

Terapia Gênica com Fator de Crescimento Endotelial Vascular 165 para Pacientes com Angina Refratária: Mobilização de Células Progenitoras Endoteliais

VEGF 165 Gene Therapy for Patients with Refractory Angina: Mobilization of Endothelial Progenitor Cells

Clarissa G. Rodrigues^{1,2}, Rodrigo D.M. Plentz^{1,3}, Thiago Dipp¹, Felipe B. Salles^{1,3}, Imarilde I. Giusti¹, Roberto T. Sant'Anna¹, Bruna Eibel¹, Ivo A. Nesralla¹, Melissa Markoski¹, Nance N. Beyer^{1,4}, Renato A. K. Kalil³

Instituto de Cardiologia/Fundação Universitária de Cardiologia - Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia¹, Porto Alegre, RS; Duke University Medical Center², Durham, Carolina do Norte, EUA; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre³, Porto Alegre, RS; Universidade Federal do Rio Grande do Sul⁴, Porto Alegre, RS - Brasil

Resumo

Fundamento: O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF - vascular endothelial growth factor) induz a mobilização de células progenitoras endoteliais (CPEs) com capacidade de proliferação e diferenciação em células endoteliais, contribuindo, dessa forma, para o processo angiogênico.

Objetivo: Buscamos avaliar o comportamento de CPEs em pacientes com doença cardíaca isquêmica e angina refratária que receberam injeções intramiocárdicas de 2000 µg de VEGF165 como terapia única.

Métodos: O estudo foi uma subanálise de um ensaio clínico. Pacientes com doença cardíaca isquêmica avançada e angina refratária foram avaliados para inclusão no estudo. Os critérios de inclusão foram: sinais e sintomas de angina e/ou insuficiência cardíaca apesar de tratamento medicamentoso máximo e área de isquemia miocárdica de, no mínimo, 5% conforme avaliado por uma tomografia computadorizada por emissão de fóton único (TCEFU). Os critérios de exclusão foram: idade > 65 anos, fração de ejeção do ventrículo esquerdo < 25% e câncer diagnosticado. Os pacientes cujos níveis de CPE foram avaliados foram incluídos. A intervenção consistiu na administração de 2000 µg de VEGF 165 de plasmídeo injetado no miocárdio isquêmico. A frequência de células CD34+/KDR+ foi analisada por citometria de fluxo antes e 3, 9, e 27 dias após a intervenção.

Resultados: Um total de 9 pacientes foram incluídos, 8 homens, média de idade de 59,4 anos, fração de ejeção ventricular esquerda de 59,3%, e classe de angina predominante III. Observou-se um aumento significativo dos níveis de CPEs no terceiro dia após a intervenção. Todavia, 9 e 27 dias após a intervenção, os níveis de CPEs foram similares aos basais.

Conclusão: Identificamos uma mobilização transitória de CPE, com pico no terceiro dia após a intervenção com VEGF 165 em pacientes com angina refratária. Todavia, os níveis de CPEs apresentaram-se semelhantes aos basais 9 e 27 dias após a intervenção. (Arq Bras Cardiol. 2013;101(2):149-153)

Palavras-chave: Células Endoteliais, Permeabilidade Capilar, Terapia Genética, Fator A de Crescimento Endotelial Vascular.

Abstract

Background: Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces mobilization of endothelial progenitor cells (EPCs) with the capacity for proliferation and differentiation into mature endothelial cells, thus contributing to the angiogenic process.

Objective: We sought to assess the behavior of EPCs in patients with ischemic heart disease and refractory angina who received an intramyocardial injections of 2000 µg of VEGF 165 as the sole therapy.

Methods: The study was a subanalysis of a clinical trial. Patients with advanced ischemic heart disease and refractory angina were assessed for eligibility. Inclusion criteria were as follows: signs and symptoms of angina and/or heart failure despite maximum medical treatment and a myocardial ischemic area of at least 5% as assessed by single-photon emission computed tomography (SPECT). Exclusion criteria were as follows: age > 65 years, left ventricular ejection fraction < 25%, and a diagnosis of cancer. Patients whose EPC levels were assessed were included. The intervention was 2000 µg of VEGF 165 plasmid injected into the ischemic myocardium. The frequency of CD34+/KDR+ cells was analyzed by flow cytometry before and 3, 9, and 27 days after the intervention.

