

Terapia génica con un plásmido que expresa el VEGF₁₂₁ para el tratamiento de la cardiopatía isquémica crítica

Martha J González¹, ✉ Alina Seralena¹, Ariana García¹, Noel González², Alejandro Villar², Nelson Santiago¹, Elba Garzón², Nicolás Chaos², Camilo Reina², Rafael González², Rigoberto Chil², Luis R Suárez², Tomás Méndez², Gerardo Senra², Reinaldo Milán², Juan F Batista³, Yamilé Peña³, Marcos Coca³, Gladys Fleites², Raisa Vázquez¹, Blas Y Betancourt¹, Luis Guevara², Manuel Naffe², Elizeth García¹, Gerardo Guillén¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, AP 6162, CP 10600, Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: alina.seralena@cigb.edu.cu

²Hospital Hermanos Ameijeiras

³Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas, CIMEQ

RESUMEN

La terapia génica para el tratamiento de la cardiopatía isquémica crítica, se usó por primera vez en Cuba en un estudio clínico piloto con seis pacientes de uno y otro sexo, cualquier raza, entre 49 y 71 años de edad, refractarios al tratamiento médico convencional, y no candidatos a procedimientos de revascularización quirúrgica o de cardiología intervencionista. El objetivo era evaluar alguna evidencia positiva de la acción terapéutica de un plásmido (pVEGF₁₂₁) que expresa la isoforma 121 del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, del inglés vascular endothelial growth factor) y valorar su seguridad. El pVEGF₁₂₁ se administró en una dosis única de 0.5 mg/1 mL, por vía intramiocárdica en 4 puntos (250 mL/sitio) en la zona isquémica, previamente definida por tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT), en el curso de una toracotomía mínima izquierda. A los seis meses, los pacientes evaluados tuvieron mejoría clínica y mostraron regresión parcial de las isquemias tratadas: un mejor estado de salud, mayor calidad de vida, y mayores posibilidades de supervivencia. Hay evidencias de los procesos de transfección y expresión del gen del VEGF. Los principales eventos adversos graves fueron dos fallecimientos por infarto del miocardio, probablemente debido a complicaciones perioperatorias por el riesgo quirúrgico y el estado crítico de estos pacientes. Varios elementos indican que la administración del pVEGF₁₂₁ por sí sola no causa eventos adversos graves, lo cual coincide con otros autores. El tratamiento a estos pacientes debe ser muy delicado, por lo que es necesario encontrar alternativas de tratamiento intramiocárdico menos invasivas que permitan la evaluación de este producto en todas las etapas.

Palabras clave: terapia génica, factor de crecimiento del endotelio vascular, estudio clínico

Biotecnología Aplicada 2008;25:16-23

ABSTRACT

Gene therapy using a plasmid that expresses the VEGF₁₂₁ for the treatment of the critical ischemic cardiopathy. Here we report, for the first time in Cuba, the use of gene therapy to evaluate the positive therapeutic action and safety of a plasmid expressing the vascular endothelial growth factor isoform 121 gene (pVEGF₁₂₁), in a pilot clinical trial of ischemic cardiac arrhythmia. Six patients irrespective of their sex or race, with ages between 49 and 71, were included. They were refractory to conventional medical treatment and discharged as candidates for surgical revascularization procedures or interventionist cardiology. The pVEGF₁₂₁ was administered as a single dose of 0.5 mg/mL, by intramyocardial route in four sites of the ischemic area (250 mL/site), previously defined by SPECT imaging by the surgical team and during a minimal left thoracotomy. Patients showed clinical improvements six months after therapy and partial regression in the treated ischemias, a better health status and quality of life, increased survival probabilities. Plasmid transfection and VEGF expression were also evidenced. The main adverse events reported comprised two deaths by myocardial infarction, probably due to perioperative complications derived from surgical risks and the critical status of the patients. Several parameters indicated that pVEGF₁₂₁ administration did not cause adverse events per se, requiring less invasive myocardial treatment alternatives to evaluate this product in other phases.

Keywords: gene therapy, vascular endothelial growth factor, clinical study

Introducción

La cardiopatía isquémica es la principal causa de muerte en el mundo desarrollado y en Cuba. Además de la terapia farmacológica, esta afección se trata mediante angioplastia coronaria transluminal percutánea y cirugía de *bypass* coronario. Aunque estos métodos son eficaces, entre el 30 y el 35% de los pacientes sufre

estenosis de los vasos coronarios, o no se logra la revascularización total, por lo que su mejoría dura muy poco [1], además de que muchos con enfermedad arterial coronaria difusa no son candidatos para estos tratamientos. Pese a recibir terapia farmacológica, unos cuantos permanecen incapacitados por frecuentes epi-

1. Lekas M, Lekas P, Latter DA, Kutryk MB, Stewart DJ. Growth factor-induced therapeutic neovascularization for ischaemic vascular disease: time for a re-evaluation? *Curr Opin Cardiol* 2006;21:376-84.

sodios de angina. Estos son pacientes en un estadio funcional III o IV, con una calidad de vida precaria, con limitaciones en la actividad física ordinaria e incapacidad para desarrollar cualquier actividad sin sentir molestias. El deterioro de su sistema cardiovascular es un peligro potencial de accidente vascular con consecuencias fatales. En las etapas finales de la falla cardíaca, estos pacientes no tienen más opción terapéutica que el trasplante de corazón, que no siempre es posible por la poca no disponerse del órgano. Aun cuando fuera posible, es necesario mantener por largo tiempo terapia inmunosupresora para evitar el rechazo, que no es el tratamiento ideal. Por lo tanto, se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento.

El proceso de angiogénesis es fisiológico y ocurre como respuesta a una isquemia o a hipoxia: se activan células endoteliales y surgen nuevos vasos endoteliales a partir de los existentes [2, 3]. En este proceso están involucrados varios factores de crecimiento: el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), angiopoyetina, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas isoforma BB (PDGF-BB, del inglés platelet-derived growth factor isoform B), el óxido nítrico y citoquinas inflamatorias, como la interleuquina-6 (IL-6) [1].

En la angiogénesis terapéutica se usan factores de crecimiento angiogénicos para estimular el desarrollo de vasos sanguíneos colaterales en tejidos isquémicos. La neovascularización inducida busca amplificar la respuesta biológica por liberación exógena de proteínas o genes, que puede ser ADN desnudo o con vectores virales. Este constituye un enfoque alternativo para el tratamiento de las insuficiencias vasculares, como la cardiopatía isquémica crítica. Numerosos estudios han descrito la terapia angiogénica con el VEGF. La administración del VEGF recombinante mejora el flujo sanguíneo al miocardio isquémico en modelos animales [4] y en pacientes con cardiopatía isquémica [5].

Para lograr la angiogénesis terapéutica se han utilizado de manera exitosa varios genes que codifican para el VEGF. En estudios preclínicos [6] y clínicos [7-19] se ha demostrado que la transferencia génica de ADN plasmídico codificante para el VEGF promueve el desarrollo de vasos colaterales en el miocardio isquémico, y los resultados clínicos han sido positivos: mejoramiento de la clasificación funcional de los pacientes, reducción en la frecuencia e intensidad de los episodios de angina y, por ende, disminución del consumo de fármacos antianginosos. Las evaluaciones imagenológicas han mostrado una reducción en la extensión y severidad de los defectos de perfusión, un incremento del flujo sanguíneo colateral a las zonas isquémicas y el mejoramiento de algunos parámetros de la función ventricular. Aunque estos son resultados alentadores, aún no se han logrado todos los beneficios para los pacientes [20], y no se ha aprobado aún el uso extensivo de la terapia génica en humanos [1].

La terapia génica con un plásmido codificante para el gen de la isoforma 121 del factor de crecimiento del endotelio vascular (pVEGF₁₂₁), habiendo demostrado la angiogénesis en modelos animales de isquemia de miembros inferiores [21, 22] fue aplicada en un estudio clínico piloto por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de Ciudad de La Habana, Cuba.

Materiales y métodos

Pacientes

Los seis pacientes para este estudio piloto no aleatorizado eran adultos, de uno y otro sexo y cualquier raza, que asistieron con cardiopatía isquémica crítica a la consulta de Cardiología del hospital Hermanos Ameijeiras. Se consideraban refractarios al tratamiento médico convencional y no eran candidatos a procedimientos de revascularización miocárdica; pero tenían áreas de miocardio isquémico tributarias de la terapia angiogénica, en las cuales se evidenció mejoría clínica, demostrada también por tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT).

El protocolo se conformó según la Declaración de Helsinki, aprobada por los comités de ética correspondientes y por la autoridad reguladora.

Criterios de inclusión

1. Pacientes con diagnóstico clínico y angiográfico de lesión vascular coronaria (cardiopatía isquémica), clase funcional III o IV, según la Clasificación de Severidad de Angina de la Sociedad Canadiense de Cardiología.
2. Demostración imagenológica de áreas de miocardio viable.
3. Pacientes refractarios al tratamiento médico convencional.
4. Angiografía coronaria: estenosis de las arterias coronarias mayor que el 70% de estrechamiento del diámetro de la luz del vaso.
5. Pacientes no candidatos a procedimientos de revascularización miocárdica (cirugía de revascularización y cardiología intervencionista).
6. Edad entre 18 y 75 años, ambas inclusive.
7. Voluntad del paciente mediante la firma del consentimiento informado.

Criterios de exclusión

1. Fracción de eyección menor del 30%.
2. Arritmias graves y sostenidas.
3. Retinopatía diabética u otra severa.
4. Evidencia de cáncer, aneurisma cardíaco, dilatación ventricular severa o signos avanzados de remodelación ventricular.
5. Parámetros de laboratorio fuera de rango.

ADN plasmídico

En el estudio se utilizó un plásmido que contenía el gen del VEGF₁₂₁, regulado por un promotor de citomegalovirus. Todos estos elementos insertados en un vector pUC19, que contenía el origen de replicación en *Escherichia coli*. El pVEGF₁₂₁ medía 4039 pb. El plásmido se preparó y purificó en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de Cuba [21].

Administración del pVEGF₁₂₁

Se administró una dosis única de 0.5 mg de pVEGF₁₂₁ en 1 mL de solución salina, con jeringuillas de 1 mL, por vía intramiocárdica, en los cuatro sitios especificados (250 µL/sitio) en la zona isquémica, previamente definida por el equipo quirúrgico, en el curso de una toracotomía mínima izquierda, sobre la base del mapeo imagenológico por SPECT.

2. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, et al. Constitutive expression of phVEGF₁₆₅ after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998;97:1114-23.

3. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001;49:507-21.

4. Lopez JJ, Laham RJ, Stamler A, Pearlman JD, Bunting S, Kaplan A, et al. VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs. *Cardiovasc Res* 1998;40:272-81.

5. Henry TD, Rocha-Singh K, Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ, Simons M, et al. Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial growth factor to patients with coronary artery disease. *Am Heart J* 2001;142:872-80.

6. Tio RA, Tkebuchava T, Scheuermann TH, Lebherz C, Magner M, Kearny M, et al. Intramyocardial gene therapy with naked DNA encoding vascular endothelial growth factor improves collateral flow to ischemic myocardium. *Hum Gene Ther* 1999;10:2953-60.

7. Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF₁₆₅ as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998;98:2800-4.

8. Symes JF, Losordo DW, Vale PR, Lathi KG, Esakof DD, Mayskiy M, et al. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann Thorac Surg* 1999;68:830-6.

9. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Kligfield PD, Okin PM, Hackett NR, et al. 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* 1999;230:466-70.

10. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, Maysky M, Esakof DD, Symes JF, et al. Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF₁₆₅ gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2000;102:965-74.

11. Lathi KG, Vale PR, Losordo DW, Cespedes RM, Symes JF, Esakof DD, et al. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease: anesthetic management and results. *Anesth Analg* 2001;92:19-25.

12. Sylvén C, Sarkar N, Ruck A, Drvota V, Hassan SY, Lind B, et al. Myocardial Doppler tissue velocity improves following myocardial gene therapy with VEGF-A₁₆₅ plasmid in patients with inoperable angina pectoris. *Coron Artery Dis* 2001;12:239-43.

13. Sarkar N, Ruck A, Kallner G, Y-Hassan S, Blomberg P, Islam KB, et al. 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* 2001;250:373-81.

Evolución de los pacientes

Parámetros para medir la seguridad

1. Evaluación clínica: a los pacientes se les hizo un interrogatorio y examen físico antes del tratamiento, durante los primeros siete días, y en consulta al transcurrir uno, dos, tres y seis meses. Los pacientes y los investigadores mantuvieron comunicación constante, de manera que se pudiera valorar cualquier evento.

2. Parámetros de laboratorio clínico: leucograma con diferencial, hemoglobina, hematocrito, eritrosedimentación, conteo de plaquetas, aspartato aminotransferasa, bilirrubina total directa e indirecta, fosfatasa alcalina, albúmina, colesterol, glicemia, creatinina, urea, lactato deshidrogenasa. Como parte de los exámenes necesarios para la cirugía, se realizó tiempo de protrombina, tiempo de coagulación por Kaolín, grupo sanguíneo y factor Rh.

3. Enzimas: creatina quinasa (CK, del inglés creatin kinase), troponina T: basal, a los 2, 7, 30 y 60 días luego de la administración del producto.

4. Electrocardiograma antes y durante la intervención quirúrgica, en los primeros siete días y a los 30, 60, 90 y 180 días después de la administración del producto.

5. Fondo de ojo, para descartar la presencia de retinopatía severa antes y después de la administración del producto.

6. Examen de mama, tacto rectal, ultrasonido abdominal y radiografía de tórax para localizar tumores preexistentes.

Los datos relacionados con la seguridad del producto se obtuvieron mediante un interrogatorio exhaustivo al paciente, que quedó en un registro de datos primarios, además del cuaderno de recogida de datos de cada paciente.

Parámetros para medir el efecto

1. Evaluación clínica que especifica el número e intensidad de los episodios de angina y el requerimiento de nitroglicerina.

2. Perfusión miocárdica: SPECT gatillado con metoxi-isobutil isonitrilo (MIBI) previo a la administración del pVEGF₁₂₁ y a los 30, 60 y 180 días después de administrado. Para el estudio imagenológico por SPECT se dividió el ventrículo izquierdo en 17 segmentos. Con el objetivo de estimar la magnitud del efecto ejercido por el pVEGF₁₂₁, el análisis se circunscribió a los segmentos de las áreas isquémicas viables. No se tuvieron en cuenta los segmentos involucrados en las zonas de infarto, puesto que el VEGF no tiene efecto sobre ellos. Además, se excluyeron 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 (mayor o igual que el 70%), a una perfusión defectuosa pero incrementada con respecto a la basal (mejoría menor que el 70%), o a una perfusión sin cambios en relación con la inicial (no mejoría).

3. Función ventricular: SPECT gatillado con MIBI antes de la intervención y a los 30, 60 y 180 días de la administración del pVEGF₁₂₁.

Cuantificación del VEGF en la sangre

Para medir los niveles de VEGF en la sangre se utilizó un método inmunoenzimático (Quantikine, R&D Systems. Human VEGF Immunoassay). Las muestras de sangre se tomaron antes de la transferencia génica, y a los 2, 4, 7 y 15 días del tratamiento.

Resultados

Características de los pacientes

La mayoría de los pacientes eran del sexo masculino (83%); el 67% era blanco y el 33% mestizo. La edad osciló entre 49 y 71 años con una media de 59.2 y una desviación estándar de 7.1.

El 83% de los pacientes había sufrido infarto agudo del miocardio, el 83% tenía antecedentes de tabaquismo, el 50% padecía hipertensión arterial, y en el 33% se evidenció hiperlipidemia. El 17% era diabético y el 67% tenía factores que predisponen la cardiopatía isquémica y desórdenes vasculares.

Curso perioperatorio

Las intervenciones quirúrgicas duraron entre 50 y 110 min, lo que significa 81 ± 23 min como promedio. La inyección intramiocárdica del pVEGF₁₂₁ duró entre 2 y 10 min, es decir, 5 ± 3 min como media.

Evaluación de la seguridad

Descripción de los eventos adversos

Un paciente con antecedentes de hipertensión arterial y estrés presentó una bradicardia con hipotensión durante el proceso de preparación anestésica. Esto se relacionó con una irritación en la colocación del catéter intracoronario. Se le administró atropina y se recuperó rápidamente. Durante el procedimiento quirúrgico se detectó un aneurisma pequeño en el ápex, que no se había detectado en los exámenes previos, por lo que se inyectó en sitios alejados del aneurisma. Al finalizar la intervención, el electrocardiograma y los niveles de troponina T del paciente eran normales. A las seis horas se retiró el entubado. A las 12 horas, este paciente sufrió un infarto agudo del miocardio diafragmático con extensión al ventrículo derecho, que no estuvo relacionado con el sitio de administración del producto. Además, tuvo disfunción sistólica del ventrículo izquierdo y edema pulmonar, al tiempo que resistió un paro cardíaco del que se recuperó. Sufrió un *shock* cardiogénico, hasta su muerte cuatro días después de la intervención quirúrgica. Como causa de muerte se reportó una complicación isquémica posterior a la intervención quirúrgica, con una cardiopatía isquémica de clase III-IV, como enfermedad de base, lo cual implicaba un alto riesgo para la cirugía. No se demostró una relación directa de la muerte con el producto, y aun cuando cualquier procedimiento intervencionista pudiera ocasionar complicaciones en pacientes en estado crítico y causar desequilibrio hemodinámico, no son elementos suficientes para establecer una relación de causalidad de la muerte con el producto administrado.

Otro paciente tuvo un infarto agudo del miocardio a las dos horas de la intervención quirúrgica, pero presentaba hipotensión arterial, taquicardia sinusal y apa-

14. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, McDonald MC, Gravelin LM, Curry CM, et al. Randomized, single-blind, placebo-controlled pilot study of catheter-based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electro-mechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2001;103:2138-43.

15. Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, Milliken CE, Fortuin FD, Cummings N, et al. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2002;105:2012-8.

16. Fortuin FD, Vale P, Losordo DW, Symes J, DeLaria GA, Tyner JJ, et al. 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* 2003; 92:436-9.

17. Kolsut P, Malecki M, Zelazny P, Tere-sinska A, Firek B, Janik P, et al. Gene therapy of coronary artery disease with phevfg 165-early outcome. *Kardiol Pol* 2003;59: 373-84.

18. Kastrup J, Jorgensen E, Ruck A, Tagil K, Glogar D, Ruzyllo W, et al. Euroinject One Group. 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* 2005; 45:982-8.

19. Reilly JP, Grise MA, Fortuin FD, Vale PR, Schaefer GL, Lopez J, et al. Long-term (2-year) clinical events following trans-thoracic intramyocardial gene transfer of VEGF-2 in no-option patients. *J Interv Cardiol* 2005;18:27-31.

20. Yla-Herttuala S, Markkanen JE, Rissanen TT. Gene therapy for ischemic cardiovascular diseases: some lessons learned from the first clinical trials. *Trends Cardiovasc Med* 2004;14:295-300.

21. Ojalvo AG, Seralena A, Vázquez R, Montequín JF, Vispo NS, Silva R, et al. Therapeutic angiogenesis following intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor 121 in a dog model of hindlimb ischemia. *Electronic J Biotechnol* 2003;6:208-22.

22. Ojalvo AG, Seralena A, Vispo NS, Silva R, González N, Guevara L, et al. Intramyocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor 121 improves myocardial perfusion and function in the ischemic porcine heart. *Electronic J Biotechnol* 2004;7:264-73.

recieron cambios electrocardiográficos de isquemia subendocárdica en la cara anterolateral, edema pulmonar y choque cardiogénico. Se observó un aumento enzimático, compatible con un infarto agudo del miocardio. Se trató de implantarle angioplastia intraluminal por catéter de balón, pero no se pudo por una obstrucción a nivel iliaco y femoral. La causa de la muerte fue el infarto del miocardio posquirúrgico (29 horas). En la necropsia se evidenció aterosclerosis severa complicada de las arterias coronarias, de la aorta y las ramas. Estos datos indican que el paciente tenía afecciones de base aún más graves que las que se evidenciaron por la clínica, los exámenes de laboratorio, el electrocardiograma y la SPECT. El infarto agudo del miocardio apareció inmediatamente después de concluida la intervención quirúrgica, el cual desencadenó las demás complicaciones del paciente.

En un caso ocurrieron arritmias antes de la administración del tratamiento, que se relacionan con el procedimiento perioperatorio, y no con el producto ni con su administración. En otro caso ocurrió la arritmia durante la aplicación del producto. Las arritmias ventriculares se reportan entre los eventos adversos atribuibles al pVEGF₁₂₁ [7, 23].

Parámetros de laboratorio clínico

En los parámetros de laboratorio no se evidenciaron cambios atribuibles a la administración del pVEGF₁₂₁.

Niveles de VEGF en la sangre

Los niveles de VEGF en la sangre se midieron en el momento basal y luego de administrar el producto a los 2, 4, 7 y 15 días. Se evidenciaron la transfección y la expresión del gen, necesarias para la acción terapéutica del producto. Los eventos adversos no tuvieron relación con la concentración del producto en la sangre, puesto que ocurrieron durante el procedimiento perioperatorio, en momentos en que no era posible aún la expresión del VEGF y su distribución en la circulación sistémica.

A los dos días del tratamiento hubo un incremento notable de los niveles de VEGF sérico, evidencia indirecta de la expresión del gen transferido. El nivel máximo del incremento de VEGF fue 4.6 ± 3.8 veces el nivel basal, y ocurrió entre los 4 y 15 días después del tratamiento. La alta variabilidad de los niveles de VEGF y de la magnitud y duración de la respuesta a la terapia se corresponde con el reporte de otros investigadores [24].

El máximo nivel medio de VEGF fue superior a 1 µg/mL y ocurrió entre los dos y cuatro días después del tratamiento, con una tendencia a la disminución, aunque sin llegar al valor basal medio hasta los 15 días, en que se hizo la última medición.

Parámetros sobre el efecto

A pesar de ser un estudio piloto en el que se evaluó una muestra muy pequeña, ya que solo se pudo seguir el curso a cuatro pacientes durante seis meses, en este artículo se describen los resultados del efecto según algunas variables.

Evaluación clínica

Episodios de angina de pecho: un mes después del tratamiento, los episodios semanales de angina de

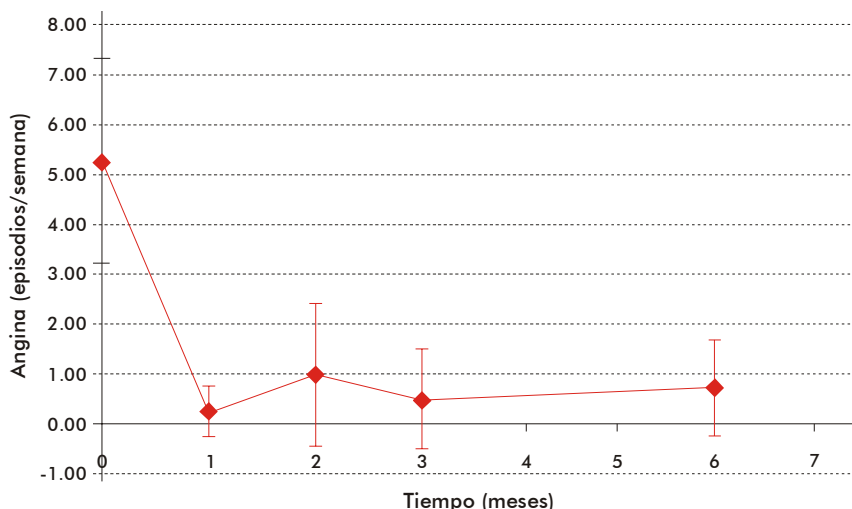


Figura 1. Episodios de angina de pecho en cuatro pacientes, luego de la terapia génica intramiocárdica con pVEGF₁₂₁. Los datos se expresan como la media $\pm$ DS.

pecho disminuyeron drásticamente, con ligeras oscilaciones a los tres y seis meses (Figura 1).

Consumo de tabletas de nitroglicerina: al mes de la terapia y hasta los seis meses, se redujo a cero el consumo de nitroglicerina; aunque a los dos meses, un paciente reportó su uso por un episodio de angina de pecho que no cedió con el reposo.

Clasificación funcional de la angina de pecho: la clasificación funcional de la angina de pecho se determinó según el interrogatorio a los pacientes. Al mes del tratamiento se observó una tendencia a la mejoría de la clase funcional casi a I, que se acentuó a los dos meses, y se mantuvo a los tres y hasta los seis meses (Figura 2).

Después de la terapia intramiocárdica con pVEGF₁₂₁, los pacientes tuvieron algunos episodios de angina de pecho; sin embargo, eliminaron el consumo de nitroglicerina casi por completo. De manera que hubo una

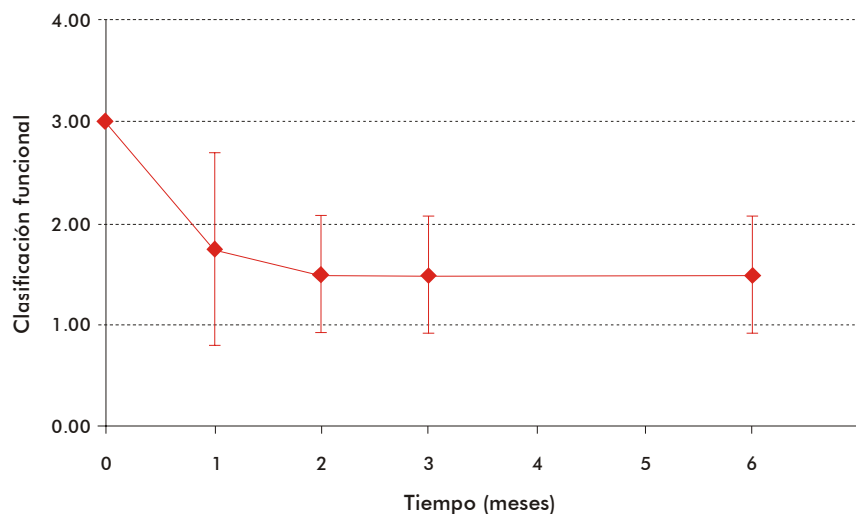


Figura 2. Clasificación funcional de la angina de pecho en cuatro pacientes tras la terapia génica intramiocárdica con pVEGF₁₂₁. Los datos se expresan como la media $\pm$ DS.

23. Losordo DW, Vale PR, Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis. *Am Heart J* 1999;138:S132-41.

24. Freedman SB, Vale P, Kalka C, Kearney M, Pieczek A, Symes J, et al. Plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) levels after intramuscular and intramyocardial gene transfer of VEGF-1 plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 2002;13:1595-603.

reducción de la intensidad de la angina de pecho, puesto que el dolor cedía con el reposo sin necesidad del medicamento, y en ocasiones ocurría en situaciones específicas como el período pospandrial, ante el estrés y ante el ejercicio de cierta intensidad, lo cual significa una mejoría de la clasificación funcional. Estas variables tienen una gran importancia porque reflejan el estado clínico del paciente y, por consiguiente, su calidad de vida.

Al inicio del estudio, el paciente HA01 sufría siete episodios de angina de pecho semanales, que solo se aliviaban con el consumo de nitroglicerina (14 tabletas/semana). Al mes del estudio terapéutico, este paciente no sufrió angina de pecho y, por ende, dejó de consumir nitroglicerina, estado que mantuvo hasta los tres meses. A los seis meses refirió una crisis anginosa por semana, que sin embargo se calmaba con el reposo, por lo que no requirió tratamiento antianginoso, y también mostró un incremento gradual de la marcha. A los seis meses redujo la distancia que caminaba sin dolor con respecto a los tres meses, que siguió siendo diez veces mayor que la condición basal. Este resultado se corresponde con la reaparición del dolor anginoso en este paciente. Teniendo en cuenta la mejoría de la clase funcional de la angina de pecho y la supresión del uso de nitroglicerina, en la evaluación final se consideró que el paciente HA01 tuvo mejoría clínica.

La angina de pecho del paciente HA02 se clasificó como funcional III. Al mes de la terapia génica intramiocárdica con pVEGF₁₂₁, se mantenía en la misma situación. A los dos meses, se pudo clasificar como funcional II, y así se mantuvo hasta los seis meses. El cambio de clase funcional de la angina de pecho significó que las limitaciones en la actividad ordinaria son leves, y que la angina de pecho solo aparecía al realizar ejercicio, en el período pospandrial o en condiciones de estrés emocional. Al inicio del estudio, este paciente sufría cuatro episodios de angina de pecho semanales, que a veces se aliviaban con el uso de nitroglicerina (1 tableta/semana). Al mes, y a los dos, tres y seis meses, los episodios de angina de pecho fluctuaron, pero las crisis cedieron con el reposo, por lo que no fue necesario el uso de nitroglicerina. No se pudo estimar la marcha, debido a que este paciente presentaba una insuficiencia arterial periférica, que interfirió en la evaluación, pues le provocaba dolor en los miembros inferiores. Como se observó una mejoría de la clase funcional de la angina de pecho y el paciente suprimió el uso de nitroglicerina, se consideró que tuvo mejoría clínica.

Al inicio del estudio, el paciente HA03 tenía angina de pecho clase funcional III. Al mes del tratamiento se clasificó como funcional II, y se mantuvo así hasta los seis meses de la evaluación. Este cambio de clase funcional significó que las limitaciones en la actividad ordinaria eran leves, y que la angina de pecho solo aparecía al realizar ejercicio, en el período pospandrial o en condiciones de estrés emocional. Al principio, este paciente sufría siete crisis anginosas a la semana, que cedían con nitroglicerina (7 tabletas/semana). Al mes, no sufría angina de pecho y dejó de consumir el medicamento. A los dos meses, refirió un episodio de angina de pecho por semana, que requirió una tableta de nitroglicerina. A partir de los tres meses y hasta el final del estudio, no sintió angina de pecho y no utilizó

más nitroglicerina. Este paciente también padecía insuficiencia arterial periférica, que le producía dolor en los miembros inferiores, lo cual interfirió en la evaluación de la distancia que podía caminar sin dolor, por lo que no se pudo hacer una estimación objetiva. Considerando la mejoría de la clase funcional de la angina de pecho y la supresión de la nitroglicerina, la evaluación final de este paciente se consideró de mejoría clínica.

Al insertarse en el estudio, el paciente HA05 tenía angina de pecho en la clase funcional III. Al mes del tratamiento, la angina de pecho se clasificó como funcional I, y así se mantuvo hasta los seis meses. Esta clasificación significó que la actividad física ordinaria: andar o subir escaleras, no le provocaba angina de pecho, sino que era consecuencia de ejercicios intensos, rápidos o prolongados. En el momento inicial, el paciente sufría tres episodios de angina de pecho semanales que cedían con el consumo de nitroglicerina. Al mes, el paciente dejó de sufrir angina de pecho y, por ende, dejó de consumir nitroglicerina, y continuó así hasta los seis meses. El paciente mostró un incremento progresivo de la marcha a lo largo del estudio hasta llegar a caminar 2 km. Teniendo en cuenta la mejoría de la clase funcional de la angina de pecho y la supresión del uso de nitroglicerina, en la evaluación final se consideró que este paciente tuvo mejoría clínica.

Evaluación de la perfusión miocárdica por SPECT gatillado

Los defectos severos y moderados de la perfusión evolucionaron de manera paulatina hacia ligeros, y finalmente, todos los defectos se hicieron ligeros; por lo que se puede inferir una mejoría tras la perfusión miocárdica.

Teniendo en cuenta que las variables analizadas son cualitativas, y que las categorías que incluyen resultaron un poco rígidas para describir pequeñas variaciones en la evolución de los pacientes, se implementó un análisis alternativo de la evolución de los segmentos cardíacos involucrados en las áreas de isquemia viable.

A lo largo del estudio, al analizar los cambios de los segmentos isquémicos tras la perfusión (Figura 3), se

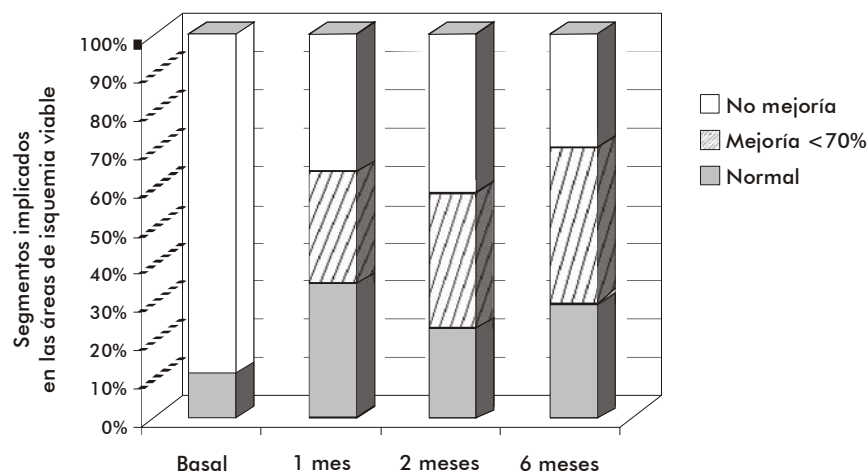


Figura 3. Cambios en las áreas isquémicas viables después de la terapia génica intramiocárdica con pVEGF₁₂₁. Los datos se expresan en el por ciento del total de segmentos de los cuatro pacientes. La evolución normal tras la perfusión se refiere a valores mayores que el 70%.

vio que de 17 segmentos, seis (35.3%) estaban normales al mes de la perfusión, cinco (29.4%) tenían cierta mejoría sin llegar a la normalidad, y seis (35.3%) no tuvieron cambios. A los dos meses, algunos segmentos regresaron a la condición isquémica. A los seis meses, cinco segmentos (29.4%) se presentaban normales tras la perfusión, y siete (41.2%) mejoraron sin llegar al 70% de perfusión. Los cinco segmentos restantes (29.4%) no revelaron mejoría. De manera que aumentaron los segmentos con algún grado de mejoría, mientras que los que no variaron durante el estudio mostraron una tendencia a disminuir.

La mejor respuesta de la perfusión se alcanzó al mes del tratamiento. A los seis meses, aunque la respuesta disminuyó con respecto a la del mes, fue superior a la condición basal. Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros grupos de investigación que han utilizado estrategias similares [8-10, 12, 14, 17].

En el momento de su inclusión en el estudio, el paciente HA01 presentaba una isquemia inferior ligera que no se modificó al mes del tratamiento. A los dos meses se reportó la regresión total de la isquemia. Sin embargo, a los seis meses la perfusión en la región isquémica cayó del 100 al 70%. La respuesta favorable de este paciente ocurrió a los dos meses y disminuyó ligeramente a los seis, aunque mantuvo una mejoría con respecto al nivel basal. En la evaluación final del paciente se estipuló una regresión parcial de la isquemia.

Al inicio de este estudio, el paciente HA02 presentaba una isquemia anteroseptal apical ligera a moderada, que mejoró al mes con una isquemia anteroseptal ligera, con recuperación de la perfusión en el ápex, por lo que se reportó como regresión parcial de la isquemia. A los dos meses esta isquemia empeoró con respecto al mes, pero mantenía la mejoría en relación con el nivel basal, puesto que el defecto no comprometía el ápex como al inicio. A los seis meses, la isquemia evolucionó a ligera, aunque no alcanzó el nivel de mejoría que se evidenció al mes del tratamiento, que fue el momento de máxima respuesta. En la evaluación final se consideró regresión parcial de la isquemia.

El paciente HA03 se insertó en el estudio con una isquemia inferior severa. Al mes de la terapia, el defecto mejoró a moderado. Sin embargo, apareció una nueva isquemia inferolateral apical ligera, no relacionada con el territorio de administración del pVEGF₁₂₁. Este nuevo defecto pudo deberse a la cardiopatía isquémica de base que presenta este tipo de paciente, la cual continúa actuando sobre la vasculatura cardíaca, independientemente de la terapia. A los tres meses la isquemia inferior continuó mejorando a ligera, mientras que la isquemia inferolateral apical se mantuvo. A los seis meses ambos defectos se reportaron como ligeros, pero se describió una mejoría notable con respecto al estudio basal. La máxima respuesta de este paciente se mantuvo desde los tres meses hasta el final del estudio, y se determinó una regresión parcial de la isquemia.

El paciente HA05 se incluyó en este estudio con una isquemia anteroseptal ligera, que no mostró variaciones al mes ni a los dos meses del tratamiento. A los seis meses se reportó una mejoría en la región tratada con respecto al estudio basal, que fue el momento de máxima respuesta. La evaluación final del paciente fue de regresión parcial de la isquemia.

Al mes de la terapia, se reportó una mejoría de la perfusión en la región inferolateral de este paciente, no relacionada con el área de inyección del pVEGF₁₂₁. Este efecto se mantuvo hasta el final del estudio, y probablemente se debió 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 pVEGF₁₂₁. De modo que se mejoró el flujo sanguíneo a esas zonas, además de las seleccionadas por los investigadores [8].

La acción paracrina del VEGF una vez expresado y secretado por los cardiomiocitos, es otra posibilidad que puede estimular la angiogénesis en otras regiones del sitio de la inyección. En los pacientes HA02 y HA03 se observaron efectos similares. El primero recibió la inyección en la zona anteroseptal apical, y experimentó mejoría de la región inferior media. El segundo, que recibió el tratamiento en la cara inferior, presentó mejoría en las regiones anteroseptal basal e inferolateral basal. Estas mejorías fueron adicionales a las encontradas en las zonas en que se aplicó el tratamiento.

Es importante reiterar que las regiones necróticas no viables, correspondientes a los infartos anteriores sufridos por los pacientes, no experimentaron ninguna mejoría.

Siguiendo la evolución de los segmentos cardíacos implicados en las áreas de isquemia viable, el paciente HA01 comenzó en el estudio con un segmento isquémico que a los seis meses tenía perfusión normal. El paciente HA02 se incluyó en este estudio con cinco segmentos afectados, dos de los cuales se normalizaron, uno mejoró sin llegar al 70% de perfusión, y los otros dos no mejoraron. Al inicio, el paciente HA03 tenía dos segmentos con perfusión normal, que se convirtieron en isquémicos; además de cinco segmentos que inicialmente estaban afectados, de los cuales uno se normalizó y los otros cuatro tuvieron alguna mejoría sin llegar a la normalidad. El paciente HA05 comenzó con cuatro segmentos isquémicos, de los cuales uno se normalizó, dos mejoraron sin llegar al 70%, y uno no mejoró. En todos los casos hubo un grado de mejoría y de normalización de la perfusión.

Estos resultados se circunscriben a la evolución de los pacientes hasta los seis meses, pero es preciso emprender estudios posteriores con más pacientes, y evaluar su evolución durante más tiempo.

Debemos señalar que el VEGF₁₂₁ crea una neovascularización colateral que mejora la irrigación en la zona isquémica, pero estos vasos no son robustos. Además, los factores de riesgo (hipertensión arterial y la diabetes) que predisponen a los pacientes a la arteriopatía, continúan incidiendo independientemente de la terapia, lo cual podría explicar que algunos segmentos que mejoran con el tiempo regresen a la condición isquémica.

Evaluación de la función ventricular por SPECT gatillado

En la función ventricular no se observaron cambios, lo cual coincide con estudios en los que no se evidencian cambios significativos en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, a pesar las evidencias clínicas e imagenológicas de mejoría de los pacientes [7, 15].

Es importante destacar que la función ventricular es una variable global, que abarca todas las zonas del

ventrículo izquierdo, no solo las isquémicas, sino también las necróticas, correspondientes a los infartos anteriores sufridos por los pacientes. La presencia de defectos de perfusión de gran extensión y la severidad de los infartos, sobre los cuales el producto no ejerce su acción terapéutica, puede determinar que no mejore la función global del ventrículo, aunque mejore el área isquémica tratada.

Discusión

La administración intramiocárdica del pVEGF₁₂₁ a pacientes con cardiopatía isquémica crítica se realizó durante una toracotomía que, como toda intervención quirúrgica, es un procedimiento invasivo que requiere la administración de anestésicos, además de que conlleve otros riesgos quirúrgicos. Teniendo en cuenta el estado hemodinámico delicado de estos pacientes, cualquier proceder quirúrgico implica un riesgo significativo.

Uno de los aspectos esenciales que influyen en los resultados con la terapia génica es la selección de los pacientes [1]: las condiciones deterioradas de salud que exhiben y la refractariedad al tratamiento médico convencional hacen que una intervención quirúrgica, aún por toracotomía, implique riesgos de complicaciones perioperatorias, descritos en el consentimiento informado de los pacientes.

Los estudios preclínicos que sustentan los elementos de seguridad y eficacia de los factores de crecimiento para la formación de nuevos vasos sanguíneos, se realizan en animales jóvenes, sanos, sin factores de riesgo por enfermedades cardiovasculares, lo cual no ocurre en la práctica, en que los pacientes no tienen opciones terapéuticas, y en muchos casos padecen aterosclerosis avanzada [1].

Algunos autores han evaluado el efecto beneficioso del VEGF combinado con la angioplastia transluminal percutánea o el *bypass* coronario [1, 9]. En tales casos el paciente deberá ser tributario de alguna de estas cirugías y los beneficios que se obtengan siempre superarán el riesgo quirúrgico.

Para tratar con factores de crecimiento los grupos que han llegado a fases de evaluación más avanzadas (II y III), se utiliza un sistema por catéter que es menos invasivo, mediante el cual se libera el producto en el sitio de la isquemia y se realizan ensayos a ciegas, para evitar así las complicaciones por la toracotomía [25].

El mejoramiento de los parámetros clínicos es el objetivo fundamental de la terapia génica. Por el estado de salud inicial de los pacientes, los cambios en cualquiera de estas variables ofrecen una idea de la eficacia del producto. En este estudio, las evidencias del efecto del uso del VEGF, coinciden con las de estudios similares que reportan una mejoría clínica [7-10, 12, 14-17, 19].

La dosis de administración del producto es uno de los aspectos más discutidos en relación con el efecto. Se ha estudiado la administración de diferentes dosis, y en estos momentos se están reclutando los pacientes para la administración de 2 mg del VEGF, y tratar de incrementar los efectos beneficiosos [1] evidenciados en el ensayo EUROINJET-1 [25], en que solo se inyectaron 500 µg del VEGF₁₆₅.

La vía de administración también es importante. La administración en el tejido isquémico, es decir, intramio-

cárdico, mostró los mejores resultados, posiblemente porque existe un efecto sinérgico con la revascularización endógena, provocado por la isquemia que potencia el efecto [1].

Las estrategias futuras apuntan a la estimulación conjunta de la angiogénesis y la arteriogénesis para el tratamiento de las enfermedades isquémicas. La neovascularización del músculo isquémico requiere la coordinación de ambos procesos [26]. Los vasos neoformados por el proceso de angiogénesis, a partir de los preexistentes en el tejido isquémico, no son robustos, y a largo plazo, los pacientes se afectan por los factores de riesgo que acompañan a las enfermedades vasculares.

La arteriogénesis es el desarrollo o alargamiento de las arteriolas colaterales, como respuesta adaptativa a la oclusión arterial, por un proceso *de novo* a partir de los precursores endoteliales circulantes. A diferencia de la angiogénesis, no hay isquemia en el tejido en que ocurre, y no se induce por la hipoxia [27, 28]. La arteriogénesis ocurre en regiones proximales con respecto al tejido que está en angiogénesis activa [26]. Varias proteínas parecen tener este efecto: proteína quimioatrayente de los monocitos [29, 30], factor de crecimiento transformante beta [31], factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos [32], FGF-1, FGF-2 y PDGF-BB [33]. Las estrategias de administración combinada de factores que estimulen la arteriogénesis y la angiogénesis podrían ser más exitosas [34].

Como perspectiva de tratamiento se ha sugerido la terapia con células progenitoras endoteliales circulantes, ya que estas podrían tomar parte en la angiogénesis, además de recuperar el endotelio después de una lesión [35]. Cuando se administraron células endoteliales progenitoras en modelos animales de infarto del miocardio, se indujo una neovascularización significativa y una reducción de la apoptosis, y hubo una mejoría de la función cardíaca. Las diferentes subpoblaciones derivadas de la médula ósea secretan factores angiogénicos tales como VEGF, FGF, factor de crecimiento de hepatocitos y angiopoietina-1, que desempeñan una función vital en la neovascularización. Estos efectos cardioprotectores y el grado de neovascularización son dependientes del número de células liberadas [36].

Cuba cuenta con un desarrollo tecnológico eficiente para obtener el pVEGF₁₂₁ y una adecuada infraestructura médico-asistencial para desarrollar este proyecto. En este momento se estudian los problemas reportados por otros grupos; pero es imperioso buscar estrategias que determinen si la terapia génica es una alternativa terapéutica en los desórdenes vasculares, y que disminuyan significativamente la primera causa de morbilidad y mortalidad en Cuba y en el mundo desarrollado.

Conclusiones

Los principales eventos adversos en este estudio de terapia génica con un plásmido que expresa el VEGF₁₂₁ para el tratamiento de la cardiopatía isquémica crítica, estuvieron relacionados con el procedimiento de administración y con la severidad de la enfermedad de base de estos pacientes. Hubo evidencias de que ocurrió la transfección y la expresión del gen del VEGF, y del

25. Gyongyosi M, Khorsand A, Zamini S, Sperker W, Strehlow C, Kastrup J, et al. NOGA-guided analysis of regional myocardial perfusion abnormalities treated with intramyocardial injections of plasmid encoding vascular endothelial growth factor A-165 in patients with chronic myocardial ischemia: subanalysis of the EUROINJECT-ONE multicenter double-blind randomized study. *Circulation* 2005; 112:1157-65.

26. Scholz D, Ziegelhoeffer T, Helisch A, Wagner S, Friedrich C, Podzuweit T, et al. Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hind-limb perfusion in mice. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34:775-87.

27. Ito WD, Arras M, Scholz D, Winkler B, Htun P, Schaper W. Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol* 1997;273:H1255-65.

28. Deindl E, Buschmann I, Hofer IE, Podzuweit T, Boengler K, Vogel S, et al. Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res* 2001;89:779-86.

29. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 1998;101:40-50.

30. Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W. Monocyte chemoattractant protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res* 1997;80:829-37.

31. Feinglass J, Brown JL, LoSasso A, Sohn MW, Manheim LM, Shah SJ, et al. Rates of lower-extremity amputation and arterial reconstruction in the United States, 1979 to 1996. *Am J Public Health* 1999; 89:1222-7.

32. Seiler C, Pohl T, Wustmann K, Hutter D, Nicolet PA, Windecker S, et al. Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation* 2001;104:2012-7.

33. Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1143-51.

34. Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, et al. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med* 2003;9:604-13.

35. Shantsila E, Watson T, Lip GY. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:741-52.

36. Ang KL, Shenje LT, Srinivasan L, Galinanes M. Repair of the damaged heart by bone marrow cells: from experimental evidence to clinical hope. *Ann Thorac Surg* 2006;82:1549-58.

efecto de su administración, ya que hubo una mejoría clínica de los pacientes en el período evaluado y una regresión parcial de las isquemias tratadas, aunque la función ventricular no mejoró. La aplicación del VEGF₁₂₁ por otras vías de administración podría dar evidencias concluyentes sobre esta terapia.

Recibido en abril de 2007. Aprobado en marzo de 2008.

Agradecimientos

Se agradece a todas las personas e instituciones que participaron en este estudio, al grupo de Anestesia del hospital Hermanos Ameijeiras, al hospital Carlos J. Finlay, al Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas (CIMEQ) y al hospital Calixto García.