

Trabajos de revisión

Hospital Clínicoquirúrgico «Hermanos Ameijeiras»

Terapia angiogénica en el tratamiento de la cardiopatía isquémica

Dr. Alejandro Villar Inclán¹

RESUMEN

Se realizó un recorrido por la historia del uso de los factores de crecimiento y se analizaron los conceptos de angiogénesis, arteriogénesis y vasculogénesis. Se señalaron los diferentes factores de crecimiento que se conocen y se hizo especial énfasis en los más utilizados (factor de crecimiento endotelial vascular y el factor de crecimiento fibroblástico). Se analizaron las diferentes vías de aplicación de estos, así como la forma de administración (proteica o génica). Realizamos un recuento de los diferentes estudios preclínicos y clínicos con el uso de estos factores de crecimiento para el tratamiento de la cardiopatía isquémica. De los diferentes estudios se recogieron las posibles complicaciones del uso de estos factores, llegamos a conclusiones y planteamos recomendaciones.

Palabras clave: Factores de crecimiento, angiogénesis, factor de crecimiento endotelial vascular.

En los últimos años, una parte importante de las investigaciones se ha centrado en la administración de factores de crecimiento angiogénicos para promover el desarrollo de vasos sanguíneos colaterales suplementarios que actuarían como conductos de derivación endógenos alrededor de las arterias nativas ocluidas, lo cual se conoce como *angiogénesis terapéutica*. En un número considerable de ensayos preclínicos de isquemia esta estrategia ha demostrado aumentar la perfusión tisular mediante neovascularización. En pacientes con isquemia crítica de las extremidades inferiores o con enfermedad arterial coronaria terminal, los ensayos clínicos han demostrado una mejoría sintomática y han aportado una evidencia objetiva de mejorar la perfusión, lo que sugiere que esto pudiera constituir un

método alternativo de tratamiento en pacientes en los que las terapias actualmente disponibles han fallado o no son viables.

Los próximos objetivos de la investigación en el campo de la angiogénesis van a encaminarse a determinar las dosis óptimas de utilización, la ruta de administración, el uso de la combinación de factores de crecimiento, el uso de células madres con factores de crecimiento y a proporcionar una angiogénesis terapéutica efectiva y segura, así como a adaptar la angiogénesis a las necesidades individuales de los pacientes.

El término *angiogénesis terapéutica* fue sugerido inicialmente por *Hockel* y colaboradores en 1993,¹ quienes lo utilizaron para describir la inducción o estimulación de neovascularización orientada al tratamiento o prevención de situaciones patológicas caracterizadas por hipoperfusión local o regional. Es decir, representa el uso terapéutico de agentes biológicos, materiales bioactivos o condiciones del medio ambiente destinados a estimular el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos con el fin de restaurar o aumentar la perfusión de determinados tejidos, revertir la isquemia o acelerar la cicatrización.

La angiogénesis como tal fue documentada en 1935 por el patólogo *Arthur Hertig*, en la descripción de la formación de nuevos vasos sanguíneos en la placenta;² mientras que en 1945, *Algire* y *Chalkley*, basándose en observaciones microscópicas del comportamiento de xenoinjertos tumorales implantados en ratones, propusieron que el crecimiento de tumores sólidos dependía del desarrollo de un nuevo abastecimiento vascular derivado del huésped.³ Por otro lado, *Folkman*,⁴ hace como 30 años, sugirió las nuevas implicaciones terapéuticas de la inhibición del proceso angiogénico en pacientes oncológicos.

En la tabla 1 ponemos a su consideración un cronograma del proceso del conocimiento y del uso de los factores de crecimientos.

Tabla 1. *Historia de los factores de crecimiento*

1935	El término de angiogénesis lo acuñó el patólogo Arthur Herting para describir la formación de nuevos vasos en la placenta.
1939	Ide y cols. postularon la existencia de un factor de estimulación de crecimiento de vasos sanguíneos derivados del tumor.
1948	Michaelson propuso que un factor angiogénico, «factor X», producido por la retina, era el responsable de la neovascularización de la retina que ocurre en la retinopatía diabética.
1968	Primer experimento de prueba directa de la hipótesis de que los tumores producían factores angiogénicos.
1971	Folkman propone que la antiangiogénesis pudiera ser una vía alternativa para el tratamiento del cáncer.
1983	Singer describe el factor de permeabilidad vascular del tumor (VPF).
1985	La secuencia del factor de crecimiento de fibroblasto (FGF) fue reportada.
1989	Ferrara y Henzel hablan por primera vez del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), mientras que Conolly reporta que el VEGF y el VPF son la misma molécula.

1992	Primeros estudios en animales con el uso del FGF, que demostraron el efecto de angiogénesis.
1993	Hockel sugiere el término de angiogénesis terapéutica con el objetivo de estimular la neovascularización en situaciones de hipoperfusión.
1995	Isner y cols. publicaron los ensayos clínicos realizados con la aplicación de factores de crecimiento en isquemia de miembros inferiores.
1994	Takehita y cols. hablan sobre el uso del VEGF en isquemia de miembros inferiores del conejo.
1998	Administración del VEGF en animales, como el puerco, para modelos de isquemia miocárdica.
1998	Schumacher publicó la primera terapéutica angiogénica en la cardiopatía isquémica en seres humanos, con el uso del FGF junto con revascularización coronaria, mientras Losordo lo publica con el uso del VEGF 165.

ANGIOGÉNESIS, ARTERIOGÉNESIS Y VASCULOGÉNESIS

Se han definido tres términos que supuestamente hacen referencia a procesos distintos involucrados en los mecanismos del desarrollo vascular: angiogénesis, arteriogénesis y vasculogénesis.⁵

Se acepta el término *angiogénesis* como el desarrollo de nuevos vasos de pequeño calibre que emergen en forma de brotes a partir de capilares o vénulas poscapilares preexistentes y que están compuestos sólo por una capa delgada de endoteliositos.^{6,7}

La *arteriogénesis*, se refiere al desarrollo de vasos de mayor calibre, con una túnica media bien desarrollada que rodea a los endoteliositos y que está compuesta por células musculares lisas. Por lo tanto, estos vasos constituyen arteriolas o vasos arteriales y crecen a partir de anastomosis arteriolas preexistentes.⁵ Este es el proceso en el que está involucrado el desarrollo de la llamada circulación colateral epicárdica.^{8,9}

El término *vasculogénesis*, en cambio, ha sido reservado para el desarrollo embriológico de grandes vasos sanguíneos a partir de las células mesenquimáticas o células precursoras inmaduras (hemangioblastos o angioblastos).¹⁰ Sin embargo se ha comprobado recientemente que este proceso no es exclusivo del desarrollo prenatal temprano, como antes se creía, sino que también puede ocurrir en la vida posnatal,^{11,12} por ejemplo, en el ciclo endometrial, en el desarrollo placentario, en el miocardio isquémico o en miembros con arteriopatía periférica grave.¹³

Los mecanismos señalados anteriormente son a los que recurre el corazón para compensar la enfermedad isquémica. Por lo tanto, estos fenómenos cumplen un rol adaptativo muy importante en pacientes con cardiopatía isquémica de larga duración, en los cuales la circulación colateral mantiene un flujo indispensable para suplir las demandas cardíacas en reposo.¹⁴ Las consecuencias de la enfermedad cardíaca isquémica dependerán del tiempo de

progreso de la enfermedad¹⁵ y del desarrollo de una circulación colateral.¹⁶ El objetivo de la angiogénesis terapéutica es controlar estos fenómenos complejos en bienestar del paciente.

