

TERAPIA GÊNICA APLICADA ÀS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Renato A. K. Kalil *
Roberto Tofani Sant'Anna **

* Cirurgião do Serviço de Cirurgia Cardiovascular do IC/FUC. Professor-Adjunto Responsável pela Disciplina de Cardiologia da FFFCMPA. Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Universitária de Cardiologia (FUC-RS). Pesquisador, 1B, do CNPq

** Bolsista de Iniciação Científica do IC/FUC-CNPq

Serviço de Cirurgia do
INSTITUTO DE CARDIOLOGIA DO RIO GRANDE DO SUL
FUNDAÇÃO UNIVERSITÁRIA DE CARDIOLOGIA

Endereço para Correspondência:

Instituto de Cardiologia do RS – Unidade de Pesquisa – Dr. Renato A.K. Kalil
Av. Princesa Isabel, 370 Santana Porto Alegre – RS 90620-001
Fone/fax: 51-3230.3600 R.3891 / 3777 e-mail: pesquisa@cardnet.tche.br

Introdução

Apesar dos avanços significativos na terapêutica, a doença arterial coronariana (DAC) permanece como principal causa de morte prematura no mundo ocidental¹. A prevalência da doença determina gastos financeiros imensos ao sistema de saúde^{1, 2}, portanto, novas formas de tratamento devem ser buscadas. A disponibilidade de vetores com tropismo pelo miocárdio, capazes de uma expressão protéica longa e estável³, e o isolamento de células progenitoras com potencial angiogênico e regenerativo⁴ oferece possibilidades de desenvolvimento de terapia baseada em proteção e regeneração do miocárdio isquêmico e insuficiente.

Neste artigo, discutimos os avanços clínicos e pré-clínicos em terapia gênica, com ênfase em estratégias terapêuticas que buscam a proteção miocárdica da isquemia e injúria de reperfusão e a neovascularização e regeneração de miocárdio isquêmico.

Terapia Gênica

A terapia gênica em doenças cardiovasculares não visa a substituir um gene anormal, mas supra-regular a expressão de uma proteína útil aumentando o conteúdo de DNA. Sua efetividade depende do gene, dos vetores e da forma de administração utilizados.

A escolha de vetores está relacionada à segurança, ao tempo de expressão e à forma de administração em questão. A maneira mais simples é utilizar plasmídeo desnudo contendo o DNA (sem vetor), contudo ele necessita de altas doses de DNA, tem uma expressão apenas transitória e precisa ser entregue localmente, uma vez que é degradado pelas nucleases circulantes quando atinge a circulação. A utilização de vetores aumenta a efetividade de transfecção. Vírus infectam naturalmente as células e introduzem seu DNA. Os vírus utilizados para terapia gênica são modificados de forma a não poderem se replicar nas células hospedeiras nem expressarem proteínas necessárias para se encapsularem, sendo estas seqüências do genoma viral substituídas pelo gene de interesse a ser expressado na célula-alvo. Contudo, eles deflagram a resposta imune do hospedeiro, o que diminui a efetividade de aplicações futuras com o mesmo vetor. A utilização de retrovírus em células hematopoiéticas esteve associada à mutagenese de inserção e ao desenvolvimento de leucemia, sendo seu uso proibido nos Estados Unidos. Pelo perfil seguro e o tropismo para o miocárdio, os vetores

com adenovírus são os mais comumente utilizados em doenças cardiovasculares.

Vetores não-virais têm sido criados para evitar as questões de segurança relacionadas aos vírus. Transferência gênica não-viral pode ser realizada por micro-injeção, com dextran, por precipitação de fosfato de cálcio, eletroporação, lipossomas ou por partículas recobertas de DNA. A forma mais usada é por lipossomas. Lipossomas catiônicos condensam e retêm DNA por interação eletrostática, permanecendo estáveis em solução aquosa por meses. Os lipossomas carregados positivamente aderem à superfície celular negativa, para liberar o DNA no citoplasma das células-alvo. Postula-se que o DNA plasmidial é, então, incorporado ao núcleo como um episossoma. Em favor desta técnica está o perfil relativamente seguro dos lipossomas, a falta de restrições quanto ao tamanho do DNA plasmidial ou à célula-alvo e a relativa facilidade de preparação⁵.

