

Terapia gênica para cardiopatia isquêmica: revisão de ensaios clínicos

Gene therapy for ischemic heart disease: review of clinical trials

Bruna Eibel¹, Clarissa G. Rodrigues², Imarilde I. Giusti¹, Ivo A. Nesralla³, Paulo R. L. Prates³, Roberto T. Sant'Anna⁴, Nance B. Nardi⁵, Renato A. K. Kalil⁶

DOI: 10.5935/1678-9741.20110056

RBCCV 44205-1332

Resumo

Cardiopatia isquêmica grave com angina refratária a formas convencionais de tratamento apresenta-se em uma crescente incidência. Para tratar angina refratária, terapias alternativas na tentativa de redução da isquemia miocárdica e alívio de sintomas têm sido estudadas. Neste contexto, a terapia gênica representa uma opção, pela possibilidade de induzir angiogênese, estabelecer circulação colateral e reperfundir miocárdio isquêmico. Diversos ensaios clínicos têm sido conduzidos e, com exceção de casos isolados e específicos de efeitos adversos, há indicação de segurança, viabilidade e potencial eficácia da terapia. O benefício clínico não está bem definido. Neste artigo, revisamos os ensaios clínicos que utilizaram terapia gênica para tratamento de pacientes cardiopatas isquêmicos. A abordagem inclui: (1) isquemia miocárdica e angiogênese, sobre os aspectos fisiopatológicos envolvidos; (2) fatores de crescimento, tratando sobre aspectos específicos e justificando a utilização em pacientes cardiopatas isquêmicos sem opções pela terapêutica convencional; (3) ensaios clínicos controlados, onde é apresentado um resumo dos principais estudos envolvendo terapia gênica para tratamento da cardiopatia isquêmica grave; (4) nossa experiência, especialmente sobre resultados preliminares do primeiro ensaio clínico de terapia gênica do Brasil e (5) perspectivas.

Descritores: Terapia de genes. Isquemia miocárdica. Angina pectoris.

Abstract

Severe ischemic heart disease with refractory angina, occurs in increasing incidence. Alternative forms of treatment, in an attempt to reduce myocardial ischemia and relief of symptoms has been studied. In this context, gene therapy is an option, for the possibility of inducing angiogenesis, establish collateral circulation and reperfuse ischemic myocardium. Several clinical trials have been conducted and, except for specific cases of adverse effects, there is indication of safety, feasibility and potential effectiveness of therapy. The clinical benefit, however, is not yet well established. In this article we review the clinical trials of gene therapy for patients with ischemic heart disease. The approach includes: (1) myocardial ischemia and angiogenesis on the pathophysiological aspects involved, (2) growth factors, dealing with specific aspects and justifying the use in cardiac patients with no option for conventional therapy, (3) controlled clinical trials, where a summary of the main studies involving gene therapy for severe ischemic heart disease is presented, (4) our experience, especially on preliminary results of the first gene therapy clinical trial in Brazil and (5) future prospects.

Keywords: Gene therapy. Myocardial ischemia. Angina pectoris.

1. Mestranda do Programa de Pós-Graduação do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul/ Fundação Universitária de Cardiologia (IC/FUC), Porto Alegre, RS, Brasil.
2. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação do IC/FUC, Porto Alegre, RS, Brasil.
3. Cirurgião Cardíaco do IC/FUC, Porto Alegre, RS, Brasil.
4. Cardiologista do IC/FUC, Porto Alegre, RS, Brasil.
5. Bióloga e Pesquisadora Colaboradora do IC/FUC, Porto Alegre, RS, Brasil.
6. Doutorando; Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul/ Fundação Universitária de Cardiologia (IC/FUC) e Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFSCPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

Trabalho realizado no Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul/ Fundação Universitária de Cardiologia (IC/FUC) e Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFSCPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

Endereço para correspondência:
Renato A. K. Kalil
Av. Princesa Isabel, 370 – Santana – Porto Alegre, RS, Brasil – CEP:
90620-000 -
E-mail: kalil.pesquisa@cardiologia.org.br

Artigo recebido em 14 de junho de 2011
Artigo aprovado em 5 de setembro de 2011

INTRODUÇÃO

Estima-se que as doenças cardiovasculares (DCV) causem cerca de 17 milhões de mortes por ano no mundo, com prevalência maior nos países desenvolvidos [1]. DCV deverão ser líderes em mortalidade no mundo em desenvolvimento dentro das próximas décadas, podendo alcançar níveis epidêmicos [1]. A doença arterial coronariana (DAC) é um problema de crescente prevalência, principalmente nos grandes centros e nas populações de faixa etária mais elevada, sua mortalidade corresponde a 80% dos óbitos por DCV [2,3]. A angina refratária às formas tradicionais de tratamento em cardiologia, incluindo revascularização cirúrgica e percutânea e tratamento medicamentoso otimizado, representa até 15% do total de casos de angina [2]. De acordo com estatísticas da *American Heart Association* [3], a prevalência de angina refratária na população americana é de 4,6%, afetando 58% dos pacientes com DAC e crescendo rapidamente com o aumento da idade. Apesar dos avanços nas formas de tratamento, estima-se que a incidência de pacientes com angina refratária irá aumentar nos próximos anos [4,5], tornando evidente a necessidade de novas opções terapêuticas.

Neste contexto, a terapia gênica poderia ser uma opção, pelo potencial de induzir angiogênese miocárdica e estabelecer circulação colateral [5]. A terapia gênica pode ser definida como um conjunto de técnicas que permitem a inserção e expressão de um gene terapêutico em células-alvo que apresentam algum tipo de desordem de origem genética (não necessariamente hereditária), possibilitando a correção dos produtos gênicos inadequados que causam doenças, portanto sendo uma alternativa para o tratamento de doenças baseado na transferência de material genético [6-8]. Estudos têm testado os efeitos em pacientes cardiopatas isquêmicos utilizando diferentes fatores de crescimento, diversas doses, vetores e vias de administração. Destaca-se o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF - *vascular endothelial growth factor*), um regulador das células endoteliais, que tem a propriedade de mediar a angiogênese durante o reparo tecidual [4].

A disponibilidade de vetores com tropismo pelo miocárdio, capazes de uma expressão proteica longa e estável [9], e o isolamento de células progenitoras com potencial angiogênico e regenerativo [10] oferece possibilidades de desenvolvimento de terapia baseada em proteção e regeneração do miocárdio isquêmico.

Apesar de promissores, os efeitos clínicos e sobre a vascularização do miocárdio proporcionados pela terapia gênica permanecem não esclarecidos totalmente. O objetivo desse estudo é revisar os ensaios clínicos que utilizaram terapia gênica para o tratamento de pacientes cardiopatas isquêmicos.

TERAPIA GÊNICA APLICADA À CARDIOPATIA ISQUÊMICA

Isquemia Miocárdica e Angiogênese

Na fisiopatologia da cardiopatia isquêmica, dois processos estão implicados: a oferta e a demanda de oxigênio pelo miocárdio. A isquemia miocárdica ocorre quando há desequilíbrio entre a oferta e a demanda de oxigênio. Duas situações alteram a oferta de oxigênio para o miocárdio: a isquemia e a hipoxemia. Em algumas condições, o comprometimento da oferta de oxigênio é secundário à diminuição do fluxo sanguíneo e, em outras situações, o aumento na demanda de oxigênio é o principal responsável pela isquemia miocárdica [11].

Recursos de biologia molecular e terapia gênica têm sido desenvolvidos para aplicação na terapêutica cardiovascular, em situações nas quais não há opções, ou quando estas apresentam limitações pelos métodos convencionais. A principal área de desenvolvimento de terapia gênica em cardiologia é na indução de angiogênese miocárdica, com potenciais benefícios na cardiopatia isquêmica em fase terminal, após esgotados os recursos farmacológicos, intervencionistas por cateter e cirúrgicos, ou seja, naqueles casos refratários a todas as formas de tratamento, onde restaria apenas o recurso do transplante cardíaco [4].

Angiogênese, a formação de novos vasos a partir do endotélio de vasos já existentes, possui papel essencial no desenvolvimento embrionário, reparo tissular e progressão de uma variedade de processos patológicos [12,13]. A angiogênese induzida pela administração de fatores de crescimento destina-se a promover a formação de novos vasos, capilares e arteríolas.

O mecanismo da angiogênese pode ser iniciado por alguns fatores de natureza mecânica, por processos inflamatórios ou por hipoxia (desbalanço energético). O processo de angiogênese ocorre por estágios (Figura 1) que compreendem: dilatação do vaso, ativação de células endoteliais, ativação de plaquetas, secreção de ativadores do plasminogênio e enzimas proteolíticas, desgranulação de mastócitos, ativação de macrófagos, ruptura da membrana basal e aumento de permeabilidade com saída de fibrina e outras proteínas. A seguir, ocorre formação de pseudópodos, degradação da matriz extracelular, migração de células endoteliais para o espaço extravascular com proliferação das mesmas e formação de brotos de tecido vascular. Por fim, forma-se nova membrana basal e maturação da nova parede vascular para estabelecimento do fluxo sanguíneo, formação de tubos e conexões, estabelecendo-se os novos vasos [14].

A ideia de que fatores angiogênicos possam promover revascularização de tecidos isquêmicos é denominada angiogênese terapêutica [15]. O conceito de angiogênese terapêutica em humanos, através de ensaios clínicos fase I,

levou adiante a ideia de testar esta estratégia em cardiopatas isquêmicos. Portanto, a angiogênese terapêutica é uma estratégia desenvolvida para amplificar o processo natural da angiogênese e reperfundir tecidos isquêmicos, podendo representar um novo processo de revascularização nesses pacientes de alto risco [16].

Há influência direta da inflamação e da hipoxia sobre a angiogênese. A inflamação aumenta a produção do peptídeo derivado de macrófagos PR-39; este, inibe a degradação de HIF 1- α (*hypoxia-inducible factor 1- α*) levando ao aumento da expressão de VEGF e seus receptores [17]. A inflamação induz a produção de citocinas promotoras da angiogênese [18]. Em contrapartida, PR-39 aumenta a produção de fatores de crescimento dos fibroblastos (FGF), os quais têm poder angiogênico. Fatores mecânicos podem atuar ativando o mesmo mecanismo e resultando em angiogênese [10].

Fator de Crescimento Endotelial Vascular, Fator de Crescimento dos Fibroblastos (FGF), Fator de Crescimento dos Hepatócitos (HGF); Vetores Plasmidial e Adenoviral

A formação de novos vasos responde ao estímulo de fatores angiogênicos, os quais regulam a migração endotelial, proliferação, sobrevida e atividade proteolítica.

Entre os fatores descritos na literatura, o VEGF tem emergido como regulador crítico do processo pró-angiogênico [19-21]. Essa molécula promove a formação de novos vasos e sua morfogênese, por meio de um complexo processo de eventos angioregulatorios [22,23].

VEGF, membro da família do VEGFA, a qual consiste em cinco isoformas, resultantes de divisões alternativas de um *gene* único, ou seja: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆, é um fator de crescimento específico do endotélio [24,25]. Age, principalmente, ativando dois receptores do tipo tirosina quinase Flt-1 (*fms-like tyrosine kinase-1, VEGF receptor-1*) [26] e KDR (*kinase-insert domain-containing receptor, VEGF receptor-2*) [27], mas também pode ativar outros receptores, como neuropilin-1 e 2 [28]. O VEGF pode representar uma nova modalidade de tratamento para a cardiopatia isquêmica. Isso se deve à possibilidade de desenvolver novos vasos arteriais ou promover a reformação dos vasos existentes [29]. O VEGF₁₆₅ contém 165 aminoácidos e funciona interagindo com receptores específicos das células endoteliais, iniciando a cascata de eventos que culmina com a migração de células endoteliais, proliferação e agregação em microtúbulos que acabarão por formar uma rede de sistemas arteriais e venosos.

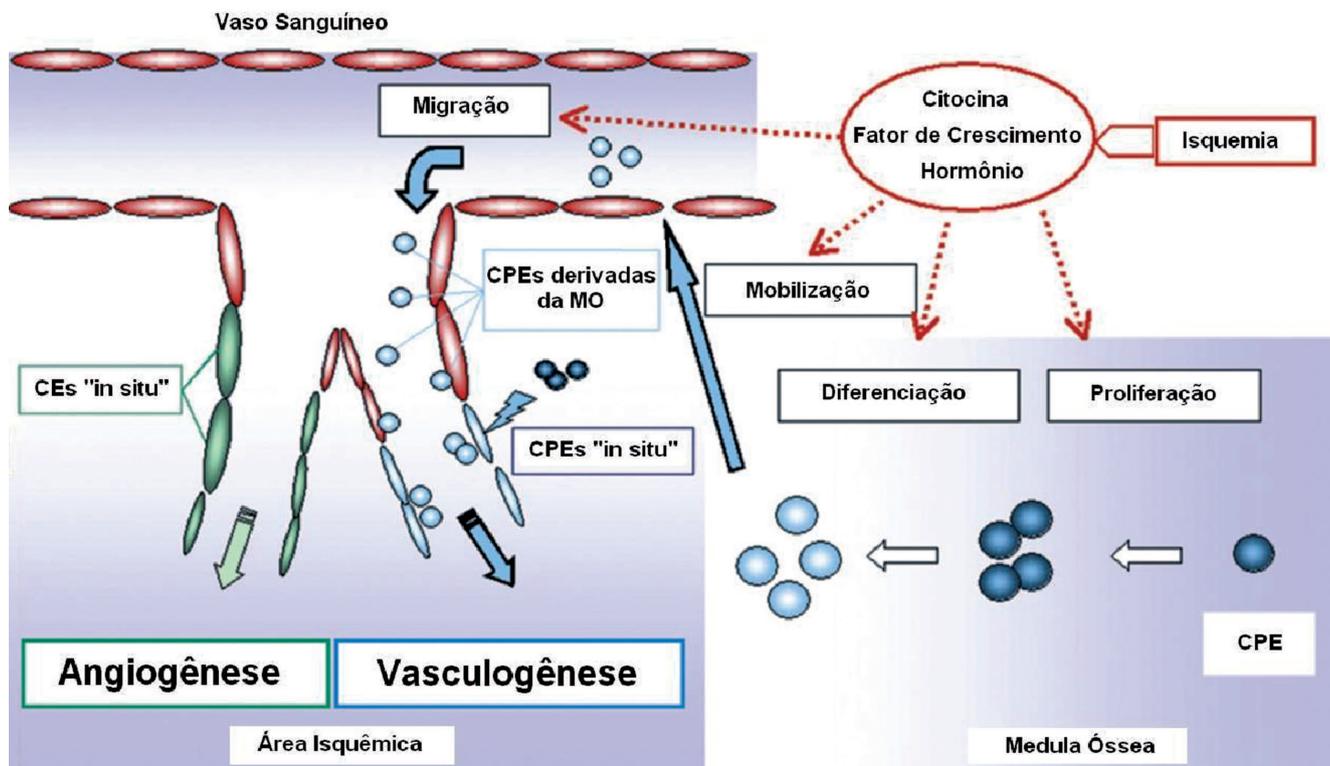


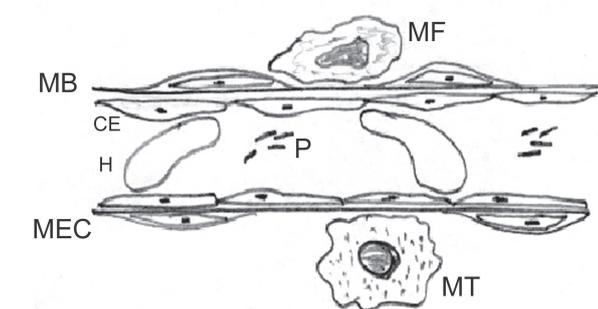
Fig. 1 – Sequência de eventos no processo da angiogênese [30]

A terapia gênica em doenças cardiovasculares não visa a substituir um gene anormal, mas suprarregular a expressão de uma proteína útil, aumentando o conteúdo de DNA. Sua efetividade depende do gene, do vetor e da forma de administração utilizados [30]. O VEGF funciona tanto como um importante marcador de dano endotelial, quanto mediador de reparo. Em casos de lesão como isquemia, inflamação e infarto têm sua expressão aumentada. Além disso, estimula a manutenção, mobilização e recrutamento das células progenitoras endoteliais (CPE) da medula óssea [31]. O potencial angiogênico do VEGF estimula a produção endotelial de óxido nítrico por meio da ativação da enzima óxido nítrico sintetase (eNOS) (Figura 2).

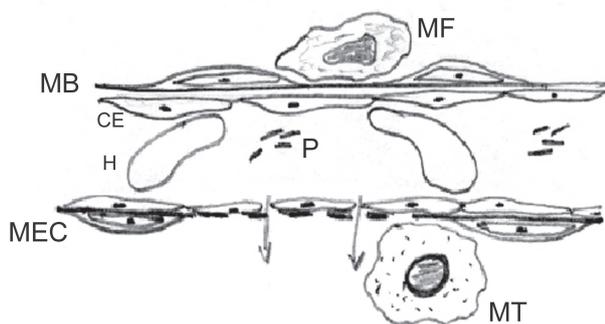
O endotélio sintetiza importantes substâncias, desempenhando papel fundamental sobre o controle vascular, tanto em situações fisiológicas quanto em processos patológicos, como as síndromes coronarianas.

A monocamada de células endoteliais atua como uma superfície não aderente para plaquetas e leucócitos, produzindo uma variedade de importantes fatores regulatórios, como o NO [32]. Dessa forma, influencia não somente o tono vascular, mas também o seu remodelamento, por meio da produção de substâncias promotoras e inibidoras do seu crescimento [33].

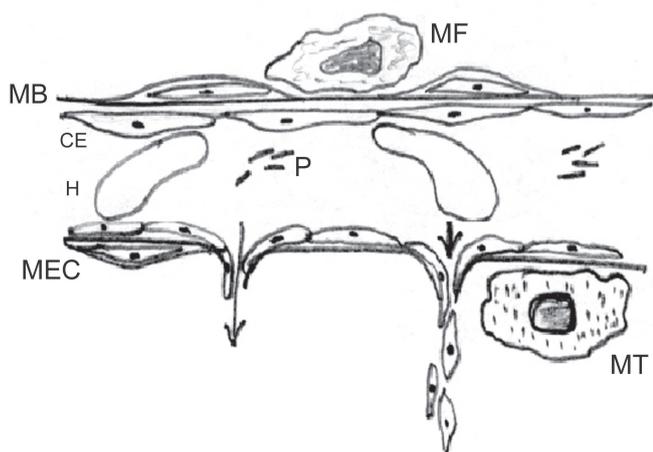
A disfunção nas células endoteliais leva a uma perda das propriedades antitrombóticas da parede vascular e corresponde ao início do processo aterosclerótico [32]. A reconstrução endotelial ocorre pela migração e proliferação de células endoteliais maduras circulantes. Entretanto, essas células têm baixo potencial proliferativo e sua capacidade de reparo é limitada. Evidências indicam que a circulação periférica contém subtipos celulares da medula óssea, com propriedades similares aos angioblastos embrionários. As CPE possuem capacidade proliferativa e de diferenciação



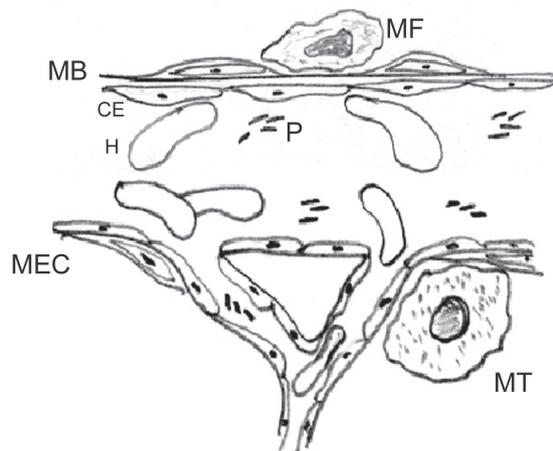
Estágio 0 da angiogênese: vaso estável. Componentes maiores de um capilar normal que pode ser envolvido no processo de angiogênese



Estágio 1 da angiogênese: alterações dentro dos vasos



Estágio 2 da angiogênese: formação de um novo canal



Estágio 3 da angiogênese: Maturação do novo vaso.

MB: membrana basal; **CE:** células endoteliais; **H:** hemáceas; **P:** plaquetas; **MEC:** matriz extracelular; **MF:** macrófago; **MT:** mastócito

Fig. 2 – Mobilização de células progenitoras endoteliais para neovascularização. Adaptado de Murasawa et al. [68]

em células endoteliais maduras, podendo ser induzidas por diferentes citocinas ou fatores de crescimento, adquirindo diferentes fenótipos [32].

A família FGF compreende pelo menos nove polipeptídeos, incluindo FGF básico e FGF ácido. Diferentemente do VEGF, FGF atua na mitogênese de células endoteliais, de fibroblastos e de células musculares lisas [18]. A maior disponibilidade do FGF fez com que o emprego desse gene tenha sido mais estudado. Entre os estudos experimentais, cabe destacar o relatado por Kawasuji *et al.* [34] em um modelo de infarto agudo do miocárdio, onde se demonstrou a resposta ao FGF em aumentar o número de vasos capilares na zona limítrofe e no epicárdio da área infartada, no aumento do fluxo sanguíneo nessas áreas e na melhora da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, 7 dias após o infarto.

Por outro lado, o HGF é um potente mitógeno para uma grande variedade de células, sendo angiogênico, antiapoptótico e possuindo propriedades antifibróticas [35,36]. Em um estudo piloto de terapia gênica em pacientes com DAC, Yang *et al.* [37] relataram a crescente evidência dos efeitos benéficos do HGF no infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e doença arterial obstrutiva periférica. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da administração intracoronariana de um vetor de adenovírus que codifica o gene HGF humano (Ad-HGF) sobre os níveis séricos de citocinas e mobilização de células CD34 (+) e CD117 (+) em pacientes com doença cardíaca. Diante dos achados, concluiu-se que a terapia gênica com HGF pode desempenhar um papel importante na regulação das citocinas inflamatórias e indução da mobilização de CPE em pacientes com DAC.

Vetores genéticos são todas as moléculas de DNA com potencial de replicação autonômica dentro da célula hospedeira, na qual sequências de DNA podem ser inseridas e ampliadas. A origem do vetor permite classificar em plasmidiais, bacteriófagos ou virais [38]. Eles são utilizados para transportar genes para células receptoras. Possuem não apenas marcadores para facilitar seu reconhecimento, como também sequências replicadoras. Vetores comuns para transporte incluem plasmídeos carreadores de DNA “nu” e vetores virais, como adenovírus, lentivírus e retrovírus.

Vantagens e desvantagens em relação ao vetor empregado incluem o tamanho do gene inserido, o sítio de incorporação no núcleo, a duração da expressão, a eficiência da transferência e o grau de resposta imune do organismo [39]. O vetor plasmidial é expresso por apenas alguns dias após administração e o vetor viral apresenta expressão do gene por algumas semanas [40]. Assim, os estudos clínicos que tentam tratar a fase final da doença isquêmica através da terapia gênica podem ser limitados por duração inadequada da exposição ao agente angiogênico [4].

A terapia gênica sofreu um revés importante quando da ocorrência de um óbito em sujeito de pesquisa, provavelmente devido à alta carga viral administrada, tendo

havido cancelamento de vários projetos clínicos e retorno à pesquisa laboratorial. Desde 2000, poucos projetos de aplicação clínica foram desenvolvidos. Teoricamente, antes de serem introduzidos no paciente, os vírus usados como vetores sofrem várias alterações genéticas, de modo que o gene terapêutico é inserido, enquanto diversos outros genes que lhe conferem virulência são retirados ou inativados [7,41,42]. Assim, ao se ligar e invadir a célula-alvo, os vetores virais injetam seu material genético contendo o gene terapêutico no DNA do paciente, possibilitando a transcrição e tradução do gene para sua proteína funcional correspondente, ou então utilizam a maquinaria molecular da célula hospedeira para expressar seus genes. Entretanto, em casos específicos, a virulência se tornou algo incontrollável, onde a terapia acabou se tornando a causa da morte dos pacientes submetidos a tal intervenção. Por outro lado, os vetores plasmidiais não têm limite de tamanho de gene a ser inserido e induz mínima resposta imune, o que resulta em expressão transgênica sustentada. A desvantagem é a baixa taxa de transferência do gene codificador do fator angiogênico [43].

O vetor ideal seria aquele que combinaria baixa imunogenicidade e um perfil de segurança satisfatório, com alta eficiência de transfecção e expressão do transgene para períodos de tempo específicos [4].

Transferência gênica para o miocárdio tem sido utilizada como estratégia alternativa para se obter uma expressão local sustentada das proteínas angiogênicas [44]. Existe uma variedade de métodos diferentes para substituir ou reparar os genes focados na terapia gênica. Um gene normal pode ser inserido num local não específico no genoma para substituir um gene problemático, sendo essa a abordagem mais comum, ainda, um gene anômalo pode ser trocado por um gene normal por meio da recombinação, um gene anômalo pode ser reparado por meio de mutação reversa seletiva, que devolve ao gene suas funções normais e também, a regulação de um gene pode ser alterada, tal regulação correspondendo ao grau em que um gene está ativo ou inativo [6-8].

Ensaios Clínicos Controlados de Terapia Gênica

Apesar de mais de uma década da realização do primeiro ensaio clínico sobre terapia gênica [45], os reais benefícios clínicos dessa terapêutica necessitam ainda ser melhor elucidados. Pesquisas têm procurado identificar outros parâmetros e desfechos que podem fornecer evidências objetivas da bioatividade e melhora clínica [4]. Dessa forma, observam-se entre os estudos, a utilização de diferentes genes, doses, tipos de vetores e vias de administração. Na Tabela 1, estão reunidos os ensaios clínicos envolvendo terapia gênica com VEGF que realizaram intervenções via minitoracotomia esquerda; na Tabela 2, estudos que utilizaram a via percutânea; e, na Tabela, 3 estão reunidos os ensaios clínicos de terapia gênica com FGF.

Tabela 1. Ensaios Clínicos envolvendo Terapia Gênica com VEGF via intramiocárdica por mini-toracotomia esquerda.

Autor e Ano	Vetor	Pacientes	Desfechos	Resultados
Losordo et al. [45], 1998	VEGF ₁₆₅	5 pacientes; DAC, angina refratária, áreas do miocárdio subperfundidas, mas viáveis, CCS (3/4)	Perfusão miocárdica e sintomas da doença em 60 dias	Redução na angina entre 10 e 30 dias após terapia; diminuição do consumo de nitrato em 60 dias ($P<0,05$); não houve redução da isquemia miocárdica em 60 dias
Symes et al. [48], 1999	VEGF ₁₆₅	125 μ g/n=10, 250 μ g/n=10; DAC, angina refratária, isquemia reversível, CCS (3/4)	Segurança da terapia e perfusão miocárdica em 180 dias	Segurança e viabilidade da terapia; melhora da perfusão miocárdica em 60 dias, SSS=19.4 \pm 3.7 versus 15.9 \pm 3.4, $P=0,025$)
Vale et al. [49], 2000	VEGF ₁₆₅	13 pacientes; DAC, angina refratária, áreas do miocárdio subperfundidas, mas viáveis, CCS (3/4)	Perfusão miocárdica e desempenho de ventrículo esquerdo	Redução da isquemia antes (15,26 \pm 0,98%) versus após (9,94 \pm 1,53%, $P=0,004$) terapia; melhora da função miocárdica
Reilly et al. [50], 2005	VEGF ₂	30 pacientes; DAC, CCS (3/4), sem opções de revascularização	Segurança e eventos adversos da terapia em 1 ano	Ao final de 1 ano, 3 (11,5%) pacientes apresentavam CCS 3 e 23 (88,5%) CCS 1 ou 2; houve 4 mortes (13,8%); 5 IAM (17,2%); 7 CRM (24,1%); 15 internações e 2 novos diagnósticos de câncer
REVASC Stewart et al. [51], 2006	VEGF ₁₂₁ adenoviral	Grupo ativo/placebo (32/35); DAC não passíveis de revascularização, angina refratária, CCS (2/4)	Tempo no teste ergométrico e depressão do segmento S-T em 1 mm de diâmetro em 26 semanas	Tempo no teste ergométrico a 1 mm de depressão do segmento S-T foi significativamente maior no grupo VEGF ₁₂₁ -ad ($P=0,026$); CCS melhorou no grupo VEGF ₁₂₁ -ad ($P<0,001$)
Ruel et al. [52], 2008	VEGF ₁₆₅ plasmidial e suplementação oral de L-arginina. Associado a CRM.	VEGF/L-arg (5), Placebo/L-arg (6), VEGF/placebo (7), Placebo/placebo (1); DAC com comprometimento em artéria descendente anterior	Perfusão miocárdica, contratilidade de ventrículo esquerdo e CCS em 3 meses	Grupo VEGF/L-arg apresentou melhora na perfusão e na contratilidade da parede miocárdica anterior ($P=0,02$)
Kalil et al. [53], 2010	VEGF ₁₆₅ plasmidial	13 pacientes; cardiopatia isquêmica, fração de ejeção VE superior a 25%, presença de sintomas de angina e/ou IC, hipoperfusão miocárdica	Perfusão miocárdica, tempo em teste ergométrico, qualidade de vida, classe de IC segundo NYHA e CCS em 3 meses	Melhora da perfusão miocárdica, SSS (18,38 \pm 7,51 versus 15,31 \pm 7,29, $P=0,003$) e SRS (11,92 \pm 7,49 versus 8,53 \pm 6,68, $P=0,002$); tendência a melhora do tempo em teste ergométrico (7,66 \pm 4,47 versus 10,29 \pm 4,36, $P=0,08$); melhora na qualidade de vida, classe de IC segundo NYHA e CCS.

VEGF: Fator de Crescimento do Endotélio Vascular; DAC: Doença arterial coronariana; CCS: Classe de Angina; Ad: adenoviral; P: Placebo; IAM: Infarto Agudo do Miocárdio; CRM: Cirurgia de Revascularização Miocárdica; G-CSF: Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos; L-arg: L-arginina; VE: Ventrículo Esquerdo; IC: Insuficiência Cardíaca; NYHA: New York Heart Association; SSS: Escore Somado de Estresse em cintilografia; SRS: Escore Somado de Repouso em cintilografia

Tabela 2. Ensaios Clínicos envolvendo Terapia Gênica com VEGF via percutânea.

Autor e Ano	Vetor	Pacientes	Desfechos	Resultados
VEGF Vale et al. [54], 2001	Administração intramiocárdica de VEGF ₂ guiada por mapeamento eletromecânico (NOGA)	6 pacientes; angina refratária à terapia medicamentosa otimizada, DAC, isquemia reversível, CCS (3/4)	Perfusão miocárdica, tempo no teste ergométrico, episódios de angina em 360 dias	Redução dos episódios de angina; melhora do desempenho em teste ergométrico de 7 a 127 segundos (72±25 s); melhora da perfusão miocárdica em repouso e estresse
Losordo et al. [25], 2002	Administração intramiocárdica via mapeamento eletromecânico de VEGF ₂ plasmidial	Grupo ativo/placebo (12/7); DAC não passíveis de revascularização, angina refratária, CCS (3/4)	Mudança da CCS e tolerância ao exercício em 12 semanas	Melhora da CCS - grupo VEGF ₂ versus placebo (-1,3 versus -0,1, P=0,04); tolerância ao exercício (91,8 versus 3,9 segundos)
KAT Hedman et al. [28], 2003	Administração intracoronária de VEGF ₁₆₅ adenoviral e plasmidial após intervenção coronária percutânea	VEGF-ad (37), VEGF-P (28), Placebo (38); DAC, CCS (2/3), intervenção coronária percutânea	% de estenose do diâmetro luminal mínimo pela angiografia coronária em 6 meses	Taxa de reestenose clínica: 6%; diâmetro mínimo e o percentual de estenose não diferiram entre os grupos; perfusão miocárdica mostrou uma melhora significativa no grupo VEGF-ad
VIVA Trial Henry et al. [46], 2003	Infusão intracoronária, seguida de infusão intravenosa de VEGF	VEGF - alta dose (59), VEGF - baixa dose (56), placebo (63); angina refratária, miocárdio subperfundido, mas viável	Perfusão miocárdica, tempo no teste ergométrico, CCS e qualidade de vida em 120 dias	Não houve melhora significativa da perfusão miocárdica; aumento do desempenho em teste ergométrico (alta dose versus placebo: 48 versus 23 segundos, P=0,15); redução dos episódios de angina e melhora da qualidade de vida
Euroinject One Kastrup et al. [55], 2005	Administração intramiocárdica percutânea via mapeamento eletromecânico de VEGF ₁₆₅ plasmidial	Grupo ativo/placebo (40/40); doença arterial coronariana, não passíveis de revascularização, angina refratária, CCS (3/4)	Perfusão miocárdica, mapeamento do movimento da parede por NOGA, ventriculografia esquerda e CCS em 3 meses	Perfusão miocárdica não diferiu entre o grupo VEGF 165 e placebo (38 ± 3%; 44 ± 2%); movimento da parede por NOGA (P=0,04) e ventriculografia esquerda (P=0,03) melhorou em relação ao placebo; melhora da CCS sem diferença entre os grupos
Ripa et al. [56], 2006	Administração intramiocárdica percutânea de VEGF ₁₆₅ usando mapeamento eletromecânico e injeção subcutânea de G-CSF	VEGF ₁₆₅ +G-CSF (16), VEGF ₁₆₅ (16), Placebo (16); doença arterial coronariana, não passíveis de revascularização, angina refratária, CCS (3/4)	Mudança dos defeitos de perfusão, avaliado por SPECT em 3 meses	Não houve melhora da perfusão miocárdica em ambos os grupos tratados e sintomas clínicos não foram alterados
NORTHERN Trial Stewart et al. [57], 2009	Administração de VEGF ₁₆₅ plasmidial por via endocárdica através do cateter eletroanatômico NOGA	Estudo multicêntrico: grupo ativo/placebo (48/45); doença arterial coronariana avançada, CCS (3/4)	Perfusão miocárdica, tempo em teste ergométrico e CCS em 6 meses	Não houve melhora da perfusão miocárdica; significativa redução da área isquêmica em ambos os grupos; aumento do tempo em teste ergométrico e melhora da CCS

VEGF: Fator de Crescimento do Endotélio Vascular; CCS: Classe de Angina; Ad: adenoviral; P: Placebo; IAM: Infarto Agudo do Miocárdio; G-CSF: Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos; VE: Ventrículo Esquerdo; IC: Insuficiência Cardíaca; NYHA: New York Heart Association; SSS: Escore Somado de Estresse; SRS: Escore Somado de Repouso

Tabela 3. Ensaios Clínicos envolvendo Terapia Gênica com FGF.

Autor e Ano	Vetor	Pacientes	Desfechos	Resultados
FGFA GENT Grines et al. [58], 2002	Administração de Ad5-FGF4 via intracoronária	Grupo ativo/placebo (60/19); Doença arterial coronariana, CCS (2/3)	Segurança e tempo do teste ergométrico em 12 semanas	Administração única de Ad5-FGF4 mostrou-se segura e bem tolerada; grupo Ad5-FGF4 apresentou melhora no tempo do teste ergométrico em análise de subgrupo (1.6 versus 0.6 minutos, $P=0,01$, $n=50$)
AGENT-2 Grines et al. [59], 2003	Administração de Ad5-FGF4 via intracoronária	Grupo ativo/placebo (35/17); Doença arterial coronariana, não passíveis de revascularização, angina refratária, CCS (2/4)	Mudança dos defeitos de perfusão, avaliado por SPECT adenosina em 8 semanas; acompanhamento de 12 meses	Ad5-FGF4 resultou em uma significativa redução da isquemia (4,2% absoluta, 21% relativa; $P < 0,001$), enquanto placebo não apresentou melhora ($P = 0,32$)
AGENT-3 AGENT-4 Henry et al. [60], 2007	Administração de Ad5-FGF4 via intracoronária	Alta dose (175), Baixa dose (180), Placebo (177); doença arterial coronariana, angina refratária, CCS (2/4); AGENT 3: sem necessidade imediata de revascularização AGENT 4: não passíveis de revascularização	Mudança no tempo do teste ergométrico em 12 semanas; acompanhamento de 12 meses	Significativo efeito benéfico do gênero, as mulheres apresentaram melhora no tempo do teste ergométrico e melhora quanto à CCS

VEGF: Fator de Crescimento do Endotélio Vascular; CCS: Classe de Angina; Ad: adenoviral; P: Placebo; IAM: Infarto Agudo do Miocárdio; G-CSF: Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos; VE: Ventrículo Esquerdo; IC: Insuficiência Cardíaca; NYHA: New York Heart Association; SSS: Escore Somado de Estresse; SRS: Escore Somado de Repouso

Evidencia-se a potencial aplicabilidade clínica de fatores de crescimento em humanos, visto que estudos experimentais mostram resultados favoráveis e estudos clínicos iniciais em humanos não relatam efeitos adversos relacionados. Ensaios atuais relatam que o uso de altas doses de VEGF, quando comparado com baixas doses e com placebo, melhora a perfusão miocárdica em pacientes com angina estável grave e fornece evidências de um efeito positivo dose-dependente [46,47]. Diante das evidências, o VEGF tem se mostrado um potencial fator angiogênico, onde benefícios em médio e longo prazo de acompanhamento já foram ou estão sendo avaliados, entre eles, a melhora da qualidade de vida, classe funcional de insuficiência cardíaca, classe de angina, capacidade funcional e redução da isquemia miocárdica [25,28,45,46,48-57].

O FGF [58-60] e o HGF [61] também vêm demonstrando seus potenciais benefícios na indução da angiogênese miocárdica e, para continuar a desenvolver esta abordagem terapêutica promissora, devemos avaliar criticamente os resultados experimentais e os protocolos, para identificar fatores que podem ter prejudicado a eficiência da terapia ou dados confundidores de interpretação [4].

Quanto à via de administração, a via intramiocárdica demonstrou ser mais efetiva e, por isso, têm sido a mais

utilizada nos estudos envolvendo terapia gênica em cardiologia [38]. Estudos anteriores sugerem que a administração através de injeção intramuscular oferece a possibilidade de uma oferta mais eficiente em áreas focais de músculo isquêmico [4].

Existem questionamentos em relação à segurança da transferência de fatores angiogênicos, e também em relação ao tempo de expressão [4,62], onde se sabe que os plasmídeos carreadores de proteínas de fatores angiogênicos, por terem expressão mais curta e não se incorporarem ao DNA da célula à qual vão se ligar, têm menor risco deste efeito adverso. Já os vetores virais requerem cuidados de biossegurança, medidas desnecessárias com vetores não-virais. Estudos apontam eventos temporários relacionados com utilização de adenovírus, tais como febre, ou elevação sérica de proteína C reativa, das enzimas hepáticas e da titulação de anticorpos [22]. Hao *et al.* [63] publicaram, em 2007, um estudo experimental sobre angiogênese miocárdica por VEGF₁₆₅, comparando vetores adenovirais com plasmidiais. Estes autores demonstraram benefícios equivalentes em termos de função ventricular ($P < 0,05$) para plasmídeos e adenovírus após 4 semanas, entretanto, neste trabalho, a técnica TUNEL, que detecta quebras do DNA que ocorrem durante

o processo de apoptose, demonstrou aumento da frequência de apoptose de cardiomiócitos no grupo adenovírus ($P < 0,02$).

Quase todos os ensaios clínicos de terapia gênica têm como população de estudo pacientes em fase terminal da doença isquêmica, uma vez que o possível maior risco em relação ao benefício associado aos novos tratamentos são mais aceitáveis, podendo ser empregada como uma terapêutica coadjuvante às convencionais. Entretanto, em situações clínicas muito avançadas, a terapia pode não conduzir a uma melhoria de grande intensidade e mensurável pelos métodos disponíveis, mesmo quando o tratamento demonstra algum benefício clínico [4,64].

Experiência Local

No Instituto de Cardiologia do RS/FUC e na Disciplina de Cardiologia da UFCSPA, em colaboração com o Laboratório de Imunogenética da UFRGS, desenvolvemos previamente estudos experimentais [65-67] e, recentemente, conduzimos o primeiro ensaio clínico em terapia gênica do Brasil, utilizando VEGF₁₆₅ para angina refratária [53].

Nos estudos experimentais, utilizamos modelo canino de infarto do miocárdio nas fases aguda e crônica, na tentativa de avaliar os processos de terapia gênica. Recentemente, desenvolvemos um ensaio clínico controlado, fase I/II (*Clinical Trial* NCT00744315) [53] com o objetivo de avaliar clinicamente os efeitos da terapia gênica com VEGF₁₆₅, em pacientes com doença arterial coronariana (DAC) avançada, não passíveis de revascularização percutânea ou cirúrgica. Os treze pacientes receberam tratamento medicamentoso otimizado por, no mínimo, seis meses e após foram submetidos à administração de injeções intramiocárdicas de 2.000 µg de VEGF₁₆₅ plasmidial. Os pacientes foram avaliados por cintilografia miocárdica, teste ergométrico, questionário de qualidade de vida (Minnesota) e determinação das classes de insuficiência cardíaca (NYHA) e angina (CCS). Em resultados parciais de 3 meses de evolução, concluiu-se que a terapia demonstrou ser segura e viável, tendendo a melhorar na gravidade da angina e redução da intensidade da isquemia miocárdica.

CONCLUSÕES

Mais de 1.000 pacientes foram incluídos em ensaios clínicos controlados de terapia gênica, abrangendo mais de uma década e, até agora, com exceção de casos específicos, nenhum sinal de segurança adversa foi detectado, indicando que a terapia é segura, viável e potencialmente eficaz, embora não tenham produzido evidências definitivamente conclusivas de seu benefício. Relatos de retinopatia, câncer, ou outras doenças que poderiam ser impulsionadas pelo crescimento vascular

foram percebidos como igualmente distribuídos em grupos tratado e placebo, em ensaios clínicos randomizados.

Conclusões mais definitivas sobre riscos e complicações exigirão maiores tempo de acompanhamento e número de pacientes submetidos à terapia [4]. Diante disso, terapia gênica desponta como uma potencialmente benéfica alternativa a pacientes cardiopatas isquêmicos, quando esgotadas as terapêuticas convencionais. A definição de sucesso angiogênico, para melhor avaliação dos resultados precisa ser repensada e definida por métodos de maior sensibilidade e especificidade.