En la tabla siguiente mostramos las diferencias, a grandes rasgos, entre los procesos de vasculogénesis, arteriogénesis y angiogénesis

Tabla 2. *Diferencias entre vasculogénesis, arteriogénesis y angiogénesis*

	Vasculogénesis	Arteriogénesis	Angiogénesis
Células envueltas	Células endoteliales, madres	Células endoteliales, músculo liso, pericitos, otras	Células endoteliales
Estímulo primario	Desarrollo	No conocido (¿inflamación?)	Isquemia, inflamación
Resultados finales	Formación de un vaso sanguíneo	Arteriola	Capilar
Ocurre en tejido adulto	No está claro (mínimo)	Sí	Sí
Contribuye a la perfusión efectiva	No está claro (mínimo)	Mayor	Menor
Factores envueltos	VEGF, Ang-1, Ang-2	PDGF, Ang-1, Ang-2, ¿FGF?	FGF 1,2,4,5 VEGF 1,2,3

LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento (FC) son moléculas que regulan la migración, proliferación, diferenciación y crecimiento celular, y están codificados por ciertos protooncogenes. Estas moléculas cumplen su función tanto paracrina como autocrina. Al ser activados, los receptores específicos para los FC generan una cascada intracelular de transducción de señales en la que participan otras moléculas llamadas *segundos mensajeros*. Generalmente, el paso final es la activación de factores de transcripción que regulan la transcripción y la traducción de genes específicos.¹⁷

Existen diversos FC que están involucrados en el proceso angiogénico,¹⁸ ya sea estimulándolo o inhibiéndolo. Además, algunos FC actúan de manera sinérgica o cooperativa para inducir la formación de nuevos vasos.¹⁹

Un delicado y dinámico balance entre estos péptidos estimuladores e inhibidores mantiene una estrecha regulación del complejo proceso.²⁰ Los FC son también importantes mediadores que intervienen en los procesos de inflamación, cicatrización y remodelamiento tisular.²¹⁻²³ Más aún, los resultados de estudios recientes sugieren que el proceso angiogénico depende necesariamente de la presencia de células inflamatorias.²⁴⁻²⁷

Actualmente, la metodología utilizada en la terapia angiogénica de las enfermedades cardiovasculares está destinada a modular la acción de los factores de crecimiento.²⁸ A pesar de que el proceso angiogénico está, como ya dijimos, altamente regulado,

aparentemente sólo el aumento de la concentración de un FC ('upregulation') es suficiente para activar toda la cascada de eventos necesarios para el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos.²⁹

De todos los factores angiogénicos conocidos, los más utilizados a nivel experimental son los factores de crecimiento fibroblástico (FGF, del inglés 'fibroblast growth factor') y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, del inglés 'vascular endothelial growth factor').

FACTORES DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO

Los factores de crecimiento fibroblástico son una gran familia de proteínas con propiedades mitogénicas, genéticamente relacionadas³⁰ y con alta afinidad por la heparina (HBGF, del inglés 'heparin-binding growth factors').³¹

Estas moléculas comparten características estructurales, bioquímicas y funcionales, y poseen la capacidad de estimular diferentes tipos celulares, incluyendo células endoteliales, células del músculo liso vascular, fibroblastos, miocardiocitos y ciertas células tumorales.³² Todas estas células expresan por lo menos uno de los cuatro receptores tirosina-cinasa (FGFR, del inglés 'fibroblast growth factor receptor' = receptor para el FGF) conocidos hasta el momento: FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 y FGFR-4.^{30,33} Estas proteínas transmembrana son conocidas como receptores de alta afinidad para el FGF.

Los prototipos de esta familia son los dos primeros péptidos descritos: el FGF ácido (aFGF) y el FGF básico (bFGF).³⁴ Estas proteínas de cadena única son conocidas actualmente como FGF-1 (de 154 aminoácidos) y FGF-2 (de 146 aminoácidos), respectivamente, y son los dos factores de crecimiento fibroblástico más utilizados en los estudios experimentales de angiogénesis terapéutica. Con respecto a los otros miembros de esta familia, existen por lo menos 18 péptidos caracterizados: los factores de crecimiento fibroblástico «oncogénicos» (FGF-3, FGF-4, FGF-5 y FGF-6), los factores de crecimiento de queratinocitos (FGF-7, FGF-8, FGF-9 y FGF-10) y los factores de crecimiento fibroblástico «huérfanos» (FGF-11 a FGF-18, acerca de cuya función biológica no hay certeza).³²

El efecto angiogénico de los prototipos de esta familia de FC (FGF-1 y FGF-2) es uno de los más documentados, ya que su papel en todas las etapas de la neoformación vascular es destacada por un lado, estimula la producción de enzimas proteolíticas necesarias para la lisis de la membrana basal y de la matriz extracelular; y por otra parte, estimula la proliferación y migración de las células endoteliales e induce su organización tubular.³²

La combinación *in vitro* de bFGF y de VEGF representa, quizás, el más poderoso estímulo angiogénico conocido hasta la fecha.^{35,36} Además, el bFGF estimula la expresión de VEGF.³⁷

EL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es una glucoproteína homodimérica de 34 a 46 kD, también mitogénica pero de acción casi exclusiva sobre las células endoteliales, las cuales expresan los receptores específicos VEGFR-1,^{38,39} quien genera señales de ensamblaje de las células endoteliales en tubos y vasos funcionales, VEGFR-2^{40,41,42} responsable de la proliferación y migración y el VEGFR -3^{43,44} que media la linfangiogénesis.

Anteriormente, este péptido era conocido como vasculotropina o factor de permeabilidad vascular (VPF, del inglés 'vascular permeability factor')^{45,46} debido a su propiedad de inducir aumento de la permeabilidad de los lechos capilares.

El VEGF/VPF estimula la proliferación y migración de células endoteliales y su organización tubular⁴⁷ e inhibe la apoptosis de esta células, aparentemente por medio del estímulo de la expresión endotelial de una integrina llamada *α_vβ₃* (receptor para vitronectina).⁴⁸ Mediante el estímulo de esta integrina,⁴⁹ preserva la señal de supervivencia generada por la adhesión de las células endoteliales a su matriz extracelular. Esta reducción de la apoptosis complementaría el efecto mitogénico del VEGF y conduciría a una mayor viabilidad de las células endoteliales.⁴⁸

Además, el VEGF, como ya fue mencionado,^{45,46} regula la permeabilidad vascular,⁵⁰ favoreciendo la extravasación de proteínas y permitiendo así la formación de un gel de fibrina apto para la migración y organización de las células endoteliales. Estimula también la expresión y liberación de diferentes enzimas proteolíticas necesarias para la lisis de la membrana basal y de la matriz extracelular,⁴⁷ la cual al ser degradada va dejando el espacio necesario para ser ocupado por los nuevos vasos.

Por otra parte, ciertos estudios experimentales muestran que el VEGF favorece el crecimiento del endotelio tras una angioplastia, es decir que acelera la reendotelización después de una lesión.^{51,52} Esto protegería al vaso de la hiperplasia intimal y del remodelamiento.⁵³ También, otros FC como los FGF 1 y 2 son potenciales agentes terapéuticos en la lesión vascular.⁵⁴ Sin embargo, algunos autores sostienen que los FGF y el VEGF promueven la hiperplasia de la íntima.⁵⁵⁻⁵⁷

Al VEGF-A puede encontrarse naturalmente en 5 diferentes isoformas que se denominan, según la cantidad total de aminoácidos de la cadena polipeptídica considerada, VEGF 121, VEGF 145, VEGF 165, VEGF 189 y VEGF 206, y otros menos conocidos como el VEGF 162 y VEGF 165b. Todas estas moléculas se sintetizan a partir de un gen único,⁵⁸ generando las cadenas con diferentes cantidades de residuos de aminoácidos.^{59,60}

Todas las isoformas del VEGF son secretorias y tienen también (excepto la isoforma 121) alta afinidad por la heparina y el heparán sulfato de la matriz extracelular. Mientras mayor es la cadena peptídica, mayor es la afinidad de la isoforma del VEGF por esas macromoléculas. Además, todas tienen la misma capacidad para estimular la angiogénesis

y pueden aumentar la expresión ('upregulation') de varias proteasas y otros mediadores involucrados en la formación de nuevos vasos sanguíneos.^{47,61}

Recientemente han sido identificados 5 genes estructuralmente relacionados con el VEGF, codificantes para factores de crecimiento que también son específicos para células endoteliales. Así, la familia del VEGF incluye a un grupo de péptidos que se denominan: VEGF-A (o VEGF-1), VEGF-B (o VEGF-3), VEGF-C (o VEGF-2), VEGF-D, VEGF-E y VEGF-F.^{61,79,62-65} A esta familia también pertenece el factor de crecimiento placentario (PLGF),⁶⁶ una proteína de 149 aminoácidos que estimula el crecimiento de las células endoteliales y posee propiedades similares al VEGF-B.⁶³

Ha sido demostrado recientemente que el VEGF-C y el VEGF-D, actuando a través del receptor VEGFR-3,⁶⁷ están relacionados con la neoformación de vasos linfáticos, proceso actualmente conocido como linfangiogénesis^{65,68} y que el VEGF-B actúa sobre los receptores VEGFR-2.