Results: A total of 9 patients were included, 8 males, mean age 59.4 years, mean left ventricular ejection fraction of 59.3% and predominant class III angina. The number of EPCs on day 3 was significantly higher than that at baseline ($p = 0.03$); however, that on days 9 and 27 was comparable to that at baseline.

Conclusion: We identified a transient mobilization of EPCs, which peaked on the 3th day after VEGF 165 gene therapy in patients with refractory angina and returned to near baseline levels on days 9 and 27. (Arq Bras Cardiol. 2013;101(2):149-153)

Keywords: Endothelial Cells; Capillary Permeability; Genetic Therapy; Vascular Endothelial Growth Factor A.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Renato Abdala Karam Kalil •

Av. Princesa Isabel, 370, Santana, CEP 90620-000, Porto Alegre, RS - Brasil

E-mail: kalil.pesquisa@gmail.com, editoracao-pc@cardiologia.org.br

Artigo recebido em 29/10/12; revisado em 29/10/12; aceito em 14/03/13

DOI: 10.5935/abc.20130128

Introdução

Angina refratária é caracterizada por desconforto torácico severo e persistente^{1,2} e é resistente aos tratamentos cardiológicos tradicionais, incluindo cirurgia de revascularização do miocárdio (CRM), intervenção coronária percutânea (ICP) e terapia medicamentosa máxima^{1,2}. Somente nos Estados Unidos, há aproximadamente 300.000 a 900.000 casos de angina refratária; além disso, são diagnosticados aproximadamente 25.000 a 75.000 pacientes novos a cada ano³. Neste contexto, terapia gênica, a qual possui potencial para promover a angiogênese miocárdica e a circulação colateral no miocárdio isquêmico, pode representar uma possível alternativa de tratamento para estes pacientes⁴.

O processo de angiogênese envolve a mobilização de células progenitoras endoteliais (CPEs), que são células multipotentes com a capacidade de se proliferar e diferenciar em células endoteliais maduras⁵. A terapia gênica usando o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) 165 aparentemente promove a mobilização de CPEs⁶, mas pouco se sabe sobre o comportamento destas células em pacientes com angina refratária submetidos à terapia gênica com altas doses de VEGF 165.

A maioria dos estudos que utilizam VEGF 165 em pacientes com doença cardíaca isquêmica utilizaram outras intervenções combinadas, como CRM e ICP⁷⁻¹⁰. No entanto, existe uma classe de pacientes que não são elegíveis para intervenções como essas; portanto, esses tratamentos combinados não são uma opção para eles^{1,2}. Em situações como essas, a terapia gênica isolada pode ser uma solução, mas até hoje poucos estudos foram realizados, sendo que a maioria utiliza doses baixas de VEGF (125–250 µg)^{9,11,12}. Portanto, o comportamento de CPEs em pacientes que recebem terapia gênica com doses altas de VEGF permanece incerto.

Este estudo teve o objetivo de avaliar o comportamento de CPEs em pacientes com doença cardíaca isquêmica e angina refratária que receberam uma injeção intramiocárdica de 2000 µg de VEGF165 como terapia única.

Métodos

Delineamento do Estudo

Trata-se de uma subanálise de um ensaio clínico (ClinicalTrials.gov NCT 00744315), o qual buscou avaliar a segurança, viabilidade e efeitos clínicos iniciais de administração transtorácica intramiocárdica de plasmídeo VEGF 165 em perfusão miocárdica em pacientes com doença arterial coronariana avançada e angina refratária que não foram qualificados para a revascularização percutânea ou cirúrgica. A justificativa e o delineamento deste ensaio clínico foram descritos anteriormente⁴. Este foi o primeiro ensaio clínico utilizando terapia gênica em pacientes com angina refratária na América Latina. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética local e todos os pacientes forneceram o consentimento livre e esclarecido prévio por escrito para participar.