Genes já foram administrados por diversas rotas: intravenosa, pela artéria pulmonar, pelo átrio esquerdo, intracoronariana (seletiva ou não), transepicárdica intramiocárdica, transendocárdica intramiocárdica por cateter eletromecânico e intrapericárdica. Como a administração local é provavelmente a ideal⁶, estudos clínicos utilizam preferencialmente a via intracoronariana (adenovírus) ou intramiocárdica (DNA desnudo ou adenovírus). A via transepicárdica traz o risco intrínseco da cirurgia, o que não deve ser considerado se a administração for feita durante uma cirurgia de revascularização do miocárdio

- 1 American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics: 2004 Update. Dallas, Tex: American Heart Association; 2003.
- 2 Golberg RJ, Kostam MA. Assessing the population burden from heart failure: need for sentinel population based-surveillance systems. Arch Int Med. 1999;159:
- 3 Svensson EC, Marshall DJ, Woodard K, et al. Efficient and stable transduction of cardiomyocytes after intramyocardial injection or intracoronary perfusion with recombinant adeno-associated viral vectors Circulation. 1999;99:201-205.
- 4 Raffi S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ revascularization and regeneration. Nat Med. 2003;9:702-712.
- 5 Duckers HJ, Nabel EG. Prospects for genetic therapy of cardiovascular disease. Med Clin North Am 2000;84(1):199-

- 6 Laham RJ, Rezaee M, Garcia L, et al. Tissue and myocardial distribution of intracoronary, intravenous, intraepicardial and intramyocardial 125I-labeled basic fibroblast growth factor favor intramyocardial delivery [Abstract]. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:10A.

Terapia gênica para proteção do miocárdio em risco

O desenvolvimento de terapias gênicas para o infarto agudo do miocárdio não é possível com os vetores atualmente disponíveis, uma vez que o tempo necessário para transcrição e translação do gene terapêutico excede a janela terapêutica para uma intervenção bem sucedida 1. Alternativamente, pode ser buscada uma proteção miocárdica prolongada da injúria induzida pela isquemia. Assim, a terapia gênica com genes de citoproteção protegeria o coração da injúria de isquemia/reperfusão futura, minimizando a necessidade de intervenção em pacientes de alto risco.

Terapia gênica para proteção miocárdica contra o estresse oxidativo e a inflamação

Aumento da expressão de genes anti-oxidantes pode potencializar a reserva anti-oxidante endógena e reduzir o dano relacionado ao estresse oxidativo no miocárdio isquêmico.

Melo et al já avaliaram a utilização de um gene de uma enzima anti-oxidante em um modelo de isquemia/injúria de reperfusão em ratos 2. Foi utilizado um vírus adeno-associado para aplicação intramiocárdica do gene heme-oxigenase-1 semanas antes da aplicação do IAM, e, quando este foi induzido, esteve associado com decréscimo de 80 % da área de infarto com menor estresse oxidativo, inflamação e fibrose intersticial em relação ao grupo controle, sendo acompanhado por recuperação pós-infarto e normalização das dimensões ventriculares. Produção eficaz da injúria de isquemia/reperfusão também foi obtida a partir de terapia gênica com outras enzimas anti-oxidantes 3, 4, assim como proteínas *heat shock5* e "survival genes", como Akt6.

A terapia gênica, visando à proteção miocárdica, também pode ser útil na prevenção da rejeição de órgãos transplantados. Administração do gene da heme-oxigenase com adevírus ao coração de ratos antes do transplante levou ao aumento da sobrevida do enxerto, prevenindo arteriosclerose, inflamação e fibrose intersticial 7.

A inibição de genes pro-inflamatórios ativados pela isquemia/injúria de reperfusão pode ser uma alternativa para proteção cardíaca aguda. O pré-tratamento com oligonucleotídeos capazes de inibir a atividade do fator nuclear-kB reduziu o tamanho do infarto após a ligadura coronária em ratos 8 e tratamentos semelhantes aumentaram a tolerância e a sobrevivência de enxertos 9.

Terapia gênica com citocinas angiogênicas

Angiogênese e vasculogênese são responsáveis pela formação do sistema vascular em embriões 10 11 12. Vasculogênese é o processo de formação *in situ* de vasos sanguíneos a partir de células progenitoras endoteliais e angioblastos, que migram e se fundem com outras células endoteliais progenitoras e capilares enquanto formam novos vasos. Já a angiogênese é a extensão de uma rede vascular já formada pelo surgimento de novos capilares e proliferação de células previamente diferenciadas.