Tradicionalmente, as terapêuticas para o tratamento de doenças cardiovasculares devem demonstrar melhora na morbidade e mortalidade. No entanto, para essa população de pacientes, o fato da melhora da qualidade de vida, diminuição e ou abolição de episódios de angina e diminuição de eventos de internação hospitalar podem ser considerados os principais ganhos diante dessa nova terapêutica. Sabendo-se que as manifestações da doença cardiovascular são progressivas, o objetivo principal é proporcionar aos pacientes o decréscimo significativo dos sintomas e o retardo de tal progressão.

As direções futuras da terapia gênica apontam prováveis combinações de fatores angiogênicos, ou fatores individuais (HIF 1- α) que ativam diversas vias de neovascularização. As combinações de terapia celular e de fatores angiogênicos, bem como o uso de biomateriais para melhorar o microambiente, são outras estratégias promissoras para o reparo isquêmico tecidual [4].

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a participação nos projetos do grupo da Terapia Gênica do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul/Fundação Universitária de Cardiologia, aos seguintes colegas: Leonardo Karam Teixeira, Felipe Borsu de Salles, Ana Paula Furlani, Eduardo Mastalir, Paulo Lavanière Moreno, Sang Won Han, Eduardo Ludwig, Gabriel Grossman, João Ricardo Michielin Sant'Anna, Guaracy Fernandes Teixeira Filho, Melissa Medeiros Markoski, Andrés Delgado Cañedo, Melissa Camassola, Iran Castro, Maria Cláudia Irigoyen, Luiza Macedo Braga e Rogério Sarmiento Leite.

REFERÊNCIAS

1. WHO, World Health Organisation, Cardiovascular Diseases. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/prevention_control/en, 2006.

2. Mannheimer C, Camici P, Chester MR, Collins A, DeJongste M, Eliasson T, et al. The problem of chronic refractory angina: report from the ESC Joint Study Group on the Treatment of Refractory Angina. *Eur Heart J*. 2002;23(5):355-70.
3. Lloyd-Jones DM, Hong Y, Labarthe D, Mozaffarian D, Appel LJ, Van Horn L, et al. American Heart Association Strategic Planning Task Force and Statistics Committee. Defining and setting national goals for cardiovascular health promotion and disease reduction: the American Heart Association's strategic Impact Goal through 2020 and beyond. *Circulation*. 2010;121(4):586-613.
4. Gupta R, Tongers J, Losordo W. Human studies of angiogenic gene therapy. *Circ Res*. 2009;105(8):724-36.
5. Kim MC, Kini A, Sharma SK. Refractory angina pectoris: mechanism and therapeutic options. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(6):923-34.
6. Huard J, Li Y, Peng H, Fu FH. Gene therapy and tissue engineering for sports medicine. *J Gen Med*. 2003;5(2):93-108.
7. Karthikeyan BV, Pradeep AR. Gene therapy in periodontics: a review and future implications. *J Contemp Dent Pract*. 2006;7(3):83-91.
8. Li SD, Huang L. Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery. *Gene Ther*. 2006;13(18):1313-9.
9. Svensson EC, Marshall DJ, Woodard K, Lin H, Jiang F, Chu L. Efficient and stable transduction of cardiomyocytes after intramyocardial injection or intracoronary perfusion with recombinant adeno-associated virus vectors. *Circulation*. 1999;99(2):201-5.
10. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*. 2003;9(6):702-12.
11. Lotufo P. Mortalidade precoce por doenças do coração no Brasil. Comparação com outros países. *Arq Bras Cardiol*. 1998;70(5):321-5.
12. Kastrup J. Therapeutic angiogenesis in ischemic heart disease: gene or recombinant vascular growth factor protein therapy? *Curr Gene Ther*. 2003;3(3):197-206.
13. Isner JM. Myocardial gene therapy. *Nature*. 2002;415(6868):234-9.
14. Rakusan K. Coronary angiogenesis. From morphometry to molecular biology and back. *Ann NY Acad Sci*. 1995;752:257-66.
15. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, et al. 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(2):662-70.
16. Kones R. Recent advances in the management of chronic stable angina I: approach to the patient, diagnosis, pathophysiology, risk stratification, and gender disparities. *Vasc Health Risk Manag*. 2010;6:635-56.
17. Armstrong EJ, Bischoff J. Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circ Res*. 2004;95(5):459-70.
18. Habeck M. Welding more power over angiogenesis. *Mol Med Today*. 2000;6(4):138-9.
19. Lewis BS, Flugelman MY, Weisz A, Keren-Tal I, Schaper W. Angiogenesis by gene therapy: a new horizon for myocardial revascularization? *Cardiovasc Res*. 1997;35(3):490-7.
20. Ripa RS, Wang Y, Jørgensen E, Johnsen HE, Hesse B, Kastrup J. Intramyocardial injection of vascular endothelial growth factor-A165 plasmid followed by granulocyte-colony stimulating factor to induce angiogenesis in patients with severe chronic ischaemic heart disease. *Eur Heart J*. 2006;27(15):1785-92.
21. Kastrup J, Jørgensen E, Rück A, Tägil K, Glogar D, Ruzyllo W, et al; Euroinject One Group. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(7):982-8.
22. Hedman M, Hartikainen J, Syväne M, Stjernvall J, Hedman A, Kivellä 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). *Circulation*. 2003;107(21):2677-83.
23. Eppler SM, Combs DL, Henry TD, Lopez JJ, Ellis SG, Yi JH, et al. A target-mediated model to describe the pharmacokinetics and hemodynamic effects of recombinant human vascular endothelial growth factor in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 2002;72(1):20-32.
24. Simons M, Annex BH, Laham RJ, Kleiman N, Henry T, Dauerman H, et al. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation*. 2002;105(7):788-93.
25. Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, Milliken CE, Fortuin FD, Cummings N, et al. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*. 2002;105(17):2012-8.
26. Sylvé C, Sarkar N, Rück A, Drvota V, Hassan SY, Lind B, et

- al. Myocardial Doppler tissue velocity improves following myocardial gene therapy with VEGF-A165 plasmid in patients with inoperable angina pectoris. *Coron Artery Dis.* 2001;12(3):239-43.
27. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Sanborn TA, Parikh M, Bergman GW, et al. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation.* 1999;100(5):468-74.
28. Hedman M, Hartikainen J, Syväne M, Stjernvall J, Hedman A, Kivelä 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). *Circulation.* 2003;107(21):2677-83.
29. Kalil R. Terapia gênica aplicada à cirurgia cardiovascular. *Rev da SOCERGS.* 2001;3:61-6.
30. Kalil R, Sant'Anna R. Terapia gênica aplicada às doenças cardiovasculares. *Rev SOCERGS.* 2004;3:213-9.
31. Heiss C, Amabile N, Lee AC, Real WM, Schick SF, Lao D, et al. Brief secondhand smoke exposure depresses endothelial progenitor cells activity and endothelial function: sustained vascular injury and blunted nitric oxide production. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51(18):1760-71.
32. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(7):1185-9.
33. Hambrecht R, Wolf A, Gielen S, Linke A, Hofer J, Erbs S, et al. Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2000;342(7):454-60.
34. Kawasaki M, Nagamine H, Ikeda M, Sakakibara N, Takemura H, Fujii S, et al. Therapeutic angiogenesis with intramyocardial administration of basic fibroblast growth factor. *Ann Thorac Surg.* 2000;69(4):1155-61.
35. Azuma J, Taniyama Y, Takeya Y, Iekushi K, Aoki M, Dosaka N, et al. Angiogenic and antifibrotic actions of hepatocyte growth factor improve cardiac dysfunction in porcine ischemic cardiomyopathy. *Gene Ther.* 2006;13(16):1206-13.
36. Morishita R, Aoki M, Hashiya N, Yamasaki K, Kurinami H, Shimizu S, et al. Therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor (HGF). *Curr Gene Ther.* 2004;4(2):199-206.
37. Yang ZJ, Xu SL, Chen B, Zhang SL, Zhang YL, Wei W, et al. Hepatocyte growth factor plays a critical role in the regulation of cytokine production and induction of endothelial progenitor cell mobilization: a pilot gene therapy study in patients with coronary heart disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009;36(8):790-6.
38. Bae J, Cho M. Gene therapy for heart failure. *Korean Circ J.* 2005;35(5):345-52.
39. Giordano FJ, Ping P, McKirnan MD, Nozaki S, DeMaria AN, Dillmann WH, et al. Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. *Nat Med.* 1996;2(5):534-9.
40. Wright MJ, Wightman LM, Lilley C, de Alwis M, Hart SL, Miller A, et al. In vivo myocardial gene transfer: optimization, evaluation and direct comparison of gene transfer vectors. *Basic Res Cardiol.* 2001;96(3):227-36.
41. Wilson DR. Viral-mediated gene transfer for cancer treatment. *Curr Pharm Biotechnol.* 2002;3(2):151-64.
42. Rubanyi GM. The future of human gene therapy. *Molecular Aspects Med.* 2001;22(3):113-42.
43. Dulak J, Zagorska A, Wegiel B, Loboda A, Jozkowicz A. New strategies for cardiovascular gene therapy: regulatable pre-emptive expression of pro-angiogenic and antioxidant genes. *Cell Biochem Biophys.* 2006;44(1):31-42.
44. Mack CA, Patel SR, Schwarz EA, Zanzonico P, Hahn RT, Ilterci A, et al. Biologic bypass with the use of adenovirus-mediated gene transfer of the complementary deoxyribonucleic acid for vascular endothelial growth factor 121 improves myocardial perfusion and function in the ischemic porcine heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998;115(1):168-76.
45. 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.
46. Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, et al; VIVA Investigators. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation.* 2003;107(10):1359-65.
47. Hendel RC, Henry TD, Rocha-Singh K, Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ, et al. Effect of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor on myocardial perfusion: evidence for a dose-dependent effect. *Circulation.* 2000;101(2):118-21.
48. Symes JF, Losordo DW, Vale PR, Lathi KG, Esakof DD, Mayskiy M, et al. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann Thorac Surg.* 1999;68(3):830-6.
49. 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.
50. Reilly JP, Grise MA, Fortuin FD, Vale PR, Schaer GL, Lopez J, et al. Long-term (2-year) clinical events following transthoracic intramyocardial gene transfer of VEGF-2 in no-option patients. *J Interv Cardiol*. 2005;18(1):27-31.
51. Stewart DJ, Hilton JD, Arnold JM, Gregoire J, Rivard A, Archer SL, et al. Angiogenic gene therapy in patients with nonrevascularizable ischemic heart disease: a phase 2 randomized, controlled trial of AdVEGF(121) (AdVEGF121) versus maximum medical treatment. *Gene Ther*. 2006;13(21):1503-11.
52. 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.
53. Kalil RAK, Salles FB, Giusti II, Rodrigues CG, Han SW, Sant'anna RT, et al. Terapia gênica com VEGF para angiogênese na angina refratária: ensaio clínico fase I/II. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2010;25(3):311-21.
54. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, McDonald MC, Gravelin LM, Curry CM, et al. Randomized, single-blind, placebo-controlled pilot study of catheter-based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*. 2001;103(17):2138-43.
55. Kastrup J, Jørgensen E, Rück A, Tägil K, Glogar D, Ruzyllo W, et al; Euroinject One Group. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(7):982-8.
56. Ripa RS, Wang Y, Jørgensen E, Johnsen HE, Hesse B, Kastrup J. Intramyocardial injection of vascular endothelial growth factor-A165 plasmid followed by granulocyte-colony stimulating factor to induce angiogenesis in patients with severe chronic ischaemic heart disease. *Eur Heart J*. 2006;27(15):1785-92.
57. 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(6):1109-15.
58. Grines CL, Watkins MW, Helmer G, Penny W, Brinker J, Marmur JD, et al. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation*. 2002;105(11):1291-7.
59. Grines CL, Watkins MW, Mahmarian JJ, Iskandrian AE, Rade JJ, Marrott P, et al; Angiogene GENE Therapy (AGENT-2) Study Group. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of Ad5FGF-4 gene therapy and its effect on myocardial perfusion in patients with stable angina. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(8):1339-47.
60. Henry TD, Grines CL, Watkins MW, Dib N, Barbeau G, Moreadith R, et al. Effects of Ad5FGF-4 in patients with angina: an analysis of pooled data from the AGENT-3 and AGENT-4 trials. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(11):1038-46.
61. Powell RJ, Simons M, Mendelsohn FO, Daniel G, Henry TD, Koga M, et al. Results of a double-blind, placebo-controlled study to assess the safety of intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid to improve limb perfusion in patients with critical limb ischemia. *Circulation*. 2008;118(1):58-65.
62. Hamawy AH, Lee LY, Crystal RG, Rosengart TK. Cardiac angiogenesis and gene therapy: a strategy for myocardial revascularization. *Curr Opin Cardiol*. 1999;14(6):515-22.
63. Hao X, Månsson-Broberg A, Grinnemo KH, Siddiqui AJ, Dellgren G, Brodin LA, et al. Myocardial angiogenesis after plasmid or adenoviral VEGF-A(165) gene transfer in rat myocardial infarction model. *Cardiovasc Res*. 2007;73(3):481-7.
64. Rana JS, Mannam A, Donnell-Fink L, Gervino EV, Sellke FW, Laham RJ. Longevity of the placebo effect in the therapeutic angiogenesis and laser myocardial revascularization trials in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol*. 2005;95(12):1456-9.
65. Kalil RA, Teixeira LA, Mastalir ET, Moreno P, Fricke CH, Nardi NB. Experimental model of gene transfection in healthy canine myocardium: perspectives of gene therapy for ischemic heart disease. *Arq Bras Cardiol*. 2002;79(3):223-32.
66. Sant'Anna RT, Kalil RAK, Moreno P, Anflor LCJ, Correa DLC, Ludwig R, et al. Gene therapy with VEGF 165 for angiogenesis in experimental acute myocardial infarction. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2003;18(2):142-7.
67. Furlani A, Kalil RA, Castro I, Cañedo-Delgado A, Barra M, Prates PR, et al. Effects of therapeutic angiogenesis with plasmid VEGF165 on ventricular function in a canine model of chronic myocardial infarction. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2009;24(2):143-9.
68. Murasawa S, Asahara T. Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:36-42.