LAS ANGIOPOIETINAS

Las angiopoietinas han tenido recientemente una particular atención porque juegan un papel importante en la angiogénesis^{69,70} y en el desarrollo del sistema cardiovascular.⁷¹ Las angiopoietinas son pequeñas glucoproteínas que modulan el crecimiento y el remodelamiento de los vasos. Hasta el momento son conocidas la angiopoietina (Ang-1) y la angiopoietina (Ang -2), ligadas específicamente a los receptores tirosin-cinasa Tie-2 (expresados en el linaje de las células endoteliales).⁷² Existen dos tipos de receptores descriptos para la angiopoietinas (Tie -1 y Tie-2) que tienen distintos papeles en la formación de los vasos sanguíneos.^{73,74}

La angiopoietinas 1 (agonista del receptor Tie-2), a pesar de ser un mitógeno débil de endotelios, induce potentemente la formación de brotes endoteliales a través de la secreción de plasmina y de la activación de cinasas;^{75,76} actúa sinérgicamente con el VEGF para inducir la angiogénesis^{76,77} y juega un papel crucial al mediar las interacciones recíprocas entre el endotelio y la matriz extracelular.⁷⁸ En contraste, la angiopoietina-2, es un factor quimiotáctico para los endotelios⁷⁹ y además se considera que promueve la «maduración» de la red vascular neoformada tras el estímulo con VEGF,⁸⁰ aumentando el tamaño del lumen vascular y reclutando células periendotheliales (por ejemplo, pericitos).⁷⁸

En cambio, la angiopoietina 2 es sintetizada en los sitios de remodelamiento o regresión vascular y es, aparentemente, un antagonista de los receptores Tie-2 expresados en células endoteliales.⁸¹ También se le atribuye a la Ang-2 una función de «desestabilización» de las células endoteliales quiescentes, antes de su proliferación. Esta molécula actuaría como una señal angiogénica de iniciación, «abriendo» la estructura vascular para permitir la degradación de la membrana basal por parte de las proteasas y facilitando de esta manera la acción de inductores angiogénicos como el VEGF.⁸²

Las respuestas celulares a las angiopoietinas también varían dependiendo de la presencia de VEGF en el microambiente celular.^{80,81} Se ha sugerido que la Ang-2 podría colaborar con el

VEGF en el frente de invasión de los brotes vasculares al bloquear la estabilización constitutiva o la función de maduración promovida por la presencia de Ang-1, permitiendo que los vasos cambien de fenotipo y mantengan un estado más «plástico». En este estado los vasos responderían más a las señales inducidas por el VEGF.^{80,81}

FACTOR DE CRECIMIENTO HEPATOCITARIO

Otros factores de crecimiento angiogénicos han sido menos estudiados. Por ejemplo, el factor de crecimiento hepatocitario (HGF), también conocido como 'scatter factor' (SF), es un péptido recientemente caracterizado que posee una estructura heterodimérica unida por un puente de disulfuro. Al igual que la mayoría de los miembros de la familia del VEGF y del FGF, tiene una gran afinidad con el heparán sulfato y está presente en numerosos grupos celulares, entre los cuales podemos citar al endotelio y a las células musculares lisas.

Está implicado en la regeneración tisular, la cicatrización de las heridas y la angiogénesis.⁸³ Comparte propiedades con los miembros de las familias FGF y VEGF. Como ellos, y a diferencia de otros como el PDGF⁸⁴ (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), es directamente angiogénico. Como en el caso del VEGF, sus propiedades mitogénicas a nivel vascular se limitan al endotelio. Como el FGF, puede inducir la expresión del VEGF por las células musculares lisas y actuar sinérgicamente con él sobre las células endoteliales.⁸⁵ Estas propiedades indican un papel importante en la angiogénesis y lo señalan como un interesante candidato para la terapéutica vascular.

TERAPIA PROTEICA Y TERAPIA GÉNICA

Los FC pueden ser administrados como proteína recombinante (terapia proteica) o transfiriendo los genes que los codifican insertados en vectores, tales como plásmidos, liposomas o por virus por otro lado (terapia génica).⁸⁶⁻⁸⁹

Los vectores pueden ser virales o no virales. Entre los primeros se destacan los adenovirus (y muy recientemente los virus adenoasociados) por su mejor perfil de seguridad comparado con otros vectores virales (retrovirus). Entre los no virales los más usados son los plásmidos, que son cadenas de ADN circular bacteriano «desnudo» (no envuelto) en las que se inserta el gen modificado del FC.

Ambas terapias (génica y proteica) promueven la angiogénesis en territorios isquémicos^{90-93,94-98-105} y normoperfundidos,¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ y se discute cuál de ambas presenta el mejor balance entre ventajas y desventajas. En la tabla 3 quisimos resaltar las diferencias entre las formas de introducir los factores de crecimiento (terapia proteica y génica).

Tabla 3. *Ventajas y desventajas de las diferentes terapias (proteica y génica)*

	Terapia proteica	Terapia génica
--	------------------	----------------

Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> • No introducción de material genético ni de vectores virales. • Conocimiento exacto de la dosis administrada. • Facilidad de readministración. 	<ul style="list-style-type: none"> • Producción sostenida del factor deseado. • Exposición prolongada que se logra con una sola dosis.
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Brevísima vida media, eleva los costes porque hay que administrarla continuamente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Desconocimiento de la cantidad exacta del factor de crecimiento que se sintetizará. • Relacionada con la introducción del material genético y viral.

VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

Actualmente se desconoce cuál es la vía de administración más efectiva y segura para inducir respuestas angiogénicas clínicamente relevantes en el miocardio isquémico sin la presencia de efectos adversos que dificulten su aplicación clínica. Diversos estudios experimentales han evaluado la eficacia de diferentes vías de administración. Las ventajas y las desventajas de estas han sido cuidadosamente analizadas en el trabajo de *Kornowsky* y colaboradores.¹⁰⁹

La vía de administración intravascular ha sido estudiada experimentalmente en sus variantes intraarterial (mediante catéteres intracoronarios⁹⁶⁻⁹⁸ o intrafemorales^{90,102} o endovenoso.¹¹⁰ A pesar de la facilidad de administración, esta vía de administración de los factores angiogénicos no ha logrado la eficacia deseada.

Las desventajas de la administración endovascular son la riesgosa exposición sistémica a los factores angiogénicos¹¹¹ y el peligro de hipotensión (dosis dependiente).¹¹²⁻¹¹⁵

La administración intrapericárdica es un procedimiento poco invasivo y relativamente simple que ofrece la ventaja teórica de la exposición prolongada del tejido miocárdico a la sustancia administrada debido a la función de reserva del pericardio. Sin embargo, los resultados comunicados son controvertidos,^{111,116-118} además, la aplicación clínica de esta vía de administración sería dificultosa y poco práctica en pacientes con antecedentes quirúrgicos cardiorácicos, quienes hasta el momento son potenciales beneficiarios de esta nueva terapia.^{111,119}

La vía tópica ha sido más estudiada que las anteriores. Diversos sistemas de liberación prolongada, como las cápsulas de alginato de heparina, las redes de fibrina, los polímeros porosos (polímeros de etilén-vinilacetato), los hidrogeles, etcétera, han sido usados para la administración de proteínas promotoras de la angiogénesis.^{93,94,120-123} La administración tópica local ofrece la ventaja potencial de evitar el rápido lavado producido por el flujo endovascular,¹¹¹ logrando una mayor permanencia del FC en el tejido miocárdico,¹²⁴ además

es menos probable la distribución de grandes concentraciones de FC al resto del organismo. Los resultados obtenidos son, en general, más alentadores que los observados por las vías endovasculares.^{94,98}

La inyección intramiocárdica directa de ADN desnudo o de proteína recombinante parece ser la más aceptada^{95,99,100,105,111,119,125} ya que evitaría el riesgo de niveles sanguíneos elevados de factores de crecimiento que podrían estimular la angiogénesis dentro de las placas ateromatosas (y secundariamente su crecimiento y ruptura), o favorecer el desarrollo de neovasos en territorios remotos como la retina o, peor aún, en metástasis o tumores ocultos.

