,Y., Agarwal,N., y Roque,R.S. (1999). Human Muller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 752-759.
- Joukov,V., Pajusola,K., Kaipainen,A., Chilov,D., Lahtinen,I., Kukk,E., Saksela,O., Kalkkinen,N., y Alitalo,K. (1996). A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 15, 290-298.

- Jozkowicz,A. y Dulak,J. (2005). Helper-dependent adenoviral vectors in experimental gene therapy. *Acta Biochim. Pol.* 52, 589-599.
- Kalka,C., Tehrani,H., Laudenberg,B., Vale,P.R., Isner,J.M., Asahara,T., y Symes,J.F. (2000). VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann. Thorac. Surg.* 70, 829-834.
- Kanemitsu,N. y Komeda,M. (2006). [Therapeutic angiogenesis and myocardial regenerative medicine for ischemic heart disease]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 107, 33-37.
- Kankkonen,H.M., Vahakangas,E., Marr,R.A., Pakkanen,T., Laurema,A., Leppanen,P., Jalkanen,J., Verma,I.M., y Yla-Herttuala,S. (2004). Long-term lowering of plasma cholesterol levels in LDL-receptor-deficient WHHL rabbits by gene therapy. *Mol. Ther.* 9, 548-556.
- Karkkainen,M.J., Haiko,P., Sainio,K., Partanen,J., Taipale,J., Petrova,T.V., Jeltsch,M., Jackson,D.G., Talikka,M., Rauvala,H., Betsholtz,C., y Alitalo,K. (2004). Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat. Immunol.* 5, 74-80.
- Kastrup,J., Jorgensen,E., Ruck,A., Tagil,K., Glogar,D., Ruzyllo,W., Botker,H.E., Dudek,D., Drvota,V., Hesse,B., Thuesen,L., Blomberg,P., Gyongyosi,M., y Sylven,C. (2005). Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 45, 982-988.
- Kawasaki,T., Kitsukawa,T., Bekku,Y., Matsuda,Y., Sanbo,M., Yagi,T., y Fujisawa,H. (1999). A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 126, 4895-4902.
- Keck,P.J., Hauser,S.D., Krivi,G., Sanzo,K., Warren,T., Feder,J., y Connolly,D.T. (1989). Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246, 1309-1312.
- Kendall,R.L. y Thomas,K.A. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 10705-10709.
- Khurana,R. y Simons,M. (2007). Therapeutic angiogenesis for cardiovascular disease. In *Angiogenesis : from basic science to clinical applications*, N.Ferrara, ed. (Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group), pp. 253-267.
- Khurana,R., Zhuang,Z., Bhardwaj,S., Murakami,M., De Muinck,E., Yla-Herttuala,S., Ferrara,N., Martin,J.F., Zachary,I., y Simons,M. (2004). Angiogenesis-dependent and independent phases of intimal hyperplasia. *Circulation* 110, 2436-2443.
- Kim,H.J., Jang,S.Y., Park,J.I., Byun,J., Kim,D.I., Do,Y.S., Kim,J.M., Kim,S., Kim,B.M., Kim,W.B., y Kim,D.K. (2004). Vascular endothelial growth factor-induced angiogenic gene therapy in patients with peripheral artery disease. *Exp. Mol. Med.* 36, 336-344.
- Kolsut,P., Malecki,M., Zelazny,P., Teresinska,A., Firek,B., Janik,P., y Religa,Z. (2003). Gene therapy of coronary artery disease with phvegf165--early outcome. *Kardiol. Pol.* 59, 373-384.
- Kondoh,K., Koyama,H., Miyata,T., Takato,T., Hamada,H., y Shigematsu,H. (2004). Conduction performance of collateral vessels induced by vascular endothelial growth factor or basic fibroblast growth factor. *Cardiovasc. Res.* 61, 132-142.
- Kurschat,P., Bielenberg,D., y Klagsbrun,M. (2007). Neuropilins, receptors for the VEGF and semaphorin families, link angiogenesis and axon guidance. In *Angiogenesis : from basic science to clinical applications*, N.Ferrara, ed. (Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group), pp. 111-131.
- Kusumanto,Y.H., van,W., V, Mulder,N.H., Smit,A.J., van den Dungen,J.J., Hooymans,J.M., Sluiter,W.J., Tio,R.A., Quax,P.H., Gans,R.O., Dullaart,R.P., y Hospers,G.A. (2006). Treatment with intramuscular vascular endothelial

growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial. *Hum. Gene Ther.* 17, 683-691.

Laguens,R., Cabeza,M.P., Vera,J.G., Del Valle,H., Lascano,E., Negroni,J., Werba,P., Cuniberti,L., Martinez,V., Melo,C., Papouchado,M., Ojeda,R., Criscuolo,M., y Crottogini,A. (2002). Entrance in mitosis of adult cardiomyocytes in ischemic pig hearts after plasmid-mediated rhVEGF165 gene transfer. *Gene Ther.* 9, 1676-1681.

Lahijani,R., Hulley,G., Soriano,G., Horn,N.A., y Marquet,M. (1996). High-yield production of pBR322-derived plasmids intended for human gene therapy by employing a temperature-controllable point mutation. *Hum. Gene Ther.* 7, 1971-1980.

Lahtenvuo,J.E., Lahtenvuo,M.T., Kivela,A., Rosenlew,C., Falkevall,A., Klar,J., Heikura,T., Rissanen,T.T., Vahakangas,E., Korpisalo,P., Enholm,B., Carmeliet,P., Alitalo,K., Eriksson,U., y Yla-Herttuala,S. (2009). Vascular endothelial growth factor-B induces myocardium-specific angiogenesis and arteriogenesis via vascular endothelial growth factor receptor-1- and neuropilin receptor-1-dependent mechanisms. *Circulation* 119, 845-856.

Laitinen,M., Hartikainen,J., Hiltunen,M.O., Eranen,J., Kiviniemi,M., Narvanen,O., Makinen,K., Manninen,H., Syvanne,M., Martin,J.F., Laakso,M., y Yla-Herttuala,S. (2000). Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary arteries after angioplasty. *Hum. Gene Ther.* 11, 263-270.

Laitinen,M., Makinen,K., Manninen,H., Matsi,P., Kossila,M., Agrawal,R.S., Pakkanen,T., Luoma,J.S., Viita,H., Hartikainen,J., Alhava,E., Laakso,M., y Yla-Herttuala,S. (1998). Adenovirus-mediated gene transfer to lower limb artery of patients with chronic critical leg ischemia. *Hum. Gene Ther.* 9, 1481-1486.

Laitinen,M., Zachary,I., Breier,G., Pakkanen,T., Hakkinen,T., Luoma,J., Abedi,H., Risau,W., Soma,M., Laakso,M., Martin,J.F., y Yla-Herttuala,S. (1997). VEGF gene transfer reduces intimal thickening via increased production of nitric oxide in carotid arteries. *Hum. Gene Ther.* 8, 1737-1744.

Landgren,E., Schiller,P., Cao,Y., y Claesson-Welsh,L. (1998). Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase C-gamma and migration of endothelial cells expressing Flt 1. *Oncogene* 16, 359-367.

Lange,T., Guttmann-Raviv,N., Baruch,L., Machluf,M., y Neufeld,G. (2003). VEGF162, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells. *J. Biol. Chem.* 278, 17164-17169.

Lauer,G., Sollberg,S., Cole,M., Krieg,T., y Eming,S.A. (2002). Generation of a novel proteolysis resistant vascular endothelial growth factor165 variant by a site-directed mutation at the plasmin sensitive cleavage site. *FEBS Lett.* 531, 309-313.

Lazarous,D.F., Shou,M., Stiber,J.A., Hodge,E., Thirumurti,V., Goncalves,L., y Unger,E.F. (1999). Adenoviral-mediated gene transfer induces sustained pericardial VEGF expression in dogs: effect on myocardial angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* 44, 294-302.

LeCouter,J., Moritz,D.R., Li,B., Phillips,G.L., Liang,X.H., Gerber,H.P., Hillan,K.J., y Ferrara,N. (2003). Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 299, 890-893.

Lederman,R.J., Mendelsohn,F.O., Anderson,R.D., Saucedo,J.F., Tenaglia,A.N., Hermiller,J.B., Hillegass,W.B., Rocha-Singh,K., Moon,T.E., Whitehouse,M.J., y Annex,B.H. (2002). Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet* 359, 2053-2058.

Lee,L.Y., Patel,S.R., Hackett,N.R., Mack,C.A., Polce,D.R., El Sawy,T., Hachamovitch,R., Zanzonico,P., Sanborn,T.A., Parikh,M., Isom,O.W., Crystal,R.G., y Rosengart,T.K. (2000a). Focal angiogen therapy using

intramyocardial delivery of an adenovirus vector coding for vascular endothelial growth factor 121. *Ann. Thorac. Surg.* 69, 14-23.

Lee,P., Goishi,K., Davidson,A.J., Mannix,R., Zon,L., y Klagsbrun,M. (2002). Neuropilin-1 is required for vascular development and is a mediator of VEGF-dependent angiogenesis in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 10470-10475.

Lee,R.J., Springer,M.L., Blanco-Bose,W.E., Shaw,R., Ursell,P.C., y Blau,H.M. (2000b). VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* 102, 898-901.

Lehrman,S. (1999). Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* 401, 517-518.

Lekas,M., Lekas,P., Latter,D.A., Kutryk,M.B., y Stewart,D.J. (2006). Growth factor-induced therapeutic neovascularization for ischaemic vascular disease: time for a re-evaluation? *Curr. Opin. Cardiol.* 21, 376-384.

Leong-Poi,H., Kuliszewski,M.A., Lekas,M., Sibbald,M., Teichert-Kuliszewska,K., Klibanov,A.L., Stewart,D.J., y Lindner,J.R. (2007). Therapeutic arteriogenesis by ultrasound-mediated VEGF165 plasmid gene delivery to chronically ischemic skeletal muscle. *Circ. Res.* 101, 295-303.

Leppanen,P., Koota,S., Kholova,I., Koponen,J., Fieber,C., Eriksson,U., Alitalo,K., y Yla-Herttuala,S. (2005). Gene transfers of vascular endothelial growth factor-A, vascular endothelial growth factor-B, vascular endothelial growth factor-C, and vascular endothelial growth factor-D have no effects on atherosclerosis in hypercholesterolemic low-density lipoprotein-receptor/apolipoprotein B48-deficient mice. *Circulation* 112, 1347-1352.

Leung,D.W., Cachianes,G., Kuang,W.J., Goeddel,D.V., y Ferrara,N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-1309.

Libby,P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874.

Libby,P. y Theroux,P. (2005). Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 111, 3481-3488.

Liinamaa,M.J. y Savolainen,M.J. (2008). High vitreous concentration of vascular endothelial growth factor in diabetic patients with proliferative retinopathy using statins. *Ann. Med.* 40, 209-214.

Liu,Y., Cox,S.R., Morita,T., y Kourembanas,S. (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ. Res.* 77, 638-643.

Losordo,D.W., Pickering,J.G., Takeshita,S., Leclerc,G., Gal,D., Weir,L., Kearney,M., Jekanowski,J., y Isner,J.M. (1994). 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* 89, 785-792.

Losordo,D.W., Vale,P.R., Hendel,R.C., Milliken,C.E., Fortuin,F.D., Cummings,N., Schatz,R.A., Asahara,T., Isner,J.M., y Kuntz,R.E. (2002). 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* 105, 2012-2018.

Losordo,D.W., Vale,P.R., y Isner,J.M. (1999). Gene therapy for myocardial angiogenesis. *Am. Heart J.* 138, S132-S141.

Losordo,D.W., Vale,P.R., Symes,J.F., Dunnington,C.H., Esakof,D.D., Maysky,M., Ashare,A.B., Lathi,K., y Isner,J.M. (1998). Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of pVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 98, 2800-2804.

- Lyon,A.R., Sato,M., Hajjar,R.J., Samulski,R.J., y Harding,S.E. (2008). Gene therapy: targeting the myocardium. *Heart* 94, 89-99.
- Madan,A. y Curtin,P.T. (1993). A 24-base-pair sequence 3' to the human erythropoietin gene contains a hypoxia-responsive transcriptional enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 3928-3932.
- Maglione,D., Guerriero,V., Viglietto,G., Delli-Bovi,P., y Persico,M.G. (1991). Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 9267-9271.
- Maharaj,A.S., Saint-Geniez,M., Maldonado,A.E., y D'Amore,P.A. (2006). Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *Am. J. Pathol.* 168, 639-648.
- Makinen,K., Manninen,H., Hedman,M., Matsi,P., Mussalo,H., Alhava,E., y Yla-Herttuala,S. (2002). Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol. Ther.* 6, 127-133.
- Malemud,C.J. (2007). Growth hormone, VEGF and FGF: involvement in rheumatoid arthritis. *Clin. Chim. Acta* 375, 10-19.
- Malik,A.K., Baldwin,M.E., Peale,F., Fuh,G., Liang,W.C., Lowman,H., Meng,G., Ferrara,N., y Gerber,H.P. (2006). Redundant roles of VEGF-B and PlGF during selective VEGF-A blockade in mice. *Blood* 107, 550-557.
- Mammen,B., Ramakrishnan,T., y Sudhakar,U. (2007). Principles of gene therapy. *Indian J. Dent. Res.* 18, 196-200.
- Maru,Y., Yamaguchi,S., y Shibuya,M. (1998). Flt-1, a receptor for vascular endothelial growth factor, has transforming and morphogenic potentials. *Oncogene* 16, 2585-2595.
- Matsune,S., Ohori,J., Sun,D., Yoshifuku,K., Fukuiwa,T., y Kurono,Y. (2008). Vascular endothelial growth factor produced in nasal glands of perennial allergic rhinitis. *Am. J. Rhinol.* 22, 365-370.
- Mendoza,Y. (2007). Stem cells for myocardial infarction: an update. *Biotecnología Aplicada* 24, 199-208.
- Mesri,E.A., Federoff,H.J., y Brownlee,M. (1995). Expression of vascular endothelial growth factor from a defective herpes simplex virus type 1 amplicon vector induces angiogenesis in mice. *Circ. Res.* 76, 161-167.
- Millauer,B., Witzmann-Voos,S., Schnurch,H., Martinez,R., Moller,N.P., Risau,W., y Ullrich,A. (1993). High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72, 835-846.
- MINSAP (2008). Anuario Estadístico de Salud Cuba 2007. *Dirección Nacional de Estadísticas de Cuba* <http://www.infomed.sld.cu/servicios/estadisticas/>.
- Mohler,E.R., III, Rajagopalan,S., Olin,J.W., Trachtenberg,J.D., Rasmussen,H., Pak,R., y Crystal,R.G. (2003). Adenoviral-mediated gene transfer of vascular endothelial growth factor in critical limb ischemia: safety results from a phase I trial. *Vasc. Med.* 8, 9-13.
- Mole,D.R., Maxwell,P.H., Pugh,C.W., y Ratcliffe,P.J. (2001). Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing. *IUBMB. Life* 52, 43-47.
- Morera,Y., Bequet-Romero,M., Ayala,M., Lamdan,H., Agger,E.M., Andersen,P., y Gavilondo,J.V. (2008). Anti-tumoral effect of active immunotherapy in C57BL/6 mice using a recombinant human VEGF protein as antigen and three chemically unrelated adjuvants. *Angiogenesis.* 11, 381-393.
- Motulsky,H.J. (2007). Prism 5 Statistics Guide. *GraphPad SoftwareInc.*, San Diego CA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).



- Mueller,M.D., Vigne,J.L., Minchenko,A., Lebovic,D.I., Leitman,D.C., y Taylor,R.N. (2000). Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 10972-10977.
- Mueller,M.D., Vigne,J.L., Pritts,E.A., Chao,V., Dreher,E., y Taylor,R.N. (2003). Progestins activate vascular endothelial growth factor gene transcription in endometrial adenocarcinoma cells. *Fertil. Steril.* 79, 386-392.
- Muhs,A., Lenter,M.C., Seidler,R.W., Zweigerdt,R., Kirchengast,M., Weser,R., Ruediger,M., y Guth,B. (2004). Nonviral monocyte chemoattractant protein-1 gene transfer improves arteriogenesis after femoral artery occlusion. *Gene Ther.* 11, 1685-1693.
- Muller,O.J., Katus,H.A., y Bekerredjian,R. (2007). Targeting the heart with gene therapy-optimized gene delivery methods. *Cardiovasc. Res.* 73, 453-462.
- Muller,Y.A., Li,B., Christinger,H.W., Wells,J.A., Cunningham,B.C., y de Vos,A.M. (1997). Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 7192-7197.
- Mulligan-Kehoe,M.J. y Simons,M. (2007). Current concepts in normal and defective angiogenesis: implications for systemic sclerosis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 9, 173-179.
- Murohara,T., Horowitz,J.R., Silver,M., Tsurumi,Y., Chen,D., Sullivan,A., y Isner,J.M. (1998). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 97, 99-107.
- Musacchio,A., Rodriguez,E.G., Herrera,A.M., Quintana,D., y Muzio,V. (2001). Multivalent DNA-based immunization against hepatitis B virus with plasmids encoding surface and core antigens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 442-446.
- Nabel,E.G., Plautz,G., y Nabel,G.J. (1990). Site-specific gene expression in vivo by direct gene transfer into the arterial wall. *Science* 249, 1285-1288.
- Nagy,J.A., Vasile,E., Feng,D., Sundberg,C., Brown,L.F., Detmar,M.J., Lawitts,J.A., Benjamin,L., Tan,X., Manseau,E.J., Dvorak,A.M., y Dvorak,H.F. (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J. Exp. Med.* 196, 1497-1506.
- Neaogoe,P.E., Lemieux,C., y Sirois,M.G. (2005). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor-1 and -2 heterodimer. *J. Biol. Chem.* 280, 9904-9912.
- Niagara,M.I., Haider,H.K., Ye,L., Koh,V.S., Lim,Y.T., Poh,K.K., Ge,R., y Sim,E.K. (2004). Autologous skeletal myoblasts transduced with a new adenoviral bicistronic vector for treatment of hind limb ischemia. *J. Vasc. Surg.* 40, 774-785.
- Nicosia,R.F., Nicosia,S.V., y Smith,M. (1994). Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *Am. J. Pathol.* 145, 1023-1029.
- Nikol,S., Engelmann,M.G., Pelisek,J., Fuchs,A., Golda,A., Shimizu,M., Mekkaoui,C., y Rolland,P.H. (2002). Local perivascular application of low amounts of a plasmid encoding for vascular endothelial growth factor (VEGF165) is efficient for therapeutic angiogenesis in pigs. *Acta Physiol Scand.* 176, 151-159.
- Ogawa,S., Oku,A., Sawano,A., Yamaguchi,S., Yazaki,Y., y Shibuya,M. (1998). A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J. Biol. Chem.* 273, 31273-31282.

- Okada,F., Rak,J.W., Croix,B.S., Lieubeau,B., Kaya,M., Roncari,L., Shirasawa,S., Sasazuki,T., y Kerbel,R.S. (1998). Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 3609-3614.
- Olofsson,B., Korpelainen,E., Pepper,M.S., Mandriota,S.J., Aase,K., Kumar,V., Gunji,Y., Jeltsch,M.M., Shibuya,M., Alitalo,K., y Eriksson,U. (1998). Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 11709-11714.
- Olofsson,B., Pajusola,K., Kaipainen,A., von Euler,G., Joukov,V., Saksela,O., Orpana,A., Pettersson,R.F., Alitalo,K., y Eriksson,U. (1996). Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 2576-2581.
- Pajusola,K., Aprelikova,O., Korhonen,J., Kaipainen,A., Pertovaara,L., Alitalo,R., y Alitalo,K. (1992). FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res.* 52, 5738-5743.
- Parenti,A., Morbidelli,L., Cui,X.L., Douglas,J.G., Hood,J.D., Granger,H.J., Ledda,F., y Ziche,M. (1998). Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *J. Biol. Chem.* 273, 4220-4226.
- Park,J.E., Chen,H.H., Winer,J., Houck,K.A., y Ferrara,N. (1994). Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J. Biol. Chem.* 269, 25646-25654.
- Parsons-Wingter,P., Chandrasekharan,U.M., McKay,T.L., Radhakrishnan,K., DiCorleto,P.E., Albarran,B., y Farr,A.G. (2006). A VEGF165-induced phenotypic switch from increased vessel density to increased vessel diameter and increased endothelial NOS activity. *Microvasc. Res.* 72, 91-100.
- Patila,T., Ikonen,T., Rutanen,J., Ahonen,A., Lommi,J., Lappalainen,K., Krogerus,L., Ihlberg,L., Partanen,T.A., Lahteenoja,L., Virtanen,K., Alitalo,K., Yla-Herttuala,S., y Harjula,A. (2006). Vascular endothelial growth factor C-induced collateral formation in a model of myocardial ischemia. *J. Heart Lung Transplant.* 25, 206-213.
- Peix,A., Hidalgo,J., Dorticos,E., Llerena,L., Paredes,A., Ponce,F., Macias,C., del Valle,L., Cabrera,L.O., Carrillo,R., Mena,E., y Fernandez,Y. (2006). Reparación del miocardio mediante la terapia con células madre. *Alasbimn J* 8.
- Pepper,M.S., Wasi,S., Ferrara,N., Orci,L., y Montesano,R. (1994). In vitro angiogenic and proteolytic properties of bovine lymphatic endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 210, 298-305.
- Phillips,G.D., Stone,A.M., Jones,B.D., Schultz,J.C., Whitehead,R.A., y Knighton,D.R. (1994). Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In Vivo* 8, 961-965.
- Pipp,F., Boehm,S., Cai,W.J., Adili,F., Ziegler,B., Karanovic,G., Ritter,R., Balzer,J., Scheler,C., Schaper,W., y Schmitz-Rixen,T. (2004). Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1664-1668.
- Poltorak,Z., Cohen,T., Sivan,R., Kandelis,Y., Spira,G., Vlodavsky,I., Keshet,E., y Neufeld,G. (1997). VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 272, 7151-7158.
- Pradeep,C.R., Sunila,E.S., y Kuttan,G. (2005). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies. *Integr. Cancer Ther.* 4, 315-321.
- Pu,L.Q., Jackson,S., Lachapelle,K.J., Arekat,Z., Graham,A.M., Lisbona,R., Brassard,R., Carpenter,S., y Symes,J.F. (1994). A persistent hindlimb ischemia model in the rabbit. *J. Invest Surg.* 7, 49-60.

Putnam,D. (2006). Polymers for gene delivery across length scales. *Nat. Mater.* 5, 439-451.

QIAGEN (2009). EndoFree Plasmid Mega Kit. *QIAGEN* <http://www1.qiagen.com/Products>.

Rajagopalan,S., Mohler,E.R., III, Lederman,R.J., Mendelsohn,F.O., Saucedo,J.F., Goldman,C.K., Blebea,J., Macko,J., Kessler,P.D., Rasmussen,H.S., y Annex,B.H. (2003). Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* 108, 1933-1938.

Rajagopalan,S., Shah,M., Luciano,A., Crystal,R., y Nabel,E.G. (2001). Adenovirus-mediated gene transfer of VEGF(121) improves lower-extremity endothelial function and flow reserve. *Circulation* 104, 753-755.

Rajagopalan,S., Trachtenberg,J., Mohler,E., Olin,J., McBride,S., Pak,R., Rasmussen,H., y Crystal,R. (2002). Phase I study of direct administration of a replication deficient adenovirus vector containing the vascular endothelial growth factor cDNA (CI-1023) to patients with claudication. *Am. J. Cardiol.* 90, 512-516.

Rakue,H., Nakajima,H., Katoh,T., Usui,M., Amemiya,T., Miyagi,M., Hara,T., Tamura,K., Sasame,A., Naito,Y., Nagai,Y., y Ibukiyama,C. (1998). Low-dose basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor for angiogenesis in canine acute hindlimb insufficiency. *Jpn. Circ. J.* 62, 933-939.

Reilly,J.P., Grise,M.A., Fortuin,F.D., Vale,P.R., Schaer,G.L., Lopez,J., VAN Camp,J.R., Henry,T., Richenbacher,W.E., Losordo,D.W., Schatz,R.A., y Isner,J.M. (2005). Long-term (2-year) clinical events following transthoracic intramyocardial gene transfer of VEGF-2 in no-option patients. *J. Interv. Cardiol.* 18, 27-31.

Rissanen,T.T., Korpisalo,P., Markkanen,J.E., Liimatainen,T., Orden,M.R., Kholova,I., de Goede,A., Heikura,T., Grohn,O.H., y Yla-Herttuala,S. (2005). Blood flow remodels growing vasculature during vascular endothelial growth factor gene therapy and determines between capillary arterialization and sprouting angiogenesis. *Circulation* 112, 3937-3946.

Rissanen,T.T., Markkanen,J.E., Arve,K., Rutanen,J., Kettunen,M.I., Vajanto,I., Jauhiainen,S., Cashion,L., Gruchala,M., Narvanen,O., Taipale,P., Kauppinen,R.A., Rubanyi,G.M., y Yla-Herttuala,S. (2003a). Fibroblast growth factor 4 induces vascular permeability, angiogenesis and arteriogenesis in a rabbit hindlimb ischemia model. *FASEB J.* 17, 100-102.

Rissanen,T.T., Markkanen,J.E., Gruchala,M., Heikura,T., Puranen,A., Kettunen,M.I., Kholova,I., Kauppinen,R.A., Achen,M.G., Stacker,S.A., Alitalo,K., y Yla-Herttuala,S. (2003b). VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ. Res.* 92, 1098-1106.

Rissanen,T.T., Vajanto,I., Hiltunen,M.O., Rutanen,J., Kettunen,M.I., Niemi,M., Leppanen,P., Turunen,M.P., Markkanen,J.E., Arve,K., Alhava,E., Kauppinen,R.A., y Yla-Herttuala,S. (2002). Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR/Flk-1) in ischemic skeletal muscle and its regeneration. *Am. J. Pathol.* 160, 1393-1403.

Rissanen,T.T. y Yla-Herttuala,S. (2007). Current status of cardiovascular gene therapy. *Mol. Ther.* 15, 1233-1247.

Rodriguez,E.G. (2004). Nonviral DNA vectors for immunization and therapy: design and methods for their obtention. *J. Mol. Med.* 82, 500-509.

Rosengart,T.K., Lee,L.Y., Patel,S.R., Kligfield,P.D., Okin,P.M., Hackett,N.R., Isom,O.W., y Crystal,R.G. (1999a). Six-month assessment of a phase I trial of angiogenic gene therapy for the treatment of coronary artery disease using direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing the VEGF121 cDNA. *Ann. Surg.* 230, 466-470.

Rosengart,T.K., Lee,L.Y., Patel,S.R., Sanborn,T.A., Parikh,M., Bergman,G.W., Hachamovitch,R., Szulc,M., Kligfield,P.D., Okin,P.M., Hahn,R.T., Devereux,R.B., Post,M.R., Hackett,N.R., Foster,T., Grasso,T.M., Lesser,M.L.,

- Isom,O.W., y Crystal,R.G. (1999b). 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* 100, 468-474.
- Roy,H., Bhardwaj,S., Babu,M., Jauhiainen,S., Herzig,K.H., Bellu,A.R., Haisma,H.J., Carmeliet,P., Alitalo,K., y Yla-Herttuala,S. (2005). Adenovirus-mediated gene transfer of placental growth factor to perivascular tissue induces angiogenesis via upregulation of the expression of endogenous vascular endothelial growth factor-A. *Hum. Gene Ther.* 16, 1422-1428.
- Ruixing,Y., Dezhai,Y., Hai,W., Kai,H., Xianghong,W., y Yuming,C. (2007). Intramyocardial injection of vascular endothelial growth factor gene improves cardiac performance and inhibits cardiomyocyte apoptosis. *Eur. J. Heart Fail.* 9, 343-351.
- Rutanen,J., Rissanen,T.T., Markkanen,J.E., Gruchala,M., Silvennoinen,P., Kivela,A., Hedman,A., Hedman,M., Heikura,T., Orden,M.R., Stacker,S.A., Achen,M.G., Hartikainen,J., y Yla-Herttuala,S. (2004). Adenoviral catheter-mediated intramyocardial gene transfer using the mature form of vascular endothelial growth factor-D induces transmural angiogenesis in porcine heart. *Circulation* 109, 1029-1035.
- Saban,M.R., Backer,J.M., Backer,M.V., Maier,J., Fowler,B., Davis,C.A., Simpson,C., Wu,X.R., Birder,L., Freeman,M.R., Soker,S., Hurst,R.E., y Saban,R. (2008). VEGF receptors and neuropilins are expressed in the urothelial and neuronal cells in normal mouse urinary bladder and are upregulated in inflammation. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 295, F60-F72.
- Safran,M. y Kaelin,W.G., Jr. (2003). HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J. Clin. Invest* 111, 779-783.
- Sambrook,J., Fritsch,E., y Maniatis,T. (1989). *Molecular Cloning, a laboratory manual.* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor).
- Sanger,F., Nicklen,S., y Coulson,A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 5463-5467.
- Sarkar,N., Ruck,A., Kallner,G., Hassan,S., Blomberg,P., Islam,K.B., van der,L.J., Lindblom,D., Nygren,A.T., Lind,B., Brodin,L.A., Drvota,V., y Sylven,C. (2001). Effects of intramyocardial injection of phVEGF-A165 as sole therapy in patients with refractory coronary artery disease--12-month follow-up: angiogenic gene therapy. *J. Intern. Med.* 250, 373-381.
- Scaldeferri,F., Vetrano,S., Sans,M., Arena,V., Straface,G., Stigliano,E., Repici,A., Sturm,A., Malesci,A., Panes,J., Yla-Herttuala,S., Fiocchi,C., y Danese,S. (2009). VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 136, 585-595.
- Schaper,W. y Scholz,D. (2003). Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1143-1151.
- Schoenhagen,P., Ziada,K.M., Kapadia,S.R., Crowe,T.D., Nissen,S.E., y Tuzcu,E.M. (2000). Extent and direction of arterial remodeling in stable versus unstable coronary syndromes : an intravascular ultrasound study. *Circulation* 101, 598-603.
- Scholz,D., Ziegelhoeffer,T., Helisch,A., Wagner,S., Friedrich,C., Podzuweit,T., y Schaper,W. (2002). Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. *J. Mol. Cell Cardiol.* 34, 775-787.
- Schwarzenbach,H., Chakrabarti,G., Paust,H.J., y Mukhopadhyay,A.K. (2004). Gonadotropin-mediated regulation of the murine VEGF expression in MA-10 Leydig cells. *J. Androl* 25, 128-139.
- Selkirk,S.M. (2004). Gene therapy in clinical medicine. *Postgrad. Med. J.* 80, 560-570.

- Semenza,G. (2002). Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Pharmacol.* 64, 993-998.
- Semenza,G.L. (2003). Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu. Rev. Med.* 54, 17-28.
- Semenza,G.L. (2001). Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol. Med.* 7, 345-350.
- Senger,D.R., Galli,S.J., Dvorak,A.M., Perruzzi,C.A., Harvey,V.S., y Dvorak,H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983-985.
- Shalaby,F., Rossant,J., Yamaguchi,T.P., Gertsenstein,M., Wu,X.F., Breitman,M.L., y Schuh,A.C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62-66.
- Shammas,N.W. (2007). Epidemiology, classification, and modifiable risk factors of peripheral arterial disease. *Vasc. Health Risk Manag.* 3, 229-234.
- Shantsila,E., Watson,T., y Lip,G.Y. (2007). Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J. Am. Coll. Cardiol.* 49, 741-752.
- Sharif,F., Hynes,S.O., McMahon,J., Cooney,R., Conroy,S., Dockery,P., Duffy,G., Daly,K., Crowley,J., Bartlett,J.S., y O'Brien,T. (2006). Gene-eluting stents: comparison of adenoviral and adeno- associated viral gene delivery to the blood vessel wall in vivo. *Hum. Gene Ther.* 17, 741-750.
- Shi,Y.P. y Ferrara,N. (1999). Oncogenic ras fails to restore an in vivo tumorigenic phenotype in embryonic stem cells lacking vascular endothelial growth factor (VEGF). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 480-483.
- Shibuya,M. (2007). Signal transduction of VEGF receptors toward angiogenesis. In *Angiogenesis : from basic science to clinical applications*, N.Ferrara, ed. (Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group), pp. 37-51.
- Shibuya,M., Yamaguchi,S., Yamane,A., Ikeda,T., Tojo,A., Matsushime,H., y Sato,M. (1990). Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 5, 519-524.
- Shifren,J.L., Mesiano,S., Taylor,R.N., Ferrara,N., y Jaffe,R.B. (1998). Corticotropin regulates vascular endothelial growth factor expression in human fetal adrenal cortical cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 83, 1342-1347.
- Shimpo,M., Ikeda,U., Maeda,Y., Takahashi,M., Miyashita,H., Mizukami,H., Urabe,M., Kume,A., Takizawa,T., Shibuya,M., Ozawa,K., y Shimada,K. (2002). AAV-mediated VEGF gene transfer into skeletal muscle stimulates angiogenesis and improves blood flow in a rat hindlimb ischemia model. *Cardiovasc. Res.* 53, 993-1001.
- Shyu,K.G., Chang,H., Wang,B.W., y Kuan,P. (2003). Intramuscular vascular endothelial growth factor gene therapy in patients with chronic critical leg ischemia. *Am. J. Med.* 114, 85-92.
- Shyu,K.G., Wang,M.T., Wang,B.W., Chang,C.C., Leu,J.G., Kuan,P., y Chang,H. (2002). Intramyocardial injection of naked DNA encoding HIF-1alpha/VP16 hybrid to enhance angiogenesis in an acute myocardial infarction model in the rat. *Cardiovasc. Res.* 54, 576-583.
- Siddiqui,A.J., Blomberg,P., Wardell,E., Hellgren,I., Eskandarpour,M., Islam,K.B., y Sylven,C. (2003). Combination of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor gene therapy enhances arteriogenesis in the ischemic myocardium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 1002-1009.
- Silvestre,J.S., Tamarat,R., Ebrahimian,T.G., Le Roux,A., Clergue,M., Emmanuel,F., Duriez,M., Schwartz,B., Branellec,D., y Levy,B.I. (2003). Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis. *Circ. Res.* 93, 114-123.

Simonetti,O., Lucarini,G., Goteri,G., Zizzi,A., Biagini,G., Lo,M.L., y Offidani,A. (2006). VEGF is likely a key factor in the link between inflammation and angiogenesis in psoriasis: results of an immunohistochemical study. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 19, 751-760.

Simons,M., Annex,B.H., Laham,R.J., Kleiman,N., Henry,T., Dauerman,H., Udelson,J.E., Gervino,E.V., Pike,M., Whitehouse,M.J., Moon,T., y Chronos,N.A. (2002). Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* 105, 788-793.

Soh,E.Y., Sobhi,S.A., Wong,M.G., Meng,Y.G., Siperstein,A.E., Clark,O.H., y Duh,Q.Y. (1996). Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. *Surgery* 120, 944-947.

Soker,S., Fidler,H., Neufeld,G., y Klagsbrun,M. (1996). Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. *J. Biol. Chem.* 271, 5761-5767.

Soker,S., Takashima,S., Miao,H.Q., Neufeld,G., y Klagsbrun,M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735-745.

Sontheimer,D.L. (2006). Peripheral vascular disease: diagnosis and treatment. *Am. Fam. Physician* 73, 1971-1976.

Stewart,D.J., Hilton,J.D., Arnold,J.M., Gregoire,J., Rivard,A., Archer,S.L., Charbonneau,F., Cohen,E., Curtis,M., Buller,C.E., Mendelsohn,F.O., Dib,N., Page,P., Ducas,J., Plante,S., Sullivan,J., Macko,J., Rasmussen,C., Kessler,P.D., y Rasmussen,H.S. (2006). Angiogenic gene therapy in patients with nonrevascularizable ischemic heart disease: a phase 2 randomized, controlled trial of AdVEGF(121) (AdVEGF121) versus maximum medical treatment. *Gene Ther.* 13, 1503-1511.

Stewart,D.J., Kutryk,M.J., Fitchett,D., Freeman,M., Camack,N., Su,Y., Siega,A.D., Bilodeau,L., Burton,J.R., Proulx,G., y Radhakrishnan,S. (2009). VEGF Gene Therapy Fails to Improve Perfusion of Ischemic Myocardium in Patients With Advanced Coronary Disease: Results of the NORTHERN Trial. *Mol. Ther.*

Stewart,R.J., Panigrahy,D., Flynn,E., y Folkman,J. (2001). Vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis are regulated by androgens in hormone responsive human prostate carcinoma: evidence for androgen dependent destabilization of vascular endothelial growth factor transcripts. *J. Urol.* 165, 688-693.

Suarez,B., Suarez,A., y Rosell,A. (2008). Cardiopatía isquémica y su asociación con los factores de riesgo. *Monografias.com* <http://www.monografias.com>.

Syven,C., Sarkar,N., Ruck,A., Drvota,V., Hassan,S.Y., Lind,B., Nygren,A., Kallner,Q., Blomberg,P., van der,L.J., Lindblom,D., Brodin,L.A., y Islam,K.B. (2001). Myocardial Doppler tissue velocity improves following myocardial gene therapy with VEGF-A165 plasmid in patients with inoperable angina pectoris. *Coron. Artery Dis.* 12, 239-243.

Symes,J.F., Losordo,D.W., Vale,P.R., Lathi,K.G., Esakof,D.D., Mayskiy,M., y Isner,J.M. (1999). Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann. Thorac. Surg.* 68, 830-836.

Takahashi,T., Yamaguchi,S., Chida,K., y Shibuya,M. (2001). A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* 20, 2768-2778.

Takeshita,S., Isshiki,T., y Sato,T. (1996a). Increased expression of direct gene transfer into skeletal muscles observed after acute ischemic injury in rats. *Lab Invest* 74, 1061-1065.

Takeshita,S., Tsurumi,Y., Couffinahl,T., Asahara,T., Bauters,C., Symes,J., Ferrara,N., y Isner,J.M. (1996b). Gene transfer of naked DNA encoding for three isoforms of vascular endothelial growth factor stimulates collateral development in vivo. *Lab Invest* 75, 487-501.

- Tang,T.T. y Lasky,L.A. (2003). The forkhead transcription factor FOXO4 induces the down-regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha by a von Hippel-Lindau protein-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 278, 30125-30135.
- Terman,B.I., Carrion,M.E., Kovacs,E., Rasmussen,B.A., Eddy,R.L., y Shows,T.B. (1991). Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 6, 1677-1683.
- Tio,R.A., Tkebuchava,T., Scheuermann,T.H., Lebherz,C., Magner,M., Kearny,M., Esakof,D.D., Isner,J.M., y Symes,J.F. (1999). Intramyocardial gene therapy with naked DNA encoding vascular endothelial growth factor improves collateral flow to ischemic myocardium. *Hum. Gene Ther.* 10, 2953-2960.
- Tischer,E., Mitchell,R., Hartman,T., Silva,M., Gospodarowicz,D., Fiddes,J.C., y Abraham,J.A. (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.* 266, 11947-11954.
- Tolentino,M.J., Miller,J.W., Gragoudas,E.S., Chatzistefanou,K., Ferrara,N., y Adamis,A.P. (1996). Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a nonhuman primate. *Arch. Ophthalmol.* 114, 964-970.
- Tran,J., Master,Z., Yu,J.L., Rak,J., Dumont,D.J., y Kerbel,R.S. (2002). A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 4349-4354.
- Tran,J., Rak,J., Sheehan,C., Saibil,S.D., LaCasse,E., Korneluk,R.G., y Kerbel,R.S. (1999). Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 781-788.
- Tsurumi,Y., Kearney,M., Chen,D., Silver,M., Takeshita,S., Yang,J., Symes,J.F., y Isner,J.M. (1997). Treatment of acute limb ischemia by intramuscular injection of vascular endothelial growth factor gene. *Circulation* 96, II-8.
- Tsurumi,Y., Takeshita,S., Chen,D., Kearney,M., Rossow,S.T., Passeri,J., Horowitz,J.R., Symes,J.F., y Isner,J.M. (1996). Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation* 94, 3281-3290.
- Tuomisto,T.T., Rissanen,T.T., Vajanto,I., Korkeela,A., Rutanen,J., y Yla-Herttuala,S. (2004). HIF-VEGF-VEGFR-2, TNF-alpha and IGF pathways are upregulated in critical human skeletal muscle ischemia as studied with DNA array. *Atherosclerosis* 174, 111-120.
- Turunen,P., Puhakka,H.L., Heikura,T., Romppanen,E., Inkala,M., Leppanen,O., y Yla-Herttuala,S. (2006). Extracellular superoxide dismutase with vaccinia virus anti-inflammatory protein 35K or tissue inhibitor of metalloproteinase-1: Combination gene therapy in the treatment of vein graft stenosis in rabbits. *Hum. Gene Ther.* 17, 405-414.
- Tuzcu,E.M., Kapadia,S.R., Tutar,E., Ziada,K.M., Hobbs,R.E., McCarthy,P.M., Young,J.B., y Nissen,S.E. (2001). High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. *Circulation* 103, 2705-2710.
- Tvedten,H.W. (1981). Hematology of the normal dog and cat. *Vet. Clin. North Am. Small Anim Pract.* 11, 209-217.
- Unidad Bioterio CIGB (2006). Evaluación de la toxicidad a dosis repetidas en ratas Sprague-Dawley del factor de crecimiento del endotelio vascular (pVEGF121). Administración intramuscular. *Ensayo preclínico* EP/TX/07.06.
- Unidad Bioterio CIGB (2003c). Evaluación de la toxicidad aguda en ratas Sprague-Dawley del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Administración intramuscular: en la extremidad posterior y en la musculatura cardíaca. *Ensayo preclínico* EP/TX/03.03.

Unidad Bioterio CIGB (2003a). Evaluación de la tolerancia local en ratas Sprague-Dawley del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Administración intramuscular. *Ensayo preclínico* EP/TX/04.03.

Unidad Bioterio CIGB (2003b). Evaluación de la tolerancia local en ratas Sprague-Dawley del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Administración intramuscular e intracardiaca. *Ensayo preclínico* EP/TX/21.02.

Vale,P.R., Losordo,D.W., Milliken,C.E., Maysky,M., Esakof,D.D., Symes,J.F., y Isner,J.M. (2000). Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF(165) gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia. *Circulation* 102, 965-974.

Vale,P.R., Losordo,D.W., Milliken,C.E., McDonald,M.C., Gravelin,L.M., Curry,C.M., Esakof,D.D., Maysky,M., Symes,J.F., y Isner,J.M. (2001). Randomized, single-blind, placebo-controlled pilot study of catheter-based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 103, 2138-2143.

van Royen,N., Hofer,I., Buschmann,I., Heil,M., Kostin,S., Deindl,E., Vogel,S., Korff,T., Augustin,H., Bode,C., Piek,J.J., y Schaper,W. (2002). Exogenous application of transforming growth factor beta 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation. *FASEB J.* 16, 432-434.

Varenne,O., Pislaru,S., Gillijns,H., Van Pelt,N., Gerard,R.D., Zoldhelyi,P., Van de,W.F., Collen,D., y Janssens,S.P. (1998). Local adenovirus-mediated transfer of human endothelial nitric oxide synthase reduces luminal narrowing after coronary angioplasty in pigs. *Circulation* 98, 919-926.

Vidal,C. y Jacob,J. (1986). Hyperalgesia induced by emotional stress in the rat: an experimental animal model of human anxiogenic hyperalgesia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 467, 73-81.

Vincenti,V., Cassano,C., Rocchi,M., y Persico,G. (1996). Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 93, 1493-1495.

Voss,C. (2007). Production of plasmid DNA for pharmaceutical use. *Biotechnol. Annu. Rev.* 13, 201-222.

Walker,J.M. (1994). The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol. Biol.* 32, 5-8.

Waltenberger,J., Claesson-Welsh,L., Siegbahn,A., Shibuya,M., y Heldin,C.H. (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 269, 26988-26995.

Walter,D.H., Cejna,M., Diaz-Sandoval,L., Willis,S., Kirkwood,L., Stratford,P.W., Tietz,A.B., Kirchmair,R., Silver,M., Curry,C., Wecker,A., Yoon,Y.S., Heidenreich,R., Hanley,A., Kearney,M., Tio,F.O., Kuenzler,P., Isner,J.M., y Losordo,D.W. (2004). Local gene transfer of phVEGF-2 plasmid by gene-eluting stents: an alternative strategy for inhibition of restenosis. *Circulation* 110, 36-45.

Wang,G.L. y Semenza,G.L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 270, 1230-1237.

Weindel,K., Marme,D., y Weich,H.A. (1992). AIDS-associated Kaposi's sarcoma cells in culture express vascular endothelial growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183, 1167-1174.

Whitlock,P.R., Hackett,N.R., Leopold,P.L., Rosengart,T.K., y Crystal,R.G. (2004). Adenovirus-mediated transfer of a minigene expressing multiple isoforms of VEGF is more effective at inducing angiogenesis than comparable vectors expressing individual VEGF cDNAs. *Mol. Ther.* 9, 67-75.

WHO (2009). Facts about cardiovascular diseases. *World Health Organization* <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>.

Wiley.co.uk (2009). Gene therapy clinical trials worldwide. *J. Gene Med.* <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>.



- Williams,K.J. y Tabas,I. (1998). The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr. Opin. Lipidol.* 9, 471-474.
- Wise,L.M., Veikkola,T., Mercer,A.A., Savory,L.J., Fleming,S.B., Caesar,C., Vitali,A., Makinen,T., Alitalo,K., y Stackner,S.A. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 3071-3076.
- Wolff,J.A., Ludtke,J.J., Acsadi,G., Williams,P., y Jani,A. (1992). Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.* 1, 363-369.
- Woods,N.B., Bottero,V., Schmidt,M., Von Kalle,C., y Verma,I.M. (2006). Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. *Nature* 440, 1123.
- Wright,C.E. (2002). Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF)A and VEGFB gene transfer on vascular reserve in a conscious rabbit hindlimb ischaemia model. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* 29, 1035-1039.
- Wright,M.J., Wightman,L.M., Latchman,D.S., y Marber,M.S. (2001). In vivo myocardial gene transfer: optimization and evaluation of intracoronary gene delivery in vivo. *Gene Ther.* 8, 1833-1839.
- Wu,L.W., Mayo,L.D., Dunbar,J.D., Kessler,K.M., Baerwald,M.R., Jaffe,E.A., Wang,D., Warren,R.S., y Donner,D.B. (2000). Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 275, 5096-5103.
- Yamauchi,A., Ito,Y., Morikawa,M., Kobune,M., Huang,J., Sasaki,K., Takahashi,K., Nakamura,K., Dehari,H., Niitsu,Y., Abe,T., y Hamada,H. (2003). Pre-administration of angiopoietin-1 followed by VEGF induces functional and mature vascular formation in a rabbit ischemic model. *J. Gene Med.* 5, 994-1004.
- Yamazaki,Y., Takani,K., Atoda,H., y Morita,T. (2003). Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). *J. Biol. Chem.* 278, 51985-51988.
- Yang,J.C., Haworth,L., Sherry,R.M., Hwu,P., Schwartztruber,D.J., Topalian,S.L., Steinberg,S.M., Chen,H.X., y Rosenberg,S.A. (2003). A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N. Engl. J. Med.* 349, 427-434.
- Yang,R., Thomas,G.R., Bunting,S., Ko,A., Ferrara,N., Keyt,B., Ross,J., y Jin,H. (1996). Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 27, 838-844.
- Yla-Herttuala,S., Markkanen,J.E., y Rissanen,T.T. (2004). Gene therapy for ischemic cardiovascular diseases: some lessons learned from the first clinical trials. *Trends Cardiovasc. Med.* 14, 295-300.
- Yla-Herttuala,S., Rissanen,T.T., Vajanto,I., y Hartikainen,J. (2007). Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J. Am. Coll. Cardiol.* 49, 1015-1026.
- Young,S.M., Jr., McCarty,D.M., Degtyareva,N., y Samulski,R.J. (2000). Roles of adeno-associated virus Rep protein and human chromosome 19 in site-specific recombination. *J. Virol.* 74, 3953-3966.
- Yuan,L., Moyon,D., Pardanaud,L., Breant,C., Karkkainen,M.J., Alitalo,K., y Eichmann,A. (2002). Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* 129, 4797-4806.
- Yuksel,H., Kose,C., Yilmaz,O., Ozbilgin,K., Degirmenci,P.B., Pinar,E., y Kirmaz,C. (2007). Increased expression of tissue vascular endothelial growth factor and foetal liver kinase-1 receptor in seasonal allergic rhinitis and relevance to asthma component. *Clin. Exp. Allergy* 37, 1183-1188.

Zeng,H., Dvorak,H.F., y Mukhopadhyay,D. **(2001)**. Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) peceptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 276, 26969-26979.

Zentilin,L., Tafuro,S., Zacchigna,S., Arsic,N., Pattarini,L., Sinigaglia,M., y Giacca,M. **(2006)**. Bone marrow mononuclear cells are recruited to the sites of VEGF-induced neovascularization but are not incorporated into the newly formed vessels. *Blood* 107, 3546-3554.

Zhang,D., Gai,L., Fan,R., Dong,W., y Wen,Y. **(2002)**. Efficacy and safety of therapeutic angiogenesis from direct myocardial administration of an adenoviral vector expressing vascular endothelial growth factor 165. *Chin Med. J. (Engl. )* 115, 643-648.

Zittermann,S.I. y Issekutz,A.C. **(2006)**. Endothelial growth factors VEGF and bFGF differentially enhance monocyte and neutrophil recruitment to inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 80, 247-257.

Zundel,W., Schindler,C., Haas-Kogan,D., Koong,A., Kaper,F., Chen,E., Gottschalk,A.R., Ryan,H.E., Johnson,R.S., Jefferson,A.B., Stokoe,D., y Giaccia,A.J. **(2000)**. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.* 14, 391-396.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1. Esquema de la purificación de ADN plasmídico a mediana escala mediante el juego de reactivos EndoFree Plasmid Mega Kit (Qiagen, Alemania)

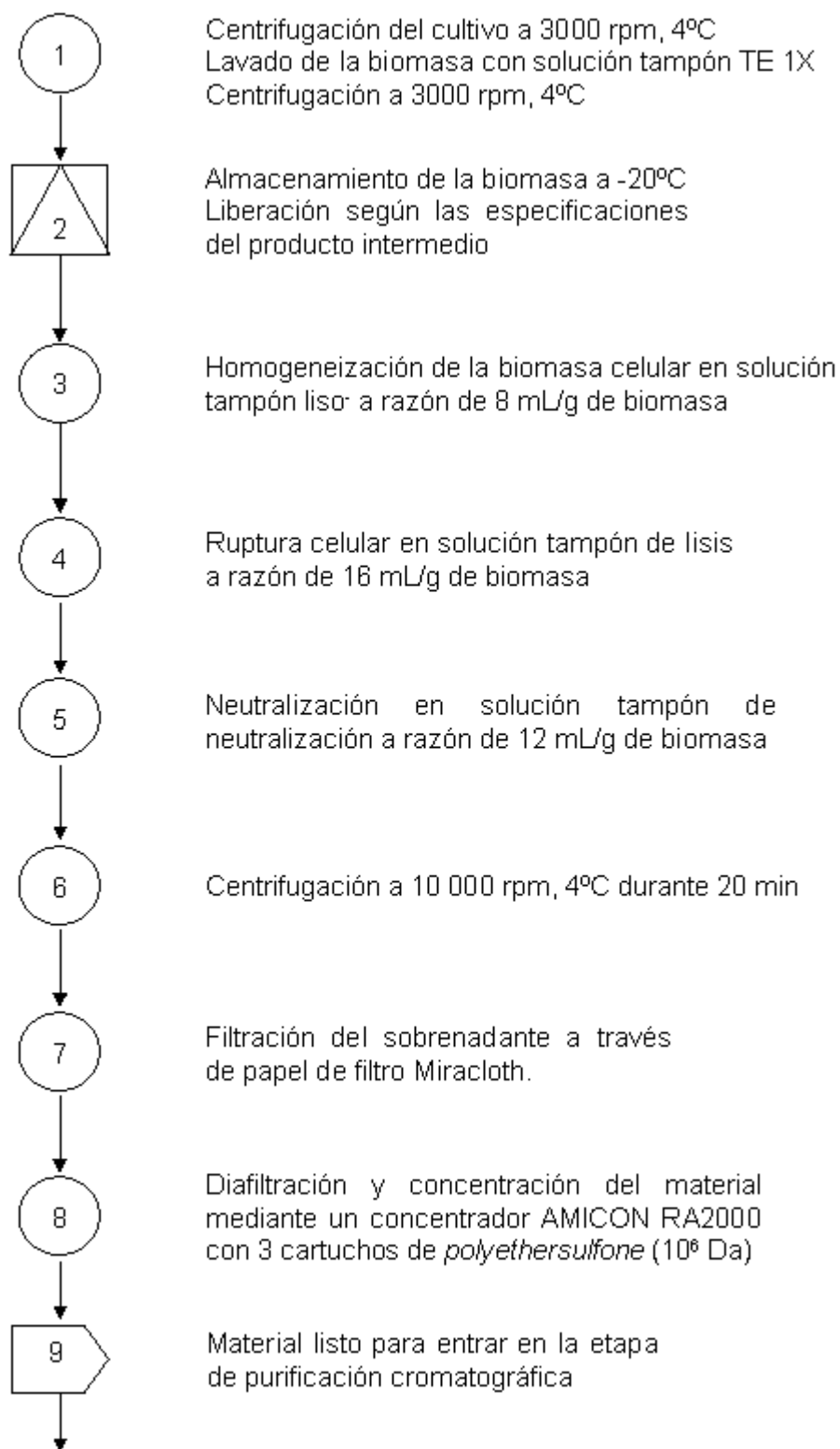
Bic

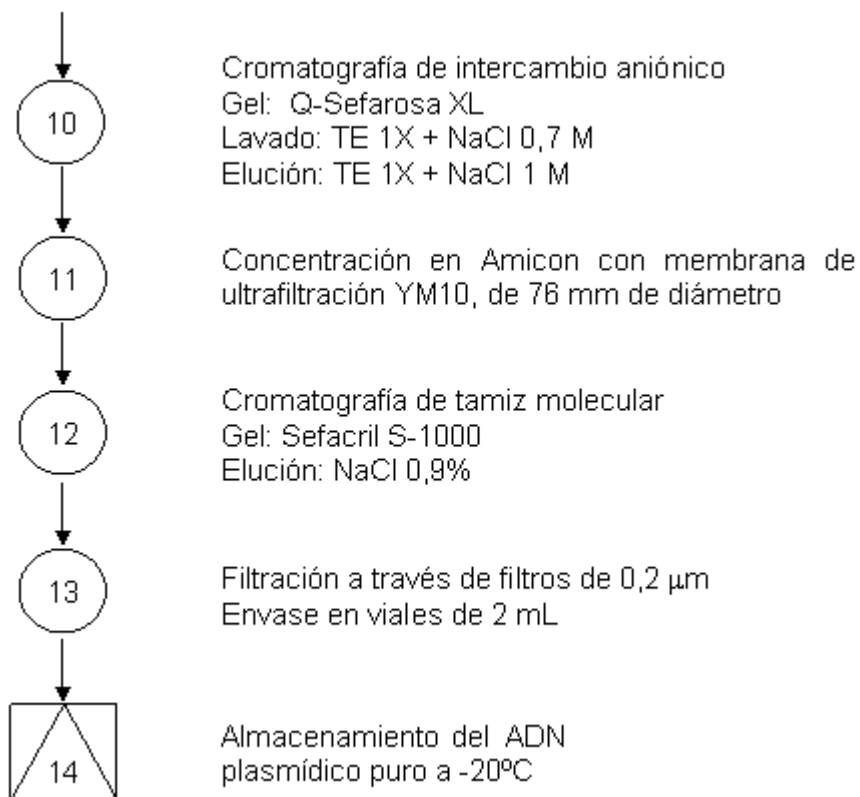
Lisado

Filt



Precipitación

**Anexo 2. Diagrama de flujo del proceso de purificación de ADN plasmídico a gran escala**



Solución tampón TE 1X: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0

Solución tampón liso-: Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8,0

Solución tampón de lisis: NaOH 0,2 M, SDS 1%, pH 12,5

Solución tampón de neutralización: KAc 5/3 M, pH 4,8

### Anexo 3. Especificaciones de calidad de los lotes de pVEGF<sub>121</sub>

Ensayo	Método	Límite de aceptación	Referencia
Características organolépticas	Inspección visual	Solución transparente, libre de partículas	PPO 4.09.140.98
Identidad (talla)	Electroforesis en gel de agarosa	4039 pb	PPO 4.09.172.96
Concentración de ADN plasmídico	Absorbancia a 260 nm	0,4-0,6 mg/mL	PPO 4.09.172.96
Porcentaje de ADN superenrollado	Electroforesis en gel de agarosa / Densitometría	≥ 90%	PPO 1.34.606.03
Contenido de ADN cromosomal de <i>E. coli</i>	Electroforesis en gel de agarosa	< 0,01 µg/µg de ADN plasmídico	PPO 4.09.172.96
Contenido de ARN	Electroforesis en gel de agarosa	No detectable	PPO 4.09.172.96
Concentración de proteínas	Ensayo del ácido bicinonínico	< 0,01 µg/µg de ADN plasmídico	PPO 4.09.065.02
Análisis de restricción	Digestión con la endonucleasa <i>EcoRI</i>	Una banda de 4039 pb	PPO 4.09.170.91
Esterilidad	Método de filtración por membrana	No crecimiento en 14 días	PPO 4.09.274.94
Pirógenos	Ensayo <i>in vivo</i> en conejos	Pasa la prueba	USP 24
Seguridad general	Ensayo <i>in vivo</i> en ratones	Pasa la prueba	USP 24
pH	Medición con pHmetro	6,6-7,3	PPO 4.09.068.92
Expresión génica	Transfección de células de mamíferos / ELISA	2 veces el valor del control negativo	Quantikine (R&D Systems, EE.UU.)
Actividad biológica	Ensayo de actividad angiogénica <i>in vitro</i> (Matrigel)	Actividad similar al estándar de referencia (VEGF <sub>121</sub> 10 ng/mL)	Benelli y Albin, 1999

PPO: Procedimiento patrón de operaciones; USP: *United States Pharmacopoeia*.

**Anexo 4. Definiciones de términos médicos**

- **Arritmia:** Cualquier alteración en la velocidad, la regularidad o la secuencia del latido cardiaco.
- **Fotopleetismografía:** Método basado en el efecto fotoeléctrico, que permite registrar el cambio de tamaño de una región determinada como consecuencia de la circulación sanguínea en ella. Al iluminar la piel, la luz que se refleja es captada por un elemento fotosensible (fotocelda o fototransistor). Esa señal eléctrica pasa a un equipo amplificador que registra la curva fotopleetismográfica. La medición permite determinar el volumen de sangre que circula por el área estudiada.
- **Infarto del miocardio:** Área de necrosis en el miocardio, como resultado de la interrupción del flujo sanguíneo al tejido, comúnmente debida a la oclusión de las arterias coronarias.
- **Shock cardiogénico:** Condición patológica caracterizada por una inadecuada perfusión de los tejidos, provocada por la disminución del volumen de sangre bombeado por el corazón, como resultado de una enfermedad cardiovascular grave, usualmente el infarto del miocardio.

## Anexo 5. Consentimiento de participación en la investigación

El que suscribe \_\_\_\_\_, está de acuerdo en participar en el ensayo clínico “Administración intramiocárdica directa de un plásmido que expresa el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular para el tratamiento de la cardiopatía isquémica crítica”. Para obtener este consentimiento he recibido una explicación amplia del Dr. \_\_\_\_\_, quien me ha informado que:

1. Presento una cardiopatía isquémica crítica. Esta es una enfermedad en la que existe una disminución del aporte sanguíneo al corazón que típicamente se caracteriza por molestia o dolor precordial que se exacerba por el ejercicio o tensión emocional y que se puede acompañar de sudoración, náuseas y/o disnea. En mi caso presento un cuadro avanzado con limitación importante de la actividad que no es posible resolver a través de procedimientos de revascularización miocárdica.
2. En el presente estudio se está investigando el efecto del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) el cual estimula el crecimiento de los vasos sanguíneos (angiogénesis). Se espera que este tratamiento sea útil para reducir la gravedad de los síntomas de la enfermedad.
3. El VEGF es un nuevo fármaco por lo que no están totalmente caracterizados los riesgos de su empleo. La información disponible actualmente con este producto proviene de estudios experimentales en animales. Los estudios internacionales realizados hasta el momento con otros productos similares han evidenciado que la administración de VEGF se tolera bien por los pacientes. Sólo se ha reportado como evento adverso arritmias durante la aplicación del producto, las cuales tienden a ser transitorias y pueden ser controladas por el especialista. Los especialistas que se ocuparán de mi tratamiento tomarán todas las medidas necesarias para que estos efectos sean mínimos.
4. Aunque hasta el momento no se ha constatado que se produzcan, teóricamente existen otros posibles riesgos:
  - La posible estimulación de la formación de vasos sanguíneos en tumores con el consiguiente desarrollo de tumores preexistentes. Aunque este efecto no se ha reportado en los ensayos clínicos, se realizarán varios estudios antes de aplicar el producto (examen de mama, tacto rectal, ultrasonido, placa de tórax, etc.) con el objetivo de identificar cualquier tumor preexistente y excluir del ensayo a los pacientes que lo porten.



- El desarrollo de aterosclerosis puede acelerarse en pacientes con la enfermedad y en riesgo de progresión. Esta reacción tampoco se ha reportado hasta este momento.
  - También es teóricamente posible que el VEGF agrave el deterioro de la visión en pacientes con diabetes mellitus. Es por ello que se excluirán del ensayo los pacientes con retinopatía. También se realizará un examen oftalmológico para detectar cualquier evidencia de cambios en el ojo.
5. En este estudio se incluirán 10 pacientes a los que se les administrará el producto en investigación, además del tratamiento convencional. La aplicación del producto se realizará de forma hospitalizada para lo cual será necesario realizar una cirugía de tórax bajo anestesia general donde se seguirán todos los cuidados establecidos por un equipo de cirujanos y de anestesiólogos, sin embargo no se está exento de complicaciones perioperatorias debido a mi enfermedad. Este procedimiento será aplicado a los 7 días del ingreso y después de la cirugía los pacientes permanecerán como mínimo 7 días en el hospital siendo evaluados clínicamente diariamente por el investigador que aplicó el tratamiento. Se empleará una dosis única de 0.5 mg del producto por inyección directa en el músculo cardíaco distribuido en cuatro puntos cercanos a la zona isquémica.
  6. El estudio comprende las siguientes evaluaciones: antes de administrar el producto, y a los 7 días, al mes, 2 meses, 3 meses y 6 meses después de la aplicación del producto. Se realizarán los siguientes estudios:
    - Tomografía computarizada y ecocardiografía. Ambas son técnicas no invasivas que permiten determinar la localización de la afección y evaluar el grado de afectación.
    - Estudios de laboratorio clínico para lo cual se requiere hacer extracciones de sangre: antes de administrar el producto y en los días 2, 4, 7, 15, 30 y 90 después de administrarlo.
  7. Se mantendrá el carácter confidencial de los datos personales del paciente, a los cuales tendrá acceso solamente el personal médico, paramédico y los monitores vinculados al ensayo.
  8. Tengo el derecho de que se me expliquen todas las inquietudes que tenga relacionadas con el estudio antes de decidir si participo o no en la investigación.
  9. La participación en el estudio es absolutamente voluntaria y el hecho de no aceptar o retirarse del estudio no afectará las relaciones con el hospital o los médicos, los que seguirán atendiendo a los pacientes según las normas habituales de esta institución hospitalaria.

10. En caso de presentarse eventos adversos, complicaciones o dudas durante el estudio puedo contactar a:

Dr. \_\_\_\_\_

Localización: \_\_\_\_\_

Y para que conste y por mi libre voluntad firmo este consentimiento, del cual se me entrega una copia, junto con el médico que me brindó las explicaciones a las \_\_\_\_:\_\_\_\_ del día \_\_\_\_ del mes \_\_\_\_ del 200\_\_.

Firma del paciente: \_\_\_\_\_

Firma del médico: \_\_\_\_\_

Nombre del testigo: \_\_\_\_\_

Firma del testigo: \_\_\_\_\_

## **Anexo 6. Clasificación funcional de la angina según la Sociedad Cardiovascular Canadiense**

**Clase I** La actividad física ordinaria, como andar o subir escaleras, no produce angina. La angina es consecuencia de ejercicios intensos, rápidos o prolongados.

**Clase II** Limitación leve de la actividad ordinaria. La angina aparece en las siguientes circunstancias: caminando o subiendo escaleras de forma rápida, subiendo pendientes, caminando o subiendo escaleras después de las comidas, con frío o viento, bajo estrés emocional o sólo durante las primeras horas del día. Bajo circunstancias normales y a un paso normal, el paciente es capaz de andar por llano más de dos cuadras y subir más de un piso de escaleras normal.

**Clase III** Limitaciones manifiestas en la actividad física ordinaria. La angina puede aparecer al andar una o dos cuadras o subir un piso de escaleras en condiciones normales.

**Clase IV** Incapacidad para desarrollar cualquier actividad sin presentar molestia. De forma ocasional, puede aparecer angina en reposo.

## **Anexo 7. Técnica quirúrgica de toracotomía**

Se aplicó anestesia general orotraqueal, se realizó un abordaje venoso profundo y 2 abordajes venosos periféricos, y se cateterizó la arteria radial para el control invasivo de la tensión arterial. Se colocó el paciente en posición decúbito lateral izquierdo con angulación de 40° posterior (posición para toracotomía anterolateral izquierda). Se practicó la asepsia y antisepsia del campo operatorio con Hibiscrub y povidona yodada, y se colocaron los paños de campo quirúrgico.

Se realizó una incisión de piel desde la línea mamilar izquierda hasta línea axilar anterior a nivel del cuarto o quinto espacio intercostal con hoja de bisturí, se profundizó por planos con electrobisturí, realizando hemostasia cuidadosa en cada plano. Se abrió la fascia endotorácica y seguidamente, la pleura parietal. Se colocó un separador de Finochietto y se abrió lentamente, separando las costillas hasta lograr el campo deseado. Se rechazó el pulmón izquierdo hacia detrás y se utilizó un separador maleable de pulmón para mantener esa posición. Se realizó la apertura del pericardio paralelo al nervio frénico en una línea del ápex a la base de la orejuela izquierda. Se expuso la cara anterolateral del ventrículo izquierdo para realizar la administración intramiocárdica del plasmidio pVEGF<sub>121</sub>.

Una vez concluida la administración, se cerró el pericardio a puntos separados de Ethibond 3/0, se colocó un drenaje torácico por contraabertura en la línea axilar media, y se cerró la pared torácica por planos. Se cubrió la herida y se conectó el drenaje torácico al sistema de evacuación por vacío y sello de agua.

El paciente fue trasladado a la Unidad de Cuidados Intensivos Postoperatorios de Cirugía Cardiovascular. La profilaxis antibiótica se realizó con cefazolina 1 g endovenoso cada 8 horas durante 72 horas (la primera dosis se aplicó en el quirófano, en el momento de la apertura del espacio pleural). Cada 1 hora se realizó el drenaje torácico y se evaluaron los signos vitales (frecuencia cardíaca, tensión arterial, presión venosa central, gasto cardíaco, presión en cuña) mediante un catéter de Swan Ganz. La diuresis horaria se evaluó mediante una sonda vesical mientras el paciente estuvo dormido e inestable hemodinámicamente. El paciente se acopló a un ventilador Servo 900 C en modalidad respiratoria de SIMV+PA. Se vigiló y se tomó la conducta apropiada en caso de presentarse arritmias, signos de bajo gasto o caída de la diuresis. El ventilador mecánico y la sonda vesical se retiraron una vez que el paciente estuvo despierto, cooperativo y hemodinámicamente estable. Los drenajes torácicos se retiraron a partir de las 48 horas del postoperatorio, cuando los drenajes fueron menores de 10 mL/h.

## Anexo 8. Clasificación de los eventos adversos

### Con respecto a la intensidad

1. **Leve:** No requiere tratamiento.
2. **Moderado:** Requiere tratamiento o modificación del esquema terapéutico.
3. **Grave:** Pone en peligro la vida del sujeto, causa la muerte, hospitalización, prolongación de la hospitalización, o produce incapacidad/invalidez.

### Con respecto a la relación de causalidad con el tratamiento en estudio

1. **Dudosa:** El evento está más probablemente relacionado con otros factores que con el medicamento implicado.
2. **Posible:** Un evento que 1) muestra una relación temporal razonable; 2) puede o no seguir un patrón de respuesta conocido a la droga en ensayo; pero que 3) puede estar producido por otros factores tales como el estado clínico del paciente o drogas concomitantes administradas.
3. **Probable:** Un evento que 1) muestra una relación temporal razonable después de la administración del medicamento; 2) muestra un patrón de respuesta conocido a la droga en ensayo; 3) no se puede explicar por otros factores tales como el estado clínico del paciente o drogas concomitantes administradas; 4) desaparece cuando se detiene su administración pero no se confirma con la reexposición.
4. **Definitiva:** Un evento que 1) muestra una relación temporal razonable; 2) sigue una respuesta conocida a la droga en ensayo; 3) no existe una explicación razonable de que sea producido por otros factores tales como el estado clínico del paciente o drogas concomitantes administradas; 4) desaparece cuando se detiene su administración y reaparece cuando se reinicia la exposición, o produce una reacción positiva en el sitio de aplicación.

### Con respecto al resultado obtenido

- |                                |   |
|--------------------------------|---|
| 1. Resuelto                    | 5. Empeoramiento                              |
| 2. Resuelto con secuelas       | 6. Hospitalización o prolongación de la misma |
| 3. Mejoría                     | 7. Peligro para la vida                       |
| 4. Evento presente sin cambios | 8. Fallecimiento                              |

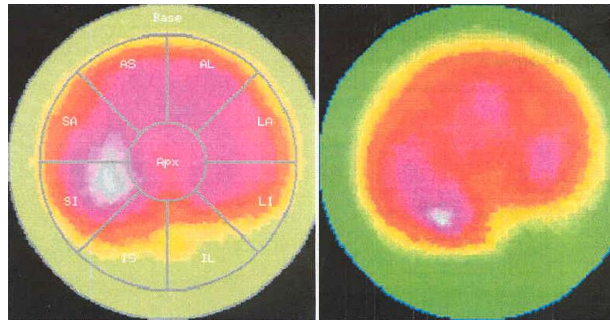
**Anexo 9. Imágenes gammagráficas de los animales correspondientes al estudio en el modelo porcino de isquemia del miocardio**

**Grupo Control**

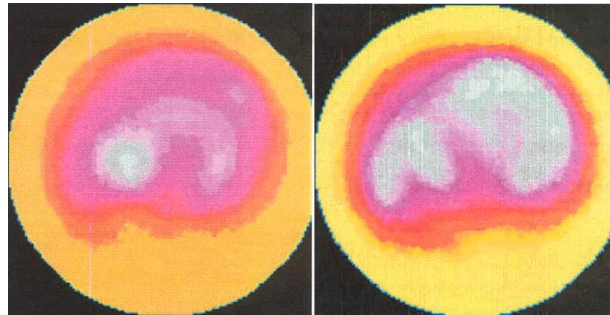
**Basal**

**Semana 4**

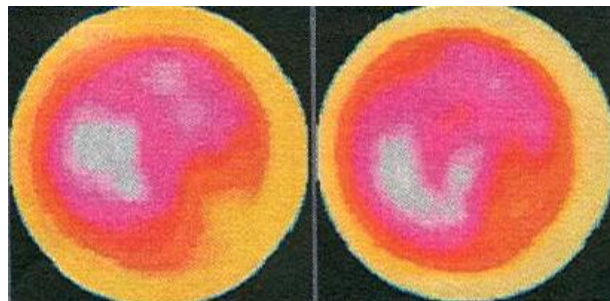
**Cerdo 02**



**Cerdo 05**



**Cerdo 07**

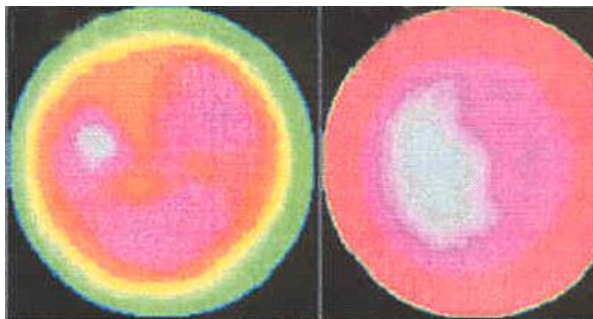


**Grupo pVEGF<sub>121</sub>**

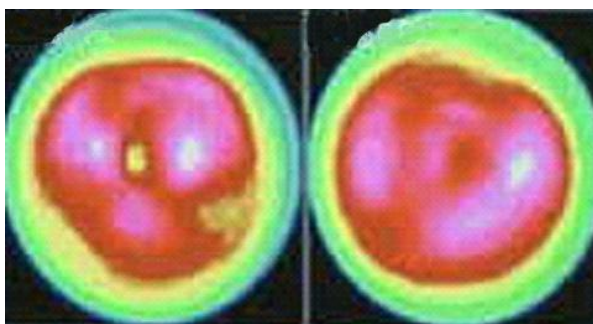
**Basal**

**Semana 4**

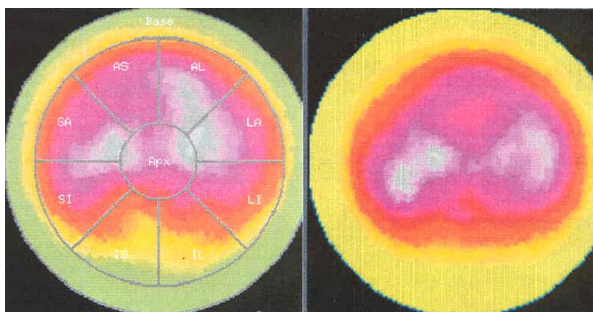
**Cerdo 01**



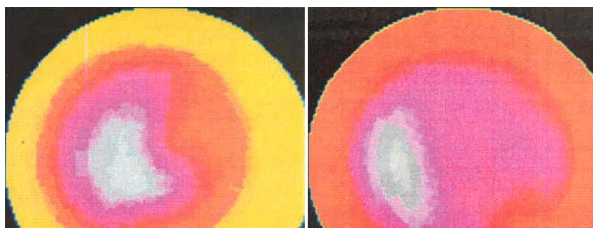
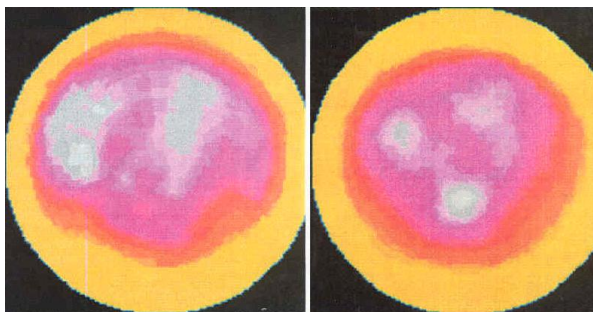
**Cerdo 03**



**Cerdo 04**



**Cerdo 06**



Anexo 10. Parámetros de laboratorio de los pacientes tratados con pVEGF<sub>121</sub>

Pacientes	Hemoglobina (g/100 mL)					Rango no patológico
	Basal	7 días	30 días	60 días	180 días	
HA01	13,9	13,3	13,1	12,6	13,1	≥ 10,0
HA02	10,2	12,2	10,8	11,6	10,8	
HA03	13,7	13,1	14,1	13,6	13,8	
HA04	11,8	-	-	-	-	
HA05	12,2	11,8	12,2	12,3	12,4	
HA06	13,3	-	-	-	-	
Pacientes	Hematocrito (%)					Rango no patológico
	Basal	7 días	30 días	60 días	180 días	
HA01	44	41	39	37	41	≥ 30
HA02	44	40	36	39	36	
HA03	42	37	42	42	43	
HA04	34	-	-	-	-	
HA05	40	36	38	38	40	
HA06	43	-	-	-	-	
Pacientes	Eritrosedimentación (mm)					Rango no patológico
	Basal	7 días	30 días	60 días	180 días	
HA01	10	12	15	13	9	2-20 (♂) 2-30 (♀)
HA02	30	15	12	20	23	
HA03	15	16	20	16	18	
HA04	14	-	-	-	-	
HA05	17	13	10	7	7	
HA06	12	-	-	-	-	
Pacientes	Leucocitos totales (10 <sup>9</sup> /L)					Rango no patológico
	Basal	7 días	30 días	60 días	180 días	
HA01	7,7	9,8	8,5	6,8	7,5	5,0-10,0
HA02	9,4	9,0	9,1	8,7	7,6	
HA03	5,5	5,3	5,8	7,7	7,5	
HA04	5,7	-	-	-	-	
HA05	9,4	8,3	8,7	7,5	7,9	
HA06	6,5	-	-	-	-	
Pacientes	Plaquetas (10 <sup>9</sup> /L)					Rango no patológico
	Basal	7 días	30 días	60 días	180 días	
HA01	317	328	305	288	239	150-350
HA02	325	331	318	320	230	
HA03	276	298	350	321	335	
HA04	175	-	-	-	-	
HA05	307	326	342	309	311	
HA06	309	-	-	-	-	



Pacientes	Neutrófilos (/L)					Rango no patológico
	Basal	7 días	30 días	60 días	180 días	
HA01	0,70	0,68	0,65	0,66	0,64	≤ 0,70
HA02	0,68	0,63	0,66	0,67	0,60	
HA03	0,69	0,65	0,50	0,66	0,63	
HA04	0,70	-	-	-	-	
HA05	0,63	0,61	0,40	0,65	0,70	
HA06	0,60	-	-	-	-	
Pacientes	Linfocitos (/L)					Rango no patológico
	Basal	7 días	30 días	60 días	180 días	
HA01	0,25	0,30	0,32	0,33	0,32	≤ 0,50
HA02	0,26	0,36	0,33	0,28	0,33	
HA03	0,28	0,33	0,45	0,28	0,35	
HA04	0,28	-	-	-	-	
HA05	0,34	0,32	0,35	0,33	0,26	
HA06	0,39	-	-	-	-	
Pacientes	Eosinófilos (/L)					Rango no patológico
	Basal	7 días	30 días	60 días	180 días	
HA01	0,00	0,02	0,02	0,01	0,03	≤ 0,10
HA02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,05	
HA03	0,00	0,01	0,03	0,03	0,01	
HA04	0,01	-	-	-	-	
HA05	0,01	0,03	0,22	0,00	0,02	
HA06	0,00	-	-	-	-	
Pacientes	Monocitos (/L)					Rango no patológico
	Basal	7 días	30 días	60 días	180 días	
HA01	0,05	0,00	0,01	0,00	0,01	≤ 0,10
HA02	0,06	0,00	0,01	0,05	0,01	
HA03	0,03	0,01	0,02	0,03	0,00	
HA04	0,01	-	-	-	-	
HA05	0,02	0,03	0,03	0,02	0,01	
HA06	0,01	-	-	-	-	
Pacientes	Basófilos (/L)					Rango no patológico
	Basal	7 días	30 días	60 días	180 días	
HA01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	≤ 0,10
HA02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	
HA03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	
HA04	0,00	-	-	-	-	
HA05	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	
HA06	0,00	-	-	-	-	

El dato señalado se encuentra fuera del rango no patológico definido para el estudio clínico.

Pacientes	Aspartato aminotransferasa (ASAT) (U/L)					Rango no patológico
	Basal	7 días	30 días	60 días	180 días	
HA01	21	22	18	21	22	≤ 35
HA02	31	35	25	25	28	
HA03	28	23	21	17	22	
HA04	14	-	-	-	-	
HA05	24	27	24	22	17	
HA06	35	-	-	-	-	
Pacientes	Bilirrubina total (µmol/L)					Rango no patológico
	Basal	7 días	30 días	60 días	180 días	
HA01	12,0	5,0	8,3	12,7	12,4	2,0-17,0
HA02	10,0	6,9	11,2	12,3	13,5	
HA03	17,0	15,4	17,0	16,6	14,0	
HA04	16,0	-	-	-	-	
HA05	6,4	6,6	6,1	7,1	7,3	
HA06	14,0	-	-	-	-	
Pacientes	Fosfatasa alcalina (U/L)					Rango no patológico
	Basal	7 días	30 días	60 días	180 días	
HA01	96	73	105	83	71	40-190
HA02	190	157	162	145	163	
HA03	133	150	172	153	137	
HA04	153	-	-	-	-	
HA05	187	164	175	132	167	
HA06	104	-	-	-	-	
Pacientes	Albúmina (g/L)					Rango no patológico
	Basal	7 días	30 días	60 días	180 días	
HA01	35	43	38	41	42	35-55
HA02	42	45	39	47	50	
HA03	47	53	52	44	48	
HA04	45	-	-	-	-	
HA05	48	43	46	50	45	
HA06	49	-	-	-	-	
Pacientes	Glicemia (mmol/L)					Rango no patológico
	Basal	7 días	30 días	60 días	180 días	
HA01	4,6	3,5	5,3	5,6	5,5	3,5-6,5 (no diabético)
HA02	5,3	7,6	4,5	7,5	6,2	
HA03	5,9	6,1	6,5	6,5	5,8	
HA04	5,3	-	-	-	-	3,5-10,0 (diabético)
HA05	6,5	5,9	6,4	6,5	6,3	
HA06	6,3	-	-	-	-	

Pacientes	Creatinina (mmol/L)					Rango no patológico
	Basal	7 días	30 días	60 días	180 días	
HA01	67	78	85	73.3	93	≤ 200
HA02	104	107	156	111	133	
HA03	76	84	87	75	83	
HA04	96	-	-	-	-	
HA05	120	127	114	113	121	
HA06	96	-	-	-	-	
Pacientes	Urea (mmol/L)					Rango no patológico
	Basal	7 días	30 días	60 días	180 días	
HA01	3,6	4,6	4,9	5,6	5,3	20,0-40,0
HA02	10,4	11,8	15,1	13,3	12,5	
HA03	5,9	6,2	5,5	4,7	5,0	
HA04	5,9	-	-	-	-	
HA05	6,8	7,3	7,5	6,7	6,4	
HA06	4,0	-	-	-	-	
Pacientes	Deshidrogenasa láctica (LDH) (U/L)					Rango no patológico
	Basal	7 días	30 días	60 días	180 días	
HA01	236	240	227	218	232	80-240
HA02	238	216	225	236	230	
HA03	222	205	212	229	224	
HA04	161	-	-	-	-	
HA05	228	233	237	240	226	
HA06	232	-	-	-	-	
Pacientes	Colesterol (mmol/L)					Rango no patológico
	Basal	7 días	30 días	60 días	180 días	
HA01	5,0	4,8	5,3	6,2	4,9	≤ 7,0
HA02	5,0	3,8	4,9	4,7	4,2	
HA03	5,3	6,4	6,7	5,6	5,6	
HA04	4,1	-	-	-	-	
HA05	3,4	3,7	3,4	4,0	4,2	
HA06	6,6	-	-	-	-	

## 10. AUTOBIBLIOGRAFÍA

### Artículos científicos

1. **Ojalvo AG**, Seralena A, Vazquez R, Montequin JF, Vispo NS, Silva R, Aldama A, Puchades Y, Sorell LT, Lopez-Saura P, Alfonso MA, Simon R, Ali A, Seuc A, Herrera L. Therapeutic angiogenesis following intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor 121 in a dog model of hindlimb ischemia. *Electronic J Biotechnol* 2003; 6: 208-222.
2. **Ojalvo AG**, Seralena A, Vispo NS, Silva R, Gonzalez N, Guevara L, Batista JF, Montequin JF, Chaos N, Gonzalez R, Reina C, Peña Y, Coca M, Perera A, Vazquez R, Puchades Y, Garcia-Osuna T, Dominguez H, Reyes JL, Ali A, Herrera L. Intramyocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor 121 improves myocardial perfusion and function in the ischemic porcine heart. *Electronic J Biotechnol* 2004; 7: 264-273.
3. González MJ, Seralena A, **Ojalvo AG**, González N, Villar A, Vispo NS, Garzón E, Chaos N, Reina C, González R, Chil R, Suárez LR, Méndez T, Senra G, Milán R, Batista JF, Peña Y, Coca M, Fleites G, Vázquez R, Betancourt BY, Guevara L, Naffe M, García E, Guillén G. Terapia génica con un plásmido que expresa el VEGF121 para el tratamiento de la cardiopatía isquémica crítica. *Biología Aplicada* 2008; 25: 16-23.

### Reportes Cortos

1. Vispo NS, **Ojalvo AG**, Seralena A, Silva R, Puchades Y, Ali A, Montequin JF, Gonzalez N, Guevara L, Chaos N, Batista JF, Peña Y, Coca M, Herrera L. Gene therapy with naked plasmid DNA encoding VEGF121 leads to revascularization of ischemic tissue in animal models of vascular diseases. *Cardiovasc Pathol* 2004; 13 (3 Suppl): S24.

### Informes técnicos

1. González MJ, **Ojalvo AG**, Seralena A, Vázquez R, Pérez M, Candelario M, Vega M, Betancourt BY, Bacardí D, Montequín JF. Expediente para la autorización de ensayos clínicos del plásmido pVEGF121 en el tratamiento de la cardiopatía isquémica e insuficiencia arterial en miembros inferiores. Informe aprobado por la Comisión de Evaluación de Informes Técnicos adjunta al Consejo Científico del CIGB. 2006.
2. González MJ, **Ojalvo AG**, Seralena A, García E, Betancourt BY. Administración intramiocárdica directa de un plásmido que expresa el factor de crecimiento del endotelio vascular para el tratamiento de la cardiopatía isquémica crítica. Informe aprobado por la Comisión de Evaluación de Informes Técnicos adjunta al Consejo Científico del CIGB. 2006.

## Eventos científico-técnicos

1. Second Interdisciplinary Euroconference on Angiogenesis. 2002. Portugal.

- **Ojalvo AG**, Seralena A, Vázquez R, Montequín JF, Vispo NS, Silva R, Aldama A, Puchades Y, Sorell LT, Lopez-Saura P, Alfonso MA, Simón R, Alí A, Seuc A, Herrera L. Therapeutic angiogenesis following intramuscular gene transfer of VEGF<sub>121</sub> in a dog model of hindlimb ischemia.
- **Ojalvo AG**, Seralena A, Vispo NS, Silva R, González N, Guevara L, Chaos N, Creach O, González R, Batista JF, Peña Y, Coca M, Perera A, Montequín JF, Sorell LT, Aldama A, Alfonso MA, García-Osuna T, Domínguez H, Reyes JL, Puchades Y, Alí A, Lopez-Saura P, Vázquez R, Herrera L. Intramyocardial delivery of naked plasmid DNA encoding VEGF<sub>121</sub> improves myocardial perfusion and function in the ischemic porcine heart.

2. 6to Congreso Latinoamericano de Inmunología. 2002. Cuba.

**Ojalvo AG**, Seralena A, Vispo NS, Silva R, Vázquez R, Puchades Y, Alí A, Lopez-Saura P, Montequín JF, Sorell LT, Aldama A, Alfonso MA, Simón R, Seuc A, González N, Guevara L, Chaos N, Creach O, González R, Batista JF, Peña Y, Coca M, Perera A, García-Osuna T, Domínguez H, Reyes JL, Herrera L. Gene therapy using naked plasmid DNA encoding VEGF<sub>121</sub> in animal models of ischemic diseases.

3. XIX Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2003. Inglaterra.

**Ojalvo AG**, Seralena A, Vispo NS, Silva R, Vázquez R, Puchades Y, Alí A, Lopez-Saura P, Montequín JF, Sorell LT, Aldama A, Alfonso MA, Simón R, Seuc A, González N, Guevara L, Chaos N, Creach O, González R, Batista JF, Peña Y, Coca M, Perera A, García-Osuna T, Domínguez H, Reyes JL, Herrera L. Gene transfer of naked plasmid DNA encoding VEGF<sub>121</sub> leads to revascularization of ischemic tissue in animal models of vascular diseases.

4. Biotecnología Habana 2003. 2003. Cuba.

**Ojalvo AG**, Seralena A, Vispo NS, Silva R, Vázquez R, Puchades Y, Alí A, Lopez-Saura P, Montequín JF, Sorell LT, Aldama A, Alfonso MA, Simón R, Seuc A, González N, Guevara L, Chaos N, Creach O, González R, Batista JF, Peña Y, Coca M, Perera A, García-Osuna T, Domínguez H, Reyes JL, Herrera L. Gene transfer of naked plasmid DNA encoding VEGF<sub>121</sub> leads to revascularization of ischemic tissue in animal models of vascular diseases.

5. XIIIth International Vascular Biology Meeting. 2004. Canada.

Vispo NS, **Ojalvo AG**, Seralena A, Silva R, Puchades Y, Ali A, Montequin JF, Gonzalez N, Guevara L, Chaos N, Batista JF, Peña Y, Coca M, Herrera L. Gene therapy with naked plasmid DNA encoding VEGF<sub>121</sub> leads to revascularization of ischemic tissue in animal models of vascular diseases.

6. XII Congreso Panamericano de Flebología y Linfología Panafleb 2006. 2006. Cuba.

**Ojalvo AG**. Estado actual de la terapia génica angiogénica en el mundo científico de hoy. [Conferencia]

7. Biotecnología Habana 2006. 2006. Cuba.

- González MJ, Seralena A, **Ojalvo AG**, González N, Villar A, Garzón E, Chaos N, Reina C, González R, Chil R, Suárez LR, Méndez T, Senra G, Milán R, Batista JF, Peña Y, Coca M, Fleites G, Vázquez R, Betancourt BY, Guevara L, Naffe M, García E, Vispo NS. Gene therapy with VEGF in ischemic diseases. Early clinical trials results.
  - Aldana L, Bacardí D, Cosme K, Urquiza D, Amaya R, Suárez J, Vázquez A, González MJ, **Ojalvo AG**, Seralena A, Vispo NS. Resultados toxicológicos de la vía intracardiaca como alternativa de inoculación del VEGF.
8. XXIV Conferencia Científica del CIMEQ. 2007. Cuba
- González MJ, Seralena A, **Ojalvo AG**, González N, Villar A, Garzón E, Chaos N, Reina C, González R, Chil R, Suárez LR, Méndez T, Senra G, Milán R, Batista JF, Peña Y, Coca M, Fleites G, Vázquez R, Betancourt BY, Guevara L, Naffe M, García E, Vispo NS. Administración intramiocárdica directa de un plásmido que expresa el factor de crecimiento del endotelio vascular para el tratamiento de la cardiopatía isquémica crítica. Ensayo clínico.
9. I Congreso del Capítulo Latinoamericano de Especialistas Vasculares Angiocaribe 2007. 2007. Cuba.
- Ojalvo AG**. Terapia génica. Estado actual. [Conferencia]
10. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2007. Suiza.
- Ojalvo AG**, González MJ, Seralena A, González N, Villar A, Garzón E, Chaos N, Reina C, González R, Chil R, Suárez LR, Méndez T, Senra G, Milán R, Batista JF, Peña Y, Coca M, Fleites G, Vázquez R, Betancourt BY, Guevara L, Nafeh M, García E, Vispo NS. Myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor for therapeutic angiogenesis in coronary artery disease.

### Logros Científicos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

1. Vázquez R, Pérez M, Brito JE, Martínez E, Páez R, Seralena A, **Ojalvo AG**, Vispo NS, Silva R, Dueñas S, Candelario M, Herrera I, Cosme K, Valdés J, Guillén G, Puchades Y, Viña A, Alvarez L, Morales J, Hernández JM, Támara Y, Rodríguez A. Establecimiento de una tecnología para la obtención de ADN plasmídico para uso terapéutico y vacunal en humanos. 2001.
2. Seralena A, Vispo NS, González N, Montequín JF, Batista JF, Vázquez R, Guevara L, Silva R, Aldama A, Candelario M, **Ojalvo AG**, Puchades Y, Pérez M, Peña Y, Coca M, González R. Obtención del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) para ser usado por primera vez en Cuba en una Terapia Génica para el tratamiento de la isquemia del miocardio y de la isquemia crítica de miembros inferiores. 2004.
3. González MJ, Seralena A, **Ojalvo AG**, González N, Villar A, Garzón E, Chaos N, Reina C, González R, Chil R, Suárez LR, Méndez T, Senra G, Milán R, Batista JF, Peña Y, Coca M, Fleites G, Vázquez R, Betancourt BY, Guevara L, Nafeh M, García E, Vispo NS. Administración intramiocárdica directa de un plásmido que expresa el factor de crecimiento del endotelio vascular para el tratamiento de la cardiopatía isquémica crítica. Ensayo clínico. 2005.

### Trabajos presentados en el Forum de Ciencia y Técnica

1. Seralena A, Vispo NS, González N, Batista JF, Montequín JF, Guevara L, Silva R, Herrera L, Cosme K, Aldama A, Peña Y, Vázquez R, Pérez M, Candelario M, Betancourt BY, López-Saura P, **Ojalvo AG**, Puchades Y, González M, Sorell L, Coca M, Perera A, González R, Chaos N, Rodríguez AM, Alfonso L, Bacardí D, Vega M, Béquet M, García-Osuna T, Domínguez H, Porras D, González F, Quesada R, Ballester A, Pérez M, Reina C, Alfonso MA, Cabrera J, Reyes JL, García J, Pichardo D, Aldana L, García V, Caro M, Lemus R. Aplicación por primera vez en Cuba en una Terapia Génica para el tratamiento de la isquemia del miocardio y de la isquemia crítica de miembros inferiores. 2004. **Relevante a nivel de Base. Destacado a nivel Municipal.**
2. González MJ, Seralena A, **Ojalvo AG**, González N, Villar A, Garzón E, Chaos N, Reina C, González R, Chil R, Suárez LR, Méndez T, Senra G, Milán R, Batista JF, Peña Y, Coca M, Fleites G, Vázquez R, Betancourt BY, Guevara L, Naffe M, Padrón S, Rodríguez L, González M, Cabrera A, Suárez J, Valdés MA, López Saura P, Campos R, Rochela L, Tápanes JL, Sáez F, García E, Cruz R, Sellén J, Rodríguez AM, Bachiller C, Perera A, Pérez M, Romero S, Márquez M, Guillén G, Herrera L, Vispo NS. Administración intramiocárdica directa de un plásmido que expresa el VEGF para el tratamiento de la cardiopatía isquémica crítica. 2006. **Relevante a nivel de Base. Relevante a nivel Municipal.**