Participantes do Estudo

Pacientes com doença cardíaca isquêmica avançada, não elegíveis à CRM e ICP, conforme avaliados por cirurgião e cardiologista intervencionista, foram considerados elegíveis para o estudo. Os critérios de inclusão foram: sinais e sintomas de angina e/ou insuficiência cardíaca apesar de tratamento medicamentoso

máximo e uma área de isquemia miocárdica de, no mínimo, 5% conforme avaliado por uma tomografia computadorizada por emissão de fóton único (TCEFU). Os critérios de exclusão foram: idade > 65 anos, fração de ejeção do ventrículo esquerdo < 25% e diagnóstico de câncer. A subanálise incluiu somente pacientes cujos níveis de CPE foram avaliados durante o estudo.

Intervenção

Todos os pacientes foram submetidos a intervenção cirúrgica sob o efeito de anestesia geral em um centro especializado em cirurgia cardiovascular. O coração foi exposto por uma incisão de aproximadamente 5cm no 4º ou 5º espaço intercostal esquerdo de acordo com a área a ser tratada. Foi realizada pericardiotomia extensa, seguida de reparo para expor a face ventricular do miocárdio a ser tratada. Esta área havia sido previamente identificada por cintilografia tomográfica do miocárdio. Sob visão direta, 10 pontos do miocárdio isquêmico receberam um total de 2000µg do plasmídeo com o gene, o qual foi diluído em um total de 5ml de solução salina, através de uma agulha butterfly 25F. Antes da toracorráfia, um dreno torácico foi colocado e mantido por 12 horas. A dor pós-operatória foi manejada com bloqueios intercostais e analgésicos injetáveis.

Vetor do Plasmídeo

A estrutura do plasmídeo usado foi desenvolvida por um dos membros da nossa equipe Sang W. Han na Universidade Federal de São Paulo e produzida comercialmente pela Excellion Technology (Brasil, Petrópolis, RJ). A estrutura do plasmídeo de PEX-HV5 foi composta por íntron 1 de citomegalovírus (CMV) e seu promotor com sinais de splicing. O cDNA VEGF165 humano foi inserido entre o CMV, promotor e a sequência poliA bovina. Este vetor também continha origem pUC e sequências de resistência à canamicina para propagação em bactérias.

Desfechos

As CPEs foram analisadas utilizando citometria de fluxo antes e 3, 9 e 27 dias após a intervenção. As células mononucleares foram separadas do sangue periférico usando um gradiente de Ficoll (Ficoll-Paque, Invitrogen). A imunofenotipagem foi realizada pela coloração específica com anti-CD34 (BD Biosciences) e anti-KDR (BD Biosciences) conjugada ao fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e ficoeritrina (PE), respectivamente. As populações CD34+ e KDR+ foram analisadas no citômetro FACSCalibur utilizando o software CellQuest com a colaboração do Laboratório de Imunogenética no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A frequência de células CD34+/KDR+ foi analisada na barreira linfocitária na fração mononuclear do sangue periférico e 100.000 eventos foram contados. Os resultados mostram o número de células duplo-positivas (n/100.000 células).

Métodos Estatísticos

As variáveis contínuas são expressas em médias e desvios padrões e as variáveis categóricas em frequências absolutas e relativas. O teste não paramétrico de Friedman foi usado para comparar a mesma variável em momentos diferentes em relação ao mesmo grupo. As análises foram realizadas usando o pacote estatístico SPSS 18.0.