Até recentemente, acreditava-se que a vasculogênese estivesse restrita ao desenvolvimento embrionário, sendo a neovascularização em adultos feita somente pela angiogênese. A descoberta de que células progenitoras endoteliais derivadas da medula óssea circulam no sangue periférico 13, migram e se incorporam para *foci* de neovascularização em animais adultos 14, aumentam de número em resposta a isquemia tecidual 15, e aumentam o desenvolvimento de vasos colaterais após expansão *ex vivo* e transplante 16 mudou este paradigma. Estes estudos estabeleceram que a neovascularização em adultos não está restrita à angiogênese; ela envolve os dois mecanismos observados nos embriões.

A angiogênese, induzida pela administração direta de fatores de crescimento de endotélio vascular no miocárdio isquêmico, destina-se a promover a formação de novos vasos, capilares e arteríolas, em regiões cuja revascularização não é possível por cirurgia

direta, nem por angioplastia percutânea. Sendo a angiogênese o efeito buscado pela maior parte dos estudos com terapia gênica em doenças cardiovasculares, seu mecanismo merece ser detalhado.

Angiogênese Mecanismo da Angiogênese

A formação natural de novos vasos sanguíneos pode ser iniciada por alguns fatores de natureza mecânica, por processos inflamatórios ou por hipóxia (desequilíbrio energético). O processo de angiogênese ocorre por estágios, representados na seqüência da Figura 1, e que, resumidamente, 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 (estágio 1). 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 (estágio 2). 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 (estágio 3) 17 (3). (Fig. 1).

O processo pelo qual a hipóxia e a inflamação induzem à angiogênese está parcialmente esclarecido. Em resumo, sabe-se que 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), o que leva a aumento da expressão de VEGF (vascular endothelium growth factor), seus receptores Flt1 e Flk1 e da sintetase de óxido nítrico (eNOS). Por outro lado, o PR-39 aumenta a produção de fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), os quais têm poder angiogênico. Ainda por outro caminho, a inflamação induz a produção de citocinas promotoras de angiogênese. (Fig. 2) 18

- Mello LG, Pachori AS, Kong D, et al. Molecular and cell-based therapies for protection, rescue and repair of ischemic myocardium. Reasons for cautious optimism. *Circulation*. 2004;109:2386-2393.
- Melo LG, Agrawal R, Zhang L, et al. Gene therapy strategy for long term myocardial protection using adeno-associated virus-mediated delivery of heme oxygenase gene. *Circulation*. 2002;105:602-607.
- Woo YZ, Zhang JC, Vijayarathay C, et al. Recombinant adenovirus-mediated cardiac gene transfer of superoxide dismutase and catalase attenuates postischemic contractile dysfunction. *Circulation*. 1998;98 (suppl): II-255-II-260.
- Zhu HL, Stewart AS, Taylor MD. Blocking free radicals production via adenoviral gene transfer decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *Mol Ther*. 2001;3:A837.
- Suzuki K, Sawa Y, Kaneda Y. In vivo gene transfer of heat shock protein 70 enhances myocardial tolerance to myocardial ischemia-reperfusion injury in rat. *J Clin Invest*. 1997;99:1645-1650.
- Matsui T, Li L, Del Monte F, et al. Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro. *Circulation*. 1999;100:2373-2379.
- Tsui TY, Wu X, Lau CK, et al. Prevention of chronic deterioration of heart allograft by recombinant adeno-associated virus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer. *Circulation*. 2003;107:2623-2629.
- Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, et al. In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor kB binding sites prevents myocardial infarction. *Nat Med*. 1997;3:894-899.
- Poston RS, Mann MJ, Hoyt EG, et al. Antisense oligodeoxynucleotides prevent acute cardiac allograft rejection via a novel, non-toxic, highly efficient transfection method.
- Rissau W. Differentiation of endothelium. *FASEB J* 1995;9:926-33.
- Flamme I, Rissau W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development*. 1992;116:435-9.
- Weiss MJ, Orkin SH. In vitro differentiation of murine embryonic stem cells. New approaches to old problems. *J Clin Invest*. 1996;97:591-5.