La inyección intramiocárdica puede realizarse por vía transespicárdica^{95,99,100,105} o por vía transendocárdica.^{111,125-127} La vía transepicárdica, así como la vía tópica, necesitan un acceso quirúrgico, lo cual limita su utilidad práctica, además de dificultar el diseño de ensayos clínicos con grupo control para el estudio de la terapia angiogénica aislada.^{100,119}

Con respecto a la vía transendocárdica, el procedimiento es mínimamente invasivo, ya que se llega hasta la cámara ventricular izquierda a través de un acceso endovascular arterial percutáneo^{128,129} pero probablemente con riesgo menor al de la angioplastia transluminal ya que no se involucra la luz coronaria. Tal vez esta vía representa la alternativa más promisoriosa ya que la administración se localiza en sitios elegidos específicamente por el profesional sobre la base del estado funcional de cada región del ventrículo izquierdo.¹³⁰

Esto se logra con la ayuda de un moderno sistema de navegación y mapeo electromecánico tridimensional y en tiempo real, basado en adquisiciones de electrogramas locales (*NOGA, Biosense Webster, Johnson & Johnson*).^{131,132} Sus ventajas son el escaso tiempo de exposición a los rayos X (sólo el necesario para ubicar el catéter en la cámara ventricular izquierda),¹³¹ la utilidad de los parámetros globales¹³³ y regionales¹³⁴ que aporta (acortamiento sistólico local, actividad eléctrica local, fracción de eyección, etc.) y la posibilidad de realizar las inyecciones transendocárdicas con el mismo catéter que se utiliza para hacer el diagnóstico.^{125,128} Este procedimiento está contraindicado en los pacientes con válvulas protésicas en posición aórtica o con evidencia de adelgazamiento mural del ventrículo izquierdo o trombos intracavitarios.

DE LOS MODELOS ANIMALES A LOS ESTUDIOS CLÍNICOS

Si bien conceptualmente se podrían utilizar intervenciones que interfieran con la atenuación de la respuesta angiogénica (por ejemplo, una inhibición de los factores antiangiogénicos), la mayoría de los trabajos se han centrado en el uso de los FC como el VEGF y el bFGF. Los primeros estudios que demostraron un efecto angiogénico en animales se realizaron en 1992, ambos con bFGF: uno en un modelo de isquemia periférica¹³⁵ y el otro en un modelo de infarto de miocardio.¹³⁶

Varias series de experimentos con animales demostraron posteriormente que el FGF-2 administrado intracoronariamente mejoraba la perfusión miocárdica y la función, e incrementó el flujo colateral en el perro, tanto en la isquemia crónica como en la aguda.^{137-139,140} También se han observado efectos beneficiosos sobre el flujo colateral y la función

ventricular izquierda en el cerdo después de la administración de una única dosis por vía perivascular o dentro del pericardio de FGF-2.¹⁴¹⁻¹⁴³ La proteína FGF-1 recombinante no ha sido efectiva en el perro.^{144,145} La experiencia con la transferencia génica del FGF es más limitada. Tanto la inyección intramuscular de una única dosis de ADN desnudo que codifica para FGF-1, como la transferencia adenoviral intracoronaria del gen de FGF-5, han demostrado mejorar el flujo en la extremidad posterior del conejo¹⁴⁶ y en el miocardio porcino,¹⁴⁷ respectivamente.

Resultados satisfactorios fueron confirmados por otros autores que usaron VEGF^{102,104,148-156} en animales de experimentación. A partir de ese momento se comenzaron a reportar resultados que demostraban que los factores de crecimiento (administrados por medio de terapia proteica o génica) inducen una densidad mayor en los vasos capilares y/o colaterales, una mejor función vasomotora endotelial, un aumento del flujo coronario regional y una mejor función miocárdica.^{105,157} Recientemente también se ha comprobado la eficacia productiva del SF/HGF.⁸³

Los resultados obtenidos en animales experimentales indujeron a muchos investigadores a proponer ensayos en fase I, centrándose inicialmente en la patología vascular periférica. En 1994, *Isner*⁹⁰ inició ensayos clínicos en pacientes con arteriopatía periférica aplicando ADN «desnudo» mediante un balón de angioplastia en dosis crecientes para su transferencia a la pared vascular. Comprobó al año un aumento del flujo, disminución del dolor de reposo y evidencia objetiva de formación vascular histológica y angiográfica. El mismo grupo de investigadores obtuvo resultados favorables en 1998 utilizando esta vez la vía intramuscular.⁹¹ Si bien en ambas instancias no hubo grupo control, las conclusiones iniciales de estos y otros trabajos fueron muy alentadores.

Pero el interés de los investigadores no se restringió al empleo de los FC en la isquemia arterial periférica.¹⁵⁸ En febrero de 1998, *Schumacher*¹⁵⁹ publicó la primera terapéutica angiogénica en la cardiopatía isquémica humana: en un estudio aleatorizado de 20 pacientes sometidos a cirugía coronaria, se inyectó FGF en el miocardio vecino a la arteria descendente anterior. A las 12 semanas se comprobó (por angiografía de sustracción digital) la existencia de una neovascularización en el área miocárdica inyectada en los casos estudiados pero no en los controles. Actualmente, a casi tres años de seguimiento, la mejoría clínica, angiográfica y ecocardiográfica sigue manifestándose.⁹⁵

Existen estudios clínicos con abordaje quirúrgico publicados, además del citado, como el de *Rosengart* (quien inyectó intramiocárdicamente adenovirus codificante para VEGF 121),⁹⁹ el de *Laham* (quien administró de forma tópica el bFGF recombinante de liberación prolongada)⁹⁴ y el *Symes* (quien inyectó intramiocárdicamente un plásmido de VEGF165).¹⁰⁰ En todos ellos los resultados fueron favorables, aunque con escaso número de pacientes.

Además como análisis debemos tener en cuenta que en tres de ellos hubo cirugía de derivación asociada^{94,95,99} y en los dos en los que se realizó terapia génica no hubo grupo control.^{99,100}

Existen diferentes trabajos clínicos que han utilizado la vía de administración intracoronaria, entre ellos tenemos el de *Hendel* (VEGF recombinante)⁹⁷ y el de *Udelson* (bFGF recombinante).⁹⁶ El primero es la extensión de las comunicaciones iniciales de *Henry*^{115,160} precursores del *VIVA Trial* ('VEGF in Ischemia for Vascular Angiogenesis'), y que involucra a 178 pacientes. En la comunicación de este ensayo,⁹⁸ difundida en las Sesiones Científicas 2000 de la American Heart Association, el seguimiento a un año no muestra diferencias significativas entre los grupos tratados y el grupo placebo, mientras el estudio de *Udelson*⁹⁶ muestra una discreta mejoría en la perfusión de reposo y ejercicio en 45 pacientes a los 180 días de seguimiento.

Existen otros trabajos en la literatura internacional como el de *Losordo*,¹⁶¹ quien aplicó el VEGF-165 a 5 pacientes a través de una minitoracotomía sin realizar revascularización y a quien se le señaló que fueron pocos pacientes y no hubo grupo control. Por otro lado, en el estudio de *Symes*¹⁰⁰ se quiso probar cual era la mejor dosis de aplicación del VEGF, para lo cual se escogieron 20 pacientes, a 10 de los cuales se les aplicó 250 ng y a los 10 restantes 125 ng del producto, y se observó mayor efectividad en el grupo al que se aplicó 250 ng.

*Vale*¹²⁹ demostró la eficacia del sistema *Noga* en la aplicación del factor (vía endocárdica), mientras que en el estudio de *Fortuin*¹⁶² y *Reilly*¹⁶³ se valoró el uso del VEGF-2 como factor de crecimiento angiogénico, con buenos resultados. Por otra parte *Hedman*¹⁶⁴ quiso realizar un trabajo comparativo inyectando intracoronariamente en 37 pacientes VEGF usando adenovirus y en 28 usó un plásmido, también escogió un grupo control y concluyó que a los pacientes a los que se les inyectó el factor tenían mejor perfusión que en el grupo control.

En otro trabajo¹⁶⁵ se utilizó la vía intracoronaria para la aplicación del factor, tras seleccionar 2 grupos a los que se les inyectaron diferentes dosis de VEGF y se escogió un grupo control (placebo). Se concluyó que cuando se inyectaba una dosis superior de VEGF la mejoría clínica era superior. Sin embargo, en el estudio de *Kastrup*,¹⁶⁶ que tuvo un esquema parecido, no se evidenció mejoría clínica pero si se evidenció mejoría en la fracción de eyección en el grupo que se inyectó el VEGF.

COMPLICACIONES DE LA TERAPIA ANGIOGÉNICA

Es importante mencionar el riesgo aún no demostrado en ninguno de los trabajos clínicos publicados hasta ahora⁹⁰⁻¹⁰⁰ de angiogénesis patológica.¹⁶⁷

El VEGF juega un papel en desarrollo de la neovascularización intraocular, como la retinopatía diabética.^{168,169} Es cierto que la presencia de esta patología es criterio de exclusión en estudios de angiogénesis, pero es improbable que la neovascularización pueda ocurrir en una retinopatía no isquémica.

Otro potencial efecto adverso es la estimulación del desarrollo tumoral. Se ha establecido como criterio de exclusión en la mayoría de los estudios clínicos a los pacientes con tumores malignos conocidos, porque existiría, teóricamente, la posibilidad de que los FC estimulen el crecimiento de tumores no diagnosticados.^{170,171} Se ha evidenciado en trabajos

de experimentación la participación de los FC en la angiogénesis tumoral,^{172,173} además de que por otro lado se llevan a cabo diversas investigaciones para comprobar los efectos antitumorales de los inhibidores de la angiogénesis.^{174,175} No obstante a lo planteado, ciertos trabajos demuestran la falta del potencial oncogénico de ciertos FC.^{176,177} Lo cierto es que por el momento no existen evidencias clínicas concretas al respecto.

Otra observación importante radica en la neovascularización de las placas ateroscleróticas¹⁷⁸⁻¹⁸³ que podrían causar su inestabilidad¹⁸⁴ y ruptura.^{185,186} Esto no se ha observado concluyentemente durante el seguimiento de los pacientes tratados con angiogénesis. De hecho el resultado es más bien el opuesto, ya que la administración de VEGF ha producido una reducción estadísticamente significativa en el engrosamiento de la íntima debido a una reendotelización acelerada, lo que va en contra del concepto de que la aceleración de la aterosclerosis es una consecuencia de la estimulación de la angiogénesis inducida por VEGF.

Se ha descrito que el tratamiento con proteínas recombinantes produce hipotensión,^{112,115,149} particularmente cuando se administra por vía sistémica y a altas dosis, debido a que el VEGF estimula la síntesis de óxido nítrico.^{187,188} Sin embargo, esta complicación nunca ha sido descrita después de realizarse transferencia génica ni en animales ni en seres humanos.

Se han señalado también casos de edema secundario al aumento de permeabilidad capilar,⁹¹ así como anemia, trombocitopenia, nefropatía membranosa y proteinuria.¹⁸⁹⁻¹⁹¹

Conclusiones

Los resultados iniciales de la angiogénesis terapéutica en la cardiopatía isquémica humana han sido alentadores pero no concluyentes, debido a la escasez de pacientes estudiados, a lo limitado del seguimiento y a la pobreza de casos control, por lo que todavía quedan muchas preguntas por contestar. No sabemos cuál factor de crecimiento proporciona la mejor respuesta angiogénica, no conocemos específicamente el efecto sinérgico entre el bFGF y el VEGF, que se ha demostrado tanto *in vitro* como en modelos animales, cuál sería la mejor terapia (proteica o génica), cuáles las dosis ideales y la frecuencia de administración, entre otras preguntas.

Desconocemos aún, por otro lado, el perfil de seguridad a largo plazo y la duración del efecto terapéutico. Finalmente cuando se planifican los estudios clínicos controlados se deberían establecer cuáles son los criterios de valoración ('end-points') óptimos para estimar los efectos terapéuticos. Al igual que en los estudios comparativos entre cirugía coronaria y angioplastia, ¿se debería considerar como criterios a la muerte y al infarto? o simplemente ¿serían suficientes los indicadores de calidad de vida, clase clínica de la angina o las pruebas ergométricas para justificar el uso de esta nueva terapia?. Nosotros pensamos que en un tema como éste, deberían priorizarse siempre los criterios objetivos y cuantificables (SPECT, eco-estrés, RMN) antes que los subjetivos (clase funcional, consumo de nitritos, calidad de vida) que están influidos tan intensamente por el «efecto placebo».¹⁹² Sólo cuando tengamos las respuestas a algunas de estas preguntas podremos extraer conclusiones más confiables acerca de la utilidad de la angiogénesis terapéutica para mejorar la cantidad y calidad de vida de los pacientes que sufren una cardiopatía isquémica.

Sin duda pensamos que estamos dando los primeros pasos en un camino largo, apasionante y muy prometedor para el tratamiento de la cardiopatía isquémica, como lo expresa *Selke*¹⁹³ en su trabajo.

SUMMARY

The history of the use of growth factors and the concepts of angiogenesis, arteriogenesis and vasculogenesis were presented in this paper. The different growth factors that are known so far were stated, making emphasis on the most used (vascular endothelial and fibroblast growth factors). The various ways of application and of administration proteic or genic) were analyzed. An account of several preclinical and clinical studies using these growth factors for ischemic cardiopathy treatment was made. The various studies contributed information on the possible complications of the use of these factors; conclusions were drawn and recommendations were made.

Key words: growth factors, angiogenesis, vascular endothelial growth factor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hockel M, Schlenger K, Doctrow S. Therapeutic angiogenesis. *Arch Surg* 1993;128:423-429.
2. Hertig AT. Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. *Contrib Embryol* 1935; 25:37-91.
3. Algire GH, Chalkley HW. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst* 1945;6:73-85.
4. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186.
5. Schaper W, Piek JJ, Muñoz -Chapuli R. Collateral circulation of the heart. In: Ware JA, Simons M (eds): *Angiogenesis an cardiovascular disease*. New York: Oxford University Press; 1999. Pp. 159-198.
6. Dumont DJ, Fong GH, Puri MC. Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn* 1995; 203: 80-92.
7. Folkman J, Haudenschild C. Angiogenesis in vitro. *Nature* 1980; 288: 551-556.
8. Sasayama S, Fujita M. Recent insights into coronary collateral circulation. *Circulation* 1992; 85: 1197-1204.

9. Schaper W, Ito WD. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res* 1996; 79: 911-919.
10. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 73-91.
11. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999; 103: 1231-1236.
12. Springer ML, Chen AS, Kraft PE. VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults. *Mol Cell* 1998; 2: 549-558.
13. Asahara T, Masuda H, Takahashi T. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221-228.
14. Charney R, Cohen M. The role of the coronary collateral circulation in limiting myocardial ischemia and infarct size. *Am Heart J* 1993; 126: 937-945.
15. Fulton WFM. The time factor in the enlargement of anastomoses in coronary artery disease. *Scott Med J* 1964; 9: 18-23.
16. Tsuchiya G. Postmortem angiographic studies on the intercoronary arterial anastomoses. Report I: Studies on intercoronary arterial anastomoses in adult human hearts and the influence on the anastomoses of structures of the coronary arteries. *Jpn Circ J* 1970; 34: 1213- 1220.
17. Ware JA. Cellular mechanisms of angiogenesis. In: Ware HA, Simons M (eds): *Angiogenesis and cardiovascular disease*. New York: Oxford University Press; 1999. Pp. 30-59.
18. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442 –447.
19. Vera Janavel G, Del Valle H, Lascano E, Negroni J, Linares Casas JC, Crottogini A. Angiogénesis terapéutica en la cardiopatía isquémica. *Rev Fed Arg. Cardiol* 2001; 30: 245-261.
20. Iruela -Arispe ML, Dvorak HF. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemost* 1997; 78: 672-677.
21. Brenchley PE: Angiogenesis in inflammatory joint disease: a target for therapeutic intervention. *Clin Exp Immunol* 2000; 121: 426-429.
22. Devalaraja RM, Nanney LB, Quian Q. Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol* 2000;115: 234-244.
23. Silvestre JS, Mallat Z, Duriez M. Anti-angiogenic effect of IL-10 in ischemia - induced angiogenesis. *Circulation* 2000; 102 (Suppl II): II 309 (Abstract).
24. Moldovan NI, Goldschmidt-Clermont PJ, Parker-Thornburg J. Contribution of monocytes/macrophages to compensatory neovascularization: the drilling of metalloelastase-positive tunnels in ischemic myocardium. *Circ Res* 2000; 87: 378-384.
25. Li J, Post M, Volk R. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 356.
26. Li J, Brown LF, Laham RJ. Macrophage-dependent syndecan expression. *Circ Res* 1997; 81: 785-796.
27. Taichman NS, Young S, Cruchley AT. Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor. *J Leukoc Biol* 1997; 62: 397-400.
28. Waltenberger J. Modulation of growth factor action: implications for the treatment of cardiovascular diseases. *Circulation* 1997; 96: 4083-4094.
29. Hamawy AH, Lee LY, Crystal RG. Cardiac angiogenesis and gene therapy: a strategy for myocardial revascularization. *Curr Opin Cardiol* 1999; 14: 515-522.

30. Coulier F, Pontarotti P, Roubin R. Of worms and men: an evolutionary perspective on the fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor families. *J Mol Evol* 1997; 44: 43 -56.
31. Burgess WH, Maciag T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 1989;58: 575-606.
32. Engleka KA, Maciag T. Molecular mechanisms of the fibroblast growth factor family. In: Ware JA, Simons M (eds): *Angiogenesis and cardiovascular disease*. New York: Oxford University Press; 1999. Pp. 79-100.
33. Johnson DE, Williams LT. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 1993; 60: 1-41.
34. Baird A: Fibroblast growth factors and their receptors. In: Rubanyi GM (ed): *Angiogenesis in health and disease: basic mechanisms and clinical applications*. New York: Marcel Dekker Inc.; 2000. Pp. 75-88.
35. Koolwijk P, van Erck MG, de Vree WJ. Cooperative effect of TNF- α , bFGF and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity. *J Cell Biol* 1996; 1322: 1177-1188.
36. Pepper MS, Ferrara N, Orci L. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Comm* 1992; 189: 824-831.
37. Seguezzi G, Patel S, Ren CJ. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol* 1998; 141: 1659-1673
38. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 1990; 5: 519-524.
39. De Vries C, Escobedo JA, Ueno H . The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992; 255: 989-991.
40. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 1991; 6: 1677 -1683.
41. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME. Identifications of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187: 1579-1586.
42. Matthews W, Jordan CT, Gavin M. A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9026-9030.
43. Galland F, Karamysheva A, Mattei MG . Chromosomal localization of FLT4, a novel receptor-type tyrosine kinase gene. *Genomics* 1992; 13: 475 -478.
44. Galland F, Karamysheva A, Pebusque MJ . The FLT4 gene encodes a transmembrane tyrosine kinase related to the vascular endothelial growth factor receptor. *Oncogene* 1993; 8: 1233-1240.
45. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM . Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983-985.
46. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G . Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989; 246: 1309-1312.

47. Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996; 271: 603-606.
48. Strömblad S, Becker JC, Yebra M. Suppression of p53 activity and p21 WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin $\alpha 3 \beta 1$ during angiogenesis. *J Clin Invest* 1996; 98: 426-433.
49. Byzova TV, Goldman CK, Pampori N. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF. Activation of the integrins. *Mol Cell* 2000; 6: 851-860.
50. Murohara T, Horowitz JR, Silver M. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 1998; 97: 99-107.
51. Callow AD, Choi ET, Trachtenberg JD. Vascular permeability factor accelerates endothelial regrowth following balloon angioplasty. *Growth Factors* 1994; 10: 223-228.
52. Asahara T, Chen D, Tsurumi Y. Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function following phVEGF 165 gene transfer. *Circulation* 1996; 94: 3291-3302.
53. Asahara T, Bauters C, Pastore C. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation* 1995; 91: 2793-2801.
54. Casscells W. Growth factor therapies for vascular injury and ischemia. *Circulation* 1995; 91: 2699-2702.
55. Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med.* 2001;7:425-429.
56. Nabel EG, Yang ZY, Plautz G. Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature* 1993; 362: 844-846.
57. Edelman ER, Nugent MA, Smith LT. Basic fibroblast growth factor enhances the coupling of intimal hyperplasia and proliferation of vasa vasorum in injured rat arteries. *J Clin Invest* 1992; 89: 465-473.
58. Breitbart RE, Andreadis A, Nadal-Ginard B. Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 467-495.
59. Tischer E, Mitchell R, Hartman T. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; 266: 11947-11954.
60. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R. VEGF 145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 1997; 272: 7151-7158.
61. Felmeden, D.C, Blann A.D, Lip GYH. Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *European Heart Journal* 2002; 24(7):586-603.
62. Neufeld G, Tessler S, Gitay-Goren H. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog Growth Factor Res* 1994; 5: 89-97.
63. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2576-2581.
64. Chilov D, Kukk E, Taira S. Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *J Biol Chem* 1997; 272: 25176-25183.
65. Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10: 528-535.

66. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9267-9271.
67. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 1996; 122: 3829-3837.
68. Korpelainen EI, Alitalo K. Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10: 159-164.
69. Davis S, Yancopoulos GD. The angiopoietins: Ying and Yang in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237: 173-185.
70. Stratmann A, Risau W, Plate KH. Cell type -specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggest a role in glioblastoma angiogenesis. *Am J Pathol* 1998; 153: 1459-1466.
71. Breier G, Damert A, Plate KH . Angiogenesis in embryos and ischemic diseases. *Thromb Haemost* 1997; 78: 678-683.
72. Schnürch H, Risau W. Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Development* 1993; 119: 957-968.
73. Patan S. TIE1 and TIE2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth. *Microvasc Res* 1998; 56: 1-21.
74. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995; 376: 70 -74
75. Kim I, Kim HG, Moon SO. Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ Res* 2000; 86: 952-959.
76. Kobizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD. Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Curr Biol* 1998; 8: 529-532.
77. Suri C, McClain J, Thurston G. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1998; 282: 468-471.
78. Suri C, Jones PF, Patan S. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; 87: 1171-1180.
79. Witzenbichler B, Maisonpierre PC, Jones P. Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *Jiol Chem* 1998; 273: 18514-18521.
80. Asahara T, Chen D, Takahashi T. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* 1998; 83: 233-240.
81. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277: 55 -60.
82. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997; 277: 48-50.
83. Van Belle E, Witzenbichler B, Chen D . Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor: the case for paracrine amplification of angiogenesis, *Circulation* 1998; 97: 381-390.
84. Sato N, Beitz JG, Kato J. Platelet -derived growth factor indirectly stimulates angiogenesis in vitro. *Am J Pathol* 1993; 142: 1119-1130.

85. Witzenbichler B, Van Belle E, Chang L. Scatter factor (SF) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in vascular smooth muscle cells (VSMC) and acts synergistic to VEGF on endothelial cell (EC) migration in vivo. *Circulation* 1996; 94: I 593-594 (Abstract).
86. Melillo G, Capogrossi MC. Prospects of gene therapy in the treatment of peripheral arterial diseases. *Minerva Cardioangiol* 1998; 46:297-298.
87. Melillo G, Capogrossi MC. Gene therapy with angiogenic factors for the treatment of ischemic diseases. *Ital Heart J* 2000; 1 (Suppl 3): S59-S60.
88. Crystal RG. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 1995; 270: 404-410.
89. Safi J Jr, Gloe TR, Riccioni T. Gene therapy with angiogenic factors: a new potential approach to the treatment of ischemic diseases. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 2311-2325.
90. Isner JM, Walsh K, Symes J. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation* 1995; 91: 2687-2692.
91. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O. Constitutive expression of phVEGF 165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998; 97: 1114-1123.
92. Lazarous DF, Unger EF, Epstein SE. Basic fibroblast growth factor in patients with intermittent claudication: results of a phase I trial. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 1239-1244.
93. Kipshidze N, Chekanov V, Chawla P. Angiogenesis in a patient with ischemic limb induced by intramuscular injection of vascular endothelial growth factor and fibrin platform. *Tex Heart Inst J* 2000; 27: 196-200.
94. Laham RJ, Sellke FW, Edelman ER. Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery. Results of a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation* 1999; 100: 1865-1871.
95. Pecher P, Schumacher BA. Angiogenesis in ischemic human myocardium: clinical results after 3 years. *Ann Thorac Surg* 2000; 69: 1414-1419.
96. Udelson JE, Dilsizian V, Laham RJ. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 improves stress and rest myocardial perfusion abnormalities in patients with severe symptomatic chronic coronary artery disease. *Circulation*. 2000; 102: 1605-1610
97. Hendel RC, Henry TD, Rocha-Singh K. Effect of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor on myocardial perfusion: evidence for a dose-dependent effect. *Circulation* 2000; 101: 118-121.
98. Henry TD, McKendall GR, Azrin MA. VIVA Trial: one year follow up. *Circulation* 2000; 102 (Suppl II): II 309 (Abstract 1516).
99. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF 121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 1999; 468-474.
100. Symes JF, Losordo DW, Vale PR. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 830-837

101. Shyu KG, Manor O, Magner M. Direct intramuscular injection of plasmid DNA encoding angiopoietin-1 but not angiopoietin-2 augments revascularization in the rabbit ischemic hindlimb. *Circulation* 1998; 98: 2081-2087.
102. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest* 1994; 93: 662-670.
103. Asahara T, Bauters C, Zheng LP. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 1995; 92 (Suppl II): II 365-371.
104. Lopez JJ, Laham RJ, Stamler A. VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs. *Cardiovasc Res* 1998; 40: 272 -281.
105. Crottogini AJ, del Valle HF, Lascano EC . Efecto del FGFa sobre la recuperación de la mecánica y el flujo regional del ventrículo izquierdo en cerdos (Abstract). XIX Congreso Nacional de Cardiología. Federación Argentina de Cardiología, Mendoza, 2000
106. Springer ML, Chen AS, Kraft PE. VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults. *Mol Cell* 1998; 2: 549-558.
107. Safi JJr, DiPaula AF Jr, Riccioni T. Adenovirus -mediated acidic fibroblast growth factor gene transfer induces angiogenesis in the nonischemic rabbit heart. *Microvasc Res* 1999; 58: 238 -249.
108. Godak LH, Poliakova L, Wang X. Adenovirus-mediated VEGF(121) gene transfer stimulates angiogenesis in normoperfused skeletal muscle and preserves tissue perfusion after induction of ischemia. *Circulation* 2000; 102: 565-571.
109. Kornowski R, Fuchs S, Leon MB. Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis. *Circulation* 2000; 101: 454-458.
110. Thirumurti V, Shou M, Hodge E. Lack of efficacy of intravenous basic fibroblast growth factor in promoting myocardial angiogenesis. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 54A (Abstract)
111. Laham RJ, Rezaee M, Garcia L. Tissue and myocardial distribution of intracoronary, intravenous, intrapericardial and intramyocardial 125 I -labeled basic fibroblast growth factor (bFGF) favor intramyocardial delivery. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 10A (Abstract).
112. Horowitz JR, Rivard A, van der Zee MD. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor produces nitric oxide dependent hypotension. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2793-2800.
113. Cuevas P, Carceller F, Ortega S. Hypotensive activity of fibroblast growth factor. *Science* 1991; 254: 1208-1210.
114. Lopez JJ, Laham RJ, Carrozza JP. Hemodynamic effects of intracoronary VEGF delivery: evidence of tachyphylaxis and NO dependence of response. *Am J Physiol* 1997; 273: H1317-H1323.
115. Henry TD, Rocha-Singh K. Results of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor (rhVEGF) administration trial. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31 (Suppl A): 65A.
116. Uchida Y, Yanagisawa-Miwa, Nakamura F. Angiogenic therapy of acute myocardial infarction by intrapericardial injection of basic fibroblast growth factor and heparin sulfate: an experimental study. *Am Heart J* 1995; 130: 1182-1188.

117. Landau C, Jacobs AK, Haudenschild CC. Intrapericardial basic fibroblast growth factor induces myocardial angiogenesis in a rabbit model of chronic ischemia. *Am Heart J* 1995; 129: 924-931.
118. Shou M, Lazarous DF, Stiber J. The pericardium as a repository for an angiogenic growth factor: Effect of intrapericardial basic fibroblast growth factor on myocardial collateral development. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29: 154A-155A (Abstract).
119. Simons M, Bonow RO, Chronos NA. Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus. An expert panel summary. *Circulation* 2000; 102: e73-e86.
120. Hanif M, Patel A, Dunning J. Might gene therapy offer symptomatic relief for patients with 'no option' angina?. *Interact CardioVasc Thorac Surg* 2005;4:627-632.
121. Harada K, Grossman W, Friedman M. Basic fibroblast growth factor improves myocardial function in chronically ischemic porcine hearts. *J Clin Invest* 1994; 94: 623-630.
122. Lopez JJ, Edelman ER, Stamler A. Angiogenic potential of perivascularly delivered aFGF in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol* 1998; 274: H930-H936.
123. Yu C, English A, Edelman ER. Growth factor delivery strategies. *En: Ware JA, Simons M (eds): Angiogenesis and cardiovascular disease. New York: Oxford University Press; 1999. Pp. 238 -257.*
124. Edelman ER, Nugent MA, Karnovsky MJ. Perivascular and intravenous administration of basic fibroblast growth factor: vascular and solid organ deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1513-1517.
125. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE. Percutaneous myocardial gene transfer of phVEGF -2. *Circulation* 1999; 100: 2462 -2463.
126. Li JJ, Ueno H, Pan Y. Percutaneous transluminal gene transfer into canine myocardium in vivo by replication-defective adenovirus. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 97-105.
127. Kornowski R, Leon MB, Fuchs S. Electromagnetic guidance for catheter-based transendocardial injection: a platform for intramyocardial angiogenesis therapy. Results in normal and ischemic porcine models. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 1031-1039.
128. Vale PR, Losordo DW, Tkebuchava T. Catheter-based myocardial gene transfer utilizing nonfluoroscopic electromechanical left ventricular mapping. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 246-254.
129. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, Maysky M, Esakof DD, Symes JF, *et al.* Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF(165) gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2000;102:965-974.
130. Kornowski R, Hong MK, Gepstein L. Preliminary animal and clinical experiences using an electromechanical endocardial mapping procedure to distinguish infarcted from healthy myocardium. *Circulation* 1998; 98: 1116-1124.
131. Ben-Haim SA, Osadchy D, Schuster I. Nonfluoroscopic, in vivo navigation and mapping technology. *Nat Med* 1996; 2: 1393-1395.

132. Gepstein L, Hayam G, Ben-Haim SA. A novel method for nonfluoroscopic catheter-based electroanatomical mapping of the heart: in vitro and in vivo accuracy results. *Circulation* 1997; 95: 1611-1622.
133. Gepstein L, Hayam G, Shpun S. Hemodynamic evaluation of the heart with a nonfluoroscopic electromechanical mapping technique. *Circulation* 1997; 96: 3672-3680.
134. Gepstein L, Goldin A, Lessick J. Electromechanical characterization of chronic myocardial infarction in the canine coronary occlusion model. *Circulation* 1998; 98: 2055-2064
135. Baffour R, Berman J, Garb JL. Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose-response effect of basic fibroblast growth factor. *J Vasc Surg* 1992; 16: 181 -191.
136. Yanagisawa-Miwa A, Uchida Y, Nakamura F. Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science* 1992; 257: 1401-1403
137. Unger EF, Banai S, Shou M, Lazarous DF, Jaklitsch MT, Scheinowitz M. Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am J Physiol* 1994; 266: H1588-H1595.
138. Lazarous DF, Shou M, Scheinowitz M, Hodge E, Thirumurti V, Kitsiou AN. Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and arterial response to injury. *Circulation* 1996; 94: 1074-1082.
139. Rajanayagam MA, Shou M, Thirumurti V, Lazarous DF, Quyyumi AA, Goncalves L. Intracoronary basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral perfusion in dogs. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 519-526.
140. Schlaudraff K, Schumacher B, von Specht BU. Growth of "new" coronary vascular structures by angiogenetic growth factors. *Eur J Cardiothorac Surg* 1993; 7: 637-641.
141. Harada K, Grossman W, Friedman M, Edelman ER, Prasad PV, Keighley CS. Basic fibroblast growth factor improves myocardial function in chronically ischemic porcine hearts. *J Clin Invest* 1994; 94: 623-630
142. López JJ, Edelman ER, Stamler A, Hibberd MG, Prasad P, Caputo RP. Basic fibroblast growth factor in a porcine model of chronic myocardial ischemia: a comparison of angiographic, echocardiographic and coronary flow parameters. *J PharmacolExpresTher* 1997; 282: 385-390.
143. Laham RJ, Rezaee M, Post M, Novicki D, Sellke FW, Pearlman JD. Intrapericardial delivery of fibroblast growth factor-2 induces neovascularization in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292: 795-802.
144. Banai S, Jaklitsch MT, Casscells W, Shou M, Shrivastav S, Correa R. Effects of acidic fibroblast growth factor on normal and ischemic myocardium. *Circ Res* 1991; 69: 76-85.
145. Unger EF, Shou M, Sheffield CD, Hodge E, Jaye M, Epstein SE. Extracardiac to coronary anastomoses support regional left ventricular function in dogs. *Am J Physiol* 1993; 264: H1567-H1574.

146. Tabata H, Silver M, Isner JM. Arterial gene transfer of acidic fibroblast growth factor for therapeutic angiogenesis in vivo: critical role of secretion signal in use of naked DNA. *Cardiovasc Res* 1997; 35: 470-479.
147. Giordano FJ, Ping P, McKirnan MD, Nozaki S, DeMaria AN, Dillmann WH. Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. *Nature Med* 1996; 2: 534-539.
148. Mack CA, Magovern CJ, Budenbender KT. Salvage angiogenesis induced by adenovirus-mediated gene transfer of vascular endothelial growth factor protects against ischemic vascular occlusion. *J Vasc Surg* 1998; 27: 699-709.
149. Hariawala MD, Horowitz JR, Esakof D, Sheriff DD, Walter DH, Keyt B. VEGF improves myocardial blood flow but produces EDRF-mediated hypotension in porcine hearts. *J Surg Res* 1996; 63: 77-82.
150. Zhang D, Gail L, Fan R, Dong W, Wen Y. Efficacy and safety of therapeutic angiogenesis from direct myocardial administration of an adenoviral vector expressing vascular endothelial growth factor 165. *Chin Med J* 2002;115(5):643-648
151. Sant'anna RT, Kalil R, Moreno P, Anflor L. Terapia gênica com VEGF 165 para angiogênese no infarto agudo do miocárdio experimental. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2003; 18(2): 142-147.
152. Vale PR, Milliken CE, Tkebuchava T, Chen D, Iwaguro H, Magner M. Catheter-based gene transfer of VEGF utilizing electromechanical LV mapping accomplishes therapeutic angiogenesis: pre-clinical studies in swine. *Circulation* 1999; 100: I512.
153. Tio RA, Tkebuchava T, Scheuermann TH, Lebherz C, Magner M, Kearny M. Intramyocardial gene therapy with naked DNA encoding vascular endothelial growth factor improves collateral flow to ischemic myocardium. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 2953-2960.
154. Vale PR, Tkebuchava T, Milliken CE, Chen D, Symes JF, Isner JM. Percutaneous electromechanical mapping demonstrates efficacy of pVGI.1 (VEGF2) in an animal model of chronic myocardial ischemia [resumen]. *Circulation* 1999; 100: I22.
155. Mack CA, Patel SR, Schwarz EA, Zanzonico P, Hahn RT, Ilercil. Biologic bypass with the use of adenovirus-mediated gene transfer of the complementary deoxyribonucleic acid for vascular endothelial growth factor 121 improves myocardial perfusion and function in the ischemic porcine heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:168-176.
156. Lee LY, Patel SR, Hackett NR, Mack CA, Polce DR, El-Sawy T. Focal angiogen therapy using intramyocardial delivery of an adenovirus vector coding for vascular endothelial growth factor 121. *Ann Thorac Surg* 2000; 69: 14-24.
157. Narins CR, Topol EJ. Percutaneous myocardial revascularization and angiogenesis. *In: Topol EJ (ed): Textbook of interventional cardiology. Philadelphia, Saunders, 1999, 3 rd ed., pp 674-677.*
158. Folkman J. Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs. *Circulation* 1998; 97: 1108 -1110.

159. Schumacher B, Pecher P, von Specht BU. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary disease. *Circulation* 1998; 97: 645-650.
160. Henry TD, Annex BH, Azrin MA. Double blind, placebo controlled trial of recombinant human vascular endothelial growth factor -The VIVA Trial. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33 (Suppl A): 348A (Abstract).
161. 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;98:2800-2804.
162. 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;92:436-439.
163. Reilly JP, Grise MA, Fortuin FD, Vale P, Schaer GL, Lopez JJ, *et al.* Longterm (2-year) clinical events following transthoracic intramyocardial gene transfer of VEGF-2 in no option patients. *J Intervent Cardiol* 2005;18:27-31.
164. Hedman M, Hartikainen J, Syvanne M, Stjernvall J, Hedman A, Kivela A, *et al.*. 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).(see comment). *Circulation* 2003;107(21):2677-2683.
165. Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, *et al.* and Investigators VIVA. The VIVA trial: vascular endothelial growth factor in ischaemia for vascular angiogenesis. *Circulation* 2003;107(10):1359-1365.
166. Kastrup J, Jorgensen E, Ruck A, Tagil K, Glogar D, Ruzyllo W, *et al.* Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable angina pectoris: a randomised double-blind placebo-controlled study: The Euroinject One Trial. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:982-988.
167. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
168. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PJ. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994; 331: 1480-1487.
169. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994; 118: 445-450.
170. Weinstat -Saslow D, Steeg PS. Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: basic and applied advances. *FASEB J* 1994; 8: 401-407.
171. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64: 327-336.
172. Gross JL, Herblin WF, Dusak BA. Modulation of solid tumor growth in vivo by bFGF. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1990; 31: 79 (Abstract).

173. Tamatani T, Hattori K, Iyer A. Hepatocyte growth factor is an invasion/migration factor of rat urothelial carcinoma cells in vitro. *Carcinogenesis* 1999; 20: 957-962.
174. Bohem T, Folkman J, Browder T. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997; 390: 404-407.
175. Folkman J. Antiangiogenic gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9064-9066.
176. Pili R, Chang J, Muhlhauser J. Adenovirus- mediated gene transfer of fibroblast growth factor-1: angiogenesis and tumorigenicity in nude mice. *Int J Cancer* 1997; 73: 258-263.
177. Okada-Ban M, Grassi M, Plouet J. Impact on tumor angiogenesis and tumor progression of expression of the 18 kD and 24 kD isoforms of FGF -2. *Pathol Biol (Paris)* 1999; 47: 375-379.
178. O'Brien ER, Garvin MR, Dev R. Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1994; 145: 883 -894.
179. Barger AC, Beeuwkes R III, Lainey LL. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries: a possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *N Engl J Med* 1984; 310: 175-177.
180. Nabel EG, Yang ZY, Plautz G. Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature* 1993; 362: 844-846.
181. Edelman ER, Nugent MA, Smith LT. Basic fibroblast growth factor enhances the coupling of intimal hyperplasia and proliferation of vasa vasorum in injured rat arteries. *J Clin Invest* 1992; 89: 465-473.
182. Inoue M, Itoh H, Ueda M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation* 1998; 98: 2108-2116.
183. Ignatescu MC, Gharehbaghi-Schnell E, Hassan A. Expression of the angiogenic protein, platelet-derived endothelial cell growth factor, in coronary atherosclerotic plaques: in vivo correlation of lesional microvessel density and constrictive vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2340-3247.
184. Libby P, Sukhova G, Lee RT. Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25: S9-S12.
185. Sueishi K, Kumamoto M, Sakuda H. Angiogenic processes in the pathogenesis of human coronary atherosclerosis. *Curr Top Pathol* 1993; 87: 47-58.
186. Henry TD. Can we really grow new blood vessels? *Lancet* 1998; 351: 1826-1827.
187. Van der Zee R, Murohara T, Luo Z, Zollmann F, Passeri J, Lekutat C. Vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF) augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation* 1997; 95: 1030-1037.
188. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 1998; 101: 2567-2578.

189. Lopez JJ, Edelman ER, Stamler A. Local perivascular administration of basic fibroblast growth factor: drug delivery and toxicological evaluation. *Drug Metab Dispos* 1996; 24: 1166).
190. Floege J, Burg M, Hugo C. Endogenous fibroblast growth factor-2 mediates cytotoxicity in experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. *Am Soc Nephrol* 1998; 9: 792 -801.
191. Mazue G, Bertolero, Jacob C. Preclinical and clinical studies with recombinant human fibroblast growth factor. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 638: 329-349.
192. Kaptchuk TJ. Myocardial gene transfer for patients with myocardial ischemia. *Circulation* 1999; 100: e108.
193. Sellke F.W, Ruel M. Vascular Growth Factors and Angiogenesis in Cardiac Surgery. *Ann Thorac Surg* 2003;75:S685–90.

Recibido: 23 de marzo de 2007. Aprobado: 16 de mayo de 2007.

Dr. Alejandro Villar Inclán. Calle Padre Varela y San Lázaro, Centro Habana. La Habana, Cuba.

Correo electrónico: alejandro.villar@infomed.sld.cu

1 Especialista de I Grado en Cirugía Cardiovascular y Cirugía General. Profesor Instructor de Cirugía Cardiovascular.