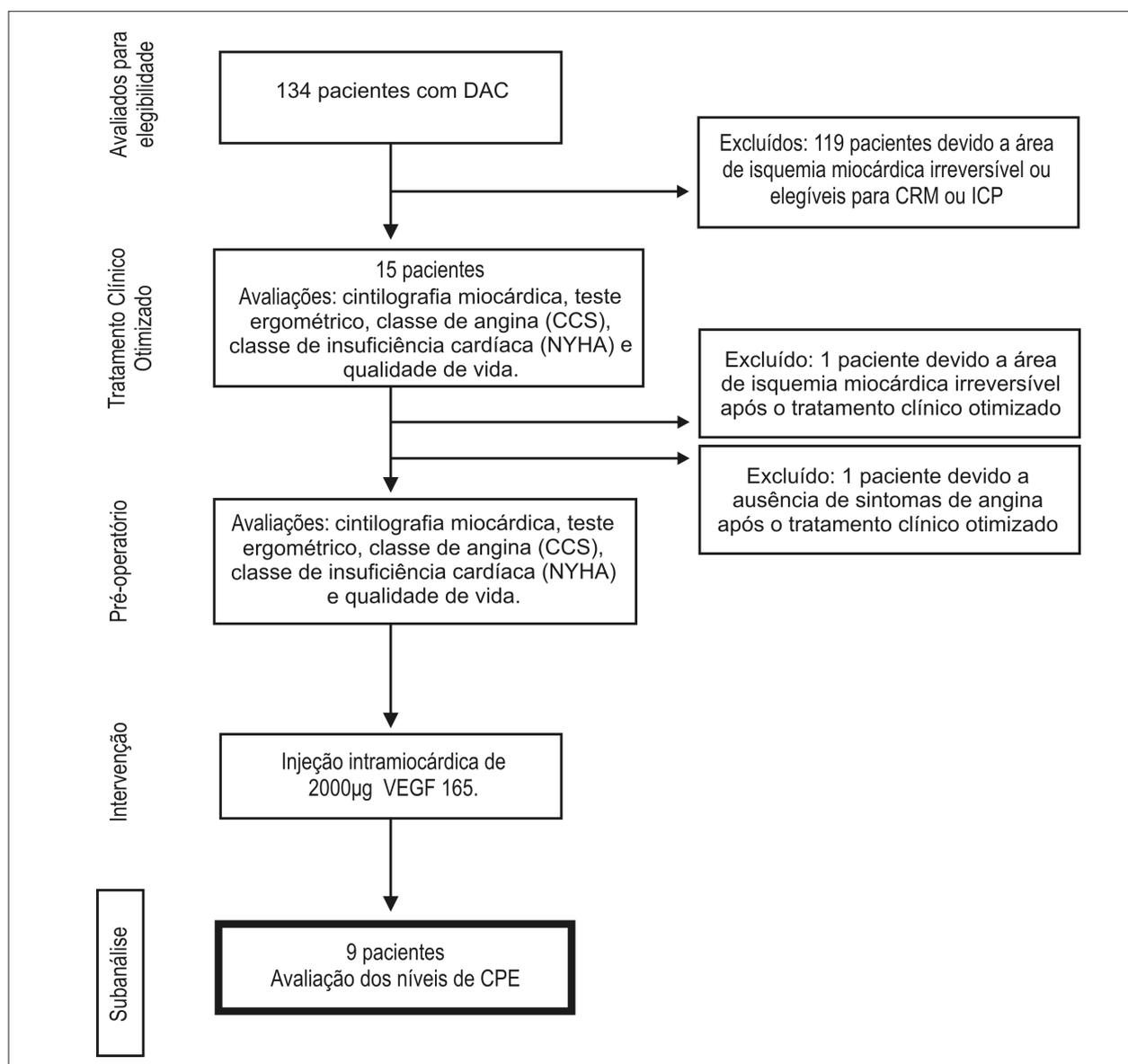


Figura 1 - Fluxograma de pacientes do estudo. DAC: doença arterial coronariana; CRM: cirurgia de revascularização do miocárdio; ICP: intervenção coronariana percutânea; CCS: Canadian Cardiology Society; NYHA: New York Heart Association; VEGF: Vascular endothelial growth factor.

Resultados

Pacientes

Dos 13 pacientes incluídos no ensaio clínico primário, nove tiveram os níveis de CPEs avaliados e foram incluídos nesta subanálise. O fluxograma de pacientes do estudo é apresentado na Figura 1.

Dos nove pacientes, oito eram homens, média de idade de $58,4 \pm 5,5$ anos, média de fração de ejeção ventricular esquerda de $59,3 \pm 8,8\%$, oito eram hipertensos e quatro diabéticos. A maioria dos pacientes apresentava angina classe III. Todos os pacientes haviam sido submetidos a ICP prévia, e sete deles à CRM, representando a gravidade da doença isquêmica destes pacientes (Tabela 1)

Desfechos

Não houve mortes ou recorrências. A terapia demonstrou ser segura e viável nesta série de pacientes. Os resultados iniciais apresentaram uma redução na gravidade da angina e intensidade da isquemia miocárdica, conforme descrito anteriormente pelo nosso grupo⁴.

As análises de CPEs demonstraram um aumento nos níveis destas células no terceiro dia após a intervenção, quando comparado ao período basal (período basal, $42,7 \pm 19,2$; dia 3, $66,6 \pm 34,3$; $p=0,03$). No entanto, aos nove e 27 dias após a intervenção, os níveis de CPE apresentaram-se similares aos níveis basais (período basal, $42,7 \pm 19,2$; dia 9, $34,9 \pm 15,0$; $p=NS$) e (período basal, $42,7 \pm 19,2$; dia 27, $36,1 \pm 12,9$; $p=NS$) (Figura 2).

Tabela 1 - Características demográficas, clínicas e angiográficas

Características	N (%)
Homem	8 (89)
Idade*	58,4 ± 5,5
Fração de Ejeção do Ventriculo Esquerdo*	59,3 ± 8,8
Hipertensão	8 (89)
Diabetes	4 (44)
Classe da Angina (CCS)	
III	7 (78)
IV	2 (22)
Revascularização Miocárdica Anterior	
Intervenção Coronária Percutânea	9 (100)
Cirurgia de Revascularização do Miocárdio	7 (78)

*média e desvio padrão. CCS: Canadian Society of Cardiology.

Discussão

Este estudo foi o primeiro, de acordo com o nosso conhecimento, que avaliou a mobilização de CPes em pacientes com cardiomiopatia isquêmica e angina refratária que foram submetidos à terapia gênica com 2000 µg de VEGF 165. Nossos resultados demonstraram uma mobilização transitória de CPes, com um pico no terceiro dia após a terapia gênica.

Estudo anterior, o qual avaliou a mobilização de CPes após terapia gênica, utilizou injeções de 250 µg de VEGF 165 intramiocárdica em 13 pacientes com isquemia miocárdica e relatou um pico de CPes durante a primeira e quarta semanas após a intervenção. No entanto, além de utilizar uma dose substancialmente menor que a utilizada no nosso estudo, os resultados de citometria de fluxo foram obtidos com base em histogramas de 10.000 a 20.000 células por amostra. No nosso estudo, utilizamos o número de células duplo-positivas n/100.000, dificultando a comparação entre os estudos.

CPes possuem a capacidade de mobilização e proliferação nas lesões vasculares, contribuindo para a neoangiogênese¹³. A mobilização de CPes da medula óssea em resposta a diversos

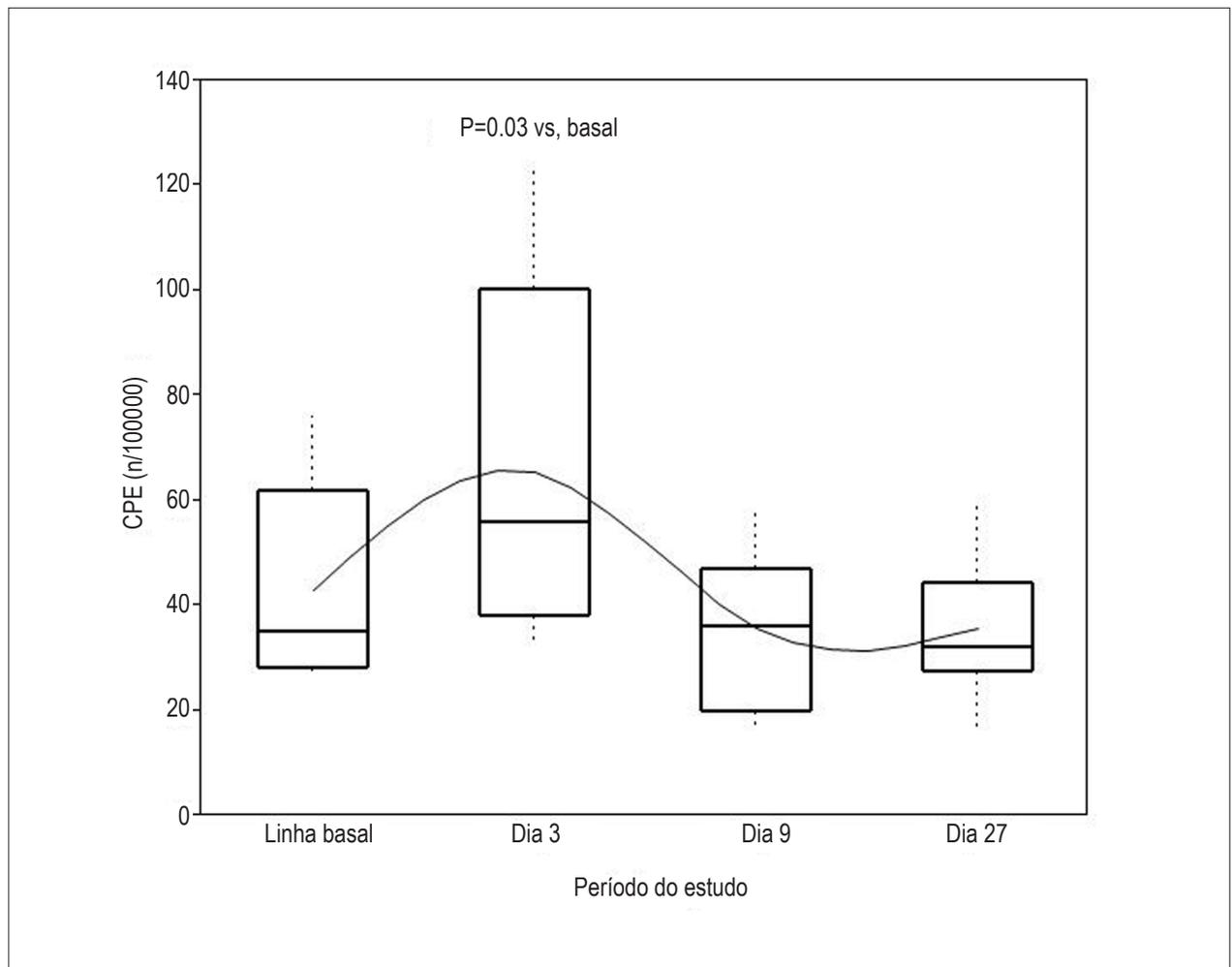


Figura 2 - Fluxo de pacientes.

sinais tem sido bem descrita⁵. Estudos anteriores demonstraram a capacidade do VEGF de promover a mobilização e diferenciação de CPE *in vivo* e CPE *in vitro*^{14,15}. Além disso, CPEs circulantes demonstraram contribuir para o processo de neovascularização¹⁶. A mobilização transitória de CPEs após a terapia gênica conforme observado em nosso estudo está de acordo com os achados de estudos experimentais e clínicos anteriores⁶. A expressão de VEGF após a terapia gênica parece ser transitória⁶. Estudos anteriores apresentaram uma correlação positiva entre CPEs circulantes e níveis plasmáticos de VEGF^{6,14}, que podem ajudar a explicar a mobilização transitória de CPEs. Além disso, sugerimos que a expressão celular permanente de VEGF e mobilização constante de CPEs após a terapia gênica não é desejável, pois esta atividade pode aumentar o risco de formação de tumor devido à possível multiplicação não controlada de células. Acredita-se que é desejável atingir a expressão transitória de VEGF e mobilização de CPEs o suficiente para iniciar o processo angiogênico e formação de circulação colateral no miocárdio isquêmico, resultando em melhora da perfusão miocárdica. Neste sentido, acredita-se que os resultados do nosso estudo são promissores.

A pequena amostra de pacientes pode ser considerada uma limitação do estudo; no entanto, este tamanho de amostra é resultado de um ensaio clínico de fase I/II⁴ para testar a segurança e viabilidade de 2000 µg de VEGF 165 como terapia única para doença cardíaca isquêmica com angina refratária. Estes estudos visam testar a segurança e viabilidade do procedimento e fornecer resultados clínicos iniciais, e normalmente incluem amostras pequenas de pacientes por motivos de segurança. Contudo, este estudo contribui para do comportamento de CPE e do processo angiogênico após a terapia gênica com altas doses de VEGF 165. Dessa forma, as informações obtidas neste estudo podem ser usadas como justificativa para futuros ensaios clínicos de fase II ou III.

Referências

1. Bhatt AB, Stone PH. Current strategies for the prevention of angina in patients with stable coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol*. 2006;21(5):492-502.
2. McGillion M, L'Allier PL, Arthur H, Watt-Watson J, Svorkdal N, Cosman T, et al. Canadian Cardiovascular Society. Recommendations for advancing the care of Canadians living with refractory angina pectoris: a Canadian Cardiovascular Society position statement. *Can J Cardiol*. 2009;25(7):399-401.
3. Yang EH, Barsness GW, Gersh BJ, Chandrakaran K, Lerman A. Current and future strategies for refractory angina. *Mayo Clin Proc*. 2004;78(10):1284-92.
4. Kalil RA, Salles FB, Giusti II, Rodrigues CG, Han SW, Sant'Anna RT, et al. VEGF gene therapy for angiogenesis in refractory angina: phase I/II clinical trial. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2010;25(3):311-21.
5. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(7):1185-9.
6. Kalka C, Tehrani H, Lundenberg B, Vale PR, Isner JM, Asahara T, et al. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg*. 2000;70(3):829-34.
7. Ruel M, Beanlands RS, Lortie M, Chan V, Camack N, deKemp RA, et al. Concomitant treatment with oral L-arginine improves the efficacy of surgical angiogenesis in patients with severe diffuse coronary artery disease: the Endothelial Modulation in Angiogenic Therapy randomized controlled trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008;135(4):762-70.
8. Stewart DJ, Kutryk MJ, Fitchett D, Freeman M, Camack N, Su Y, et al. VEGF gene therapy fails to improve perfusion of ischemic myocardium in patients with advanced coronary disease: results of the NORTHERN trial. *Mol Ther*. 2009;17(11):1109-15.

Conclusão

Identificamos uma mobilização transitória de CPEs, com pico no terceiro dia a intervenção, e retorno aos níveis basais aos nove e 27 dias após terapia gênica com 2000 µg de VEGF 165 em pacientes com angina refratária.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Rodrigues CG, Plentz RDM, Dipp T, Salles FB, Sant'Anna RT, Nesralla IA, Beyer NN, Kalil RAK; Obtenção de dados: Rodrigues CG, Dipp T, Salles FB, Giusti II, Sant'Anna RT, Eibel B; Análise e interpretação dos dados: Rodrigues CG, Plentz RDM, Dipp T, Eibel B, Markoski M, Beyer NN, Kalil RAK; Análise estatística: Rodrigues CG, Dipp T, Giusti II; Obtenção de financiamento: Rodrigues CG, Plentz RDM, Dipp T, Nesralla IA, Markoski M, Beyer NN, Kalil RAK; Redação do manuscrito: Rodrigues CG, Salles FB, Eibel B; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual: Plentz RDM, Giusti II, Sant'Anna RT, Nesralla IA, Markoski M, Beyer NN, Kalil RAK.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPERGS.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Clarissa Garcia Rodrigues pelo Instituto de Cardiologia do RG - Fundação Universitária de Cardiologia.

9. Symes JF, Losordo DW, Vale PR, Lathi KG, Esakof DD, Maysky M, et al. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann Thorac Surg*. 1999;68(3):830-6.
10. 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(9):965-74.
11. 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(25):2800-4.
12. Sarkar N, Rück A, Källner 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(5):373-81.
13. Urcich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells. Characterization and role in vascular biology. *Circulation*. 2004;95(4):343-53.
14. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999;85(3):221-8.
15. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999;5(4):434-8.
16. Krenning G, van Luyn MJ, Harmsen MC. Endothelial progenitor cell- based neovascularization: implications for therapy. *Trends Mol Med*. 2009;15(4):180-9.