- 13 Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalla C, Pastore C, Silver M, et al. Isolation of putative progenitor endothelial progenitor cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-
- 20 Asahara T, Masuda H, Takashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999;85:221-8.
- 21 Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia- and cytokine-induced of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999;5:434-8.
- 16 Kalka C, Masuda H, Takahashi, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:3342-7.
- 17 Rukusan K. Coronary angiogenesis- from morphometry to molecular biology and back. *Annals New York Academy of Sciences* 1995;752:257-266.
- 18 Habeck M. Wielding more power over angiogenesis. *Molecular Medicine Today* 2000;6:138-139.

- plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet*. 1992;1:363-9.
- 5 Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, et al. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation*. 1996;74:1061-5.

Estudos Experimentais

O modelo mais comum utiliza um constritor amaurótico para gradualmente ocluir uma artéria coronária. A ligação de uma coronária produz infartos transmuralis em porcos e infartos menores, não transmuralis, em cães. Nestes modelos, proteínas angiogênicas ou genes foram administrados por várias rotas, e sua efetividade foi avaliada pela análise histológica do número e tamanho dos capilares e vasos, quantificação dos marcadores celulares endoteliais, medida do fluxo sanguíneo coronário, angiografia, e medida da função ventricular durante repouso ou stress.

A maior parte dos estudos demonstrou evidência de angiogênese após a intervenção. Injeção intracoronariana de FGF-2 de 2 a 28 dias aumentou a circulação colateral em cães. Utilizando o mesmo modelo, a injeção por via intravenosa foi inefetiva, provavelmente pelo seqüestro pulmonar.

A experiência com transferência gênica de FGF é mais limitada. Injeção intramuscular de dose única de DNA desnudo codificando FGF-1 e transferência gênica de FGF-5 por adenovírus mostrou melhora da perfusão em modelos isquêmicos de membro inferior de coelhos e miocárdio porcino³⁰, respectivamente.

O efeito do VEGF165 como proteína recombinante foi estudado em modelos caninos e porcinos. Injeção intracoronariana única foi efetiva em porcos, assim como séries de duas injeções locais via cateter por balão⁴¹, injeção intramiocárdica, e injeção intracoronariana no 28º dia pós indução de infarto no cão. A administração por via intravenosa não foi efetiva⁴³.

Genes codificando VEGF165 e VEGF121 assim como VEGF-2 foram utilizados em vários estudos animais, sob a forma de plasmídeo DNA desnudo ou de vetores adenovirais. Injeções intramiocárdicas de plasmídeo DNA codificando VEGF165^{45,46} e VEGF-247, bem como adenovírus codificando VEGF121^{48,49}, pós-infarto por constritor amaurótico, aumentaram a perfusão e função da circulação colateral em porcos.

Problemas como localização indesejada, baixa produção e níveis insuficientes de VEGF no miocárdio, que ocorrem pelo fornecimento intracoronariano de adenovírus⁴⁹, ou resultados como o não-aumento da circulação colateral na oferta de adenovírus via pericárdica em cães⁵⁰ são fatores que apontam favoravelmente para utilização da via intramiocárdica. Estudos recentes também sugerem que a injeção de plasmídeo VEGF165 em porcos é efetiva quando administrada intramiocárdio transendocárdio por cateter⁴⁶.

Recentemente um estudo experimental comparou os efeitos da administração de FGF e VEGF intramiocárdicos como proteínas recombinantes sobre o miocárdio hibernante⁵¹. Ambos demonstraram melhora da perfusão, sendo que este efeito foi inconsistente sobre a função cardíaca. Mais importante, esta melhora da perfusão foi mantida por 6 meses após a terapia, demonstrando que os vasos, uma vez criados, foram mantidos por mecanismos fisiológicos. A potência angiogênica dos fatores foi similar.

Estudos Clínicos

A angiogênese terapêutica por meio de proteínas recombinantes angiogênicas não é efetiva para doença coronariana em seres humanos nas dosagens e na forma em que foi tentada, provavelmente devido à pequena dosagem atingida no miocárdio isquêmico, considerando-se a farmacocinética destas proteínas recombinantes. Os dois principais estudos de fase II, o FIRST (ref. 59) e o VIVA trial (ref 58), que utilizaram múltiplas aplicações de, respectivamente, FGF e VEGF como proteína recombinante em pacientes com cardiopatia isquêmica, não mostraram eficácia da terapêutica em relação ao desfecho primário.

Os estudos clínicos publicados sobre transferência gênica para angiogênese terapêutica até a pouco foram limitados a ensaios de fase I, não randomizados, apenas avaliando diferentes doses de plasmídeo ou adenovírus.

Um ensaio envolveu 30 pacientes com angina refratária e

Fatores de Crescimento Angiogênico

As duas famílias de fatores mais bem estudadas, que participam do processo acima descrito, são as de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e as de fator de crescimento fibroblástico (FGF). O membro melhor identificado da família VEGF é VEGF-A, que consiste de 5 isoformas, resultantes de divisões alternativas de um gen único, ou sejam: VEGF 121, VEGF 145, VEGF 165, VEGF 189 e VEGF 206. A família FGF compreende pelo menos 9 polipeptídeos, incluindo FGFbásico e FGFácido. Diferentemente do VEGF, FGF atua na mitogênese de células endoteliais, de fibroblastos e de células musculares lisas.

Angiogênese Terapêutica: Proteína Recombinante x Terapia Gênica

Citocinas angiogênicas podem ser administradas como proteínas recombinantes humanas ou por transferência gênica. A utilização de proteína recombinante é uma abordagem mais convencional e tipicamente demonstra uma relação mais precisa de dose-resposta do que a transferência gênica. A proteína é normalmente administrada por via sistêmica e portanto é limitada pelos efeitos colaterais em potencial das altas concentrações plasmáticas necessárias para atingir uma captação adequada do miocárdio. Esse efeitos colaterais incluem hipotensão e edema com o VEGF1. A cinética de proteínas recombinantes circulantes sugere que, com o uso intravenoso, é pouco provável que haja uma captação miocárdica ou tempo de permanência suficientes para atingir efeitos biológicos importantes; a via intracoronariana é uma alternativa². Uma aplicação potencialmente útil seria uma dose única que promovesse um aumento na concentração da proteína angiogênica na área de isquemia miocárdica sem aumento nos níveis sistêmicos, para reduzir o potencial de efeitos colaterais. As formas de terapia gênica atualmente disponíveis podem atingir estes alvos terapêuticos. DNA desnudo e adenovírus produzem efeitos apenas transitórios, o que seria adequado para o time frame necessário para a angiogênese. A via intracoronariana pode ser suficiente para transferência gênica por adenovírus³, enquanto DNA plasmídeo desnudo requer injeção intramiocárdica direta devido à degradação por nucleases circulantes^{4,5}.

- 1 Hariawala MD, Horowitz JR, Esakof D, et al. VEGF improves myocardial blood flow but EDRF-mediated hypotension in porcine hearts. *J Surg Res*. 1996;63:77-82.
- 2 Lazarous DF, Shou M, Stiber JA, et al. Pharmacodynamics of basic fibroblast growth factor: route of administration determines myocardial and systemic distribution. *Cardiovasc Res*. 1997;36:78-85.
- 3 Giordano FJ, Piong P, McKirnan MD, 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;2:534-9.
- 4 Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, et al. Long-term persistence of

não-tratáveis por revascularização convencional⁶²⁻⁶⁴. Três grupos (com 10 pacientes cada) receberam diferentes doses (125, 250 e 500 mcg) de plasmídeo DNA codificando VEGF-165 via intramiocárdica por meio de uma mini-toracotomia. Foi realizado mapeamento eletromecânico do ventrículo esquerdo antes e 60 dias depois, com melhora significativa após a terapia gênica na contratilidade miocárdica, o que correspondeu a aumento da perfusão em repouso e em *stress*⁶³ ao SPECT (*single-photo emission computed tomography*).

Quanto à sintomatologia, em 1 ano o consumo de nitroglicerina diminuiu de 60 comprimidos/semana para 3 comprimidos/semana; também foi significativo o aumento no tempo de exercício (98s) e no tempo de exercício para angina (2,5 min)⁶⁴; tais resultados positivos já haviam sido parcialmente observados 90 dias após tratamento com plasmídeo DNA⁶².

Esses achados apóiam a tese de que certos defeitos cardíacos devem-se a focos de hibernação de miocárdio viável⁶⁵, melhorados após neovascularização.

Outros três estudos com injeção intramiocárdica de plasmídeo DNA codificando VEGF-2 mostraram resultados favoráveis à terapia gênica. O primeiro deles^{66,67}, com 30 pacientes, apresentou aos 90 dias diminuição da frequência de angina e do consumo de nitroglicerina, aumento no tempo de exercício, além de melhora na perfusão miocárdica nuclear e contratilidade cardíaca por mapeamento eletromecânico.

No segundo⁶⁸, os 6 pacientes receberam injeção por cateter e obtiveram diminuição da angina aos 90 dias, além de melhora da perfusão e da função eletromecânica. Este último serviu de base para um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, que também utilizou cateter para injeção do plasmídeo nos 19 pacientes em estudo⁶⁹⁻⁷¹. Eles apresentaram redução na classe da angina e melhora na perfusão de áreas hipoperfundidas ao *stress*.

Além das vantagens citadas, a taxa de mortalidade nesses quatro estudos com VEGF-1 ou VEGF-2 foi de 3,5% em aproximadamente 33 meses de seguimento. Enquanto isso, ensaios clínicos que realizaram cirurgia de revascularização transmiocárdica a laser apresentaram taxas de mortalidade bastante superiores, de 11 a 13% em 1 ano⁷²⁻⁷⁴.

Também foram realizados estudos de terapia gênica mediante transferência de adenovírus codificando VEGF121^{75,76} ou FGF-4⁷⁷. Em um dos estudos com VEGF121⁷⁵, o adenovírus foi administrado intramiocárdio em 15 pacientes durante cirurgia de *bypass* e em 6 pacientes por mini-toracotomia. Houve melhora dos sintomas em ambos os grupos, apesar de as imagens de perfusão no *stress* induzido não apresentarem mudança.

Outro estudo com adenovírus, o *Angiogenic GENE Therapy* (AGENT)⁷⁷, um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, utilizou Ad5FGF-4 em injeção intracoronariana simples a fim de avaliar sua segurança e efeitos anti-iscêmicos. Setenta e nove pacientes, entre 30 e 75 anos, com angina estável há mais de 2 meses (classes 2 ou 3 segundo a Canadian Cardiovascular Society) foram alocados para receber placebo (n=19) ou tratamento ativo (n=60) em doses crescentes (3,3.10⁸ a 10¹¹ partículas). Não houve efeitos adversos imediatos. Efeitos adversos graves durante o seguimento (média de 311 dias) não foram diferentes entre controle e Ad5FGF-4.

O desfecho primário, aumento no tempo de exercício, não foi significativo entre tratamento ativo e placebo em 4 e 12 semanas pós-intervenção (1,34 vs. 0,68 e 1,67 vs. 0,98 min, respectivamente). Tendência a melhora no tempo para angina também não foi significativa. Em análise posterior, pacientes com tempo de teste ergométrico = 10 min antes do experimento, entretanto, apresentaram melhora no tempo de exercício quando tratados com Ad5FGF-4 (1,6 vs. 0,6 min), além de aumento também significativo no tempo para angina em 4 semanas (1,7 vs. 0,7 min).

O *Kuopio Angiogenesis Trial* (KAT) avaliou a segurança e factibilidade da transferência gênica de VEGF por cateterismo na prevenção da reestenose pós-angioplastia e no tratamento da cardiopatia isquêmica crônica, em um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, controlado por placebo⁷⁸. Para tal, 103 pacientes (classe Canadian Cardiovascular Society II a III, idade média 58± 6 anos) submetidos a PCTA foram randomizados em 3 grupos: 37 receberam VEGF adenovírus (VEGF-adv, 2x 10¹⁰), 28 pacientes receberam lipossomo com plasmídeo VEGF (VEGF-P/L; 2000 ug de DNA com 2000 uL de DOMTA:DOMA). O acompanhamento de 6 meses demonstrou que: (1) transferência gênica por via intracoronariana pode ser feita de maneira segura (não ocorreram efeitos relacionados à terapia);

(2) não houve diferença na taxa de reestenose; (3) um aumento significativo na perfusão foi detectado no grupo que recebeu VEGF-adv.

Nossa Experiência

Em Porto Alegre, contando com a colaboração de grande número de colegas, temos desenvolvido experimentos, na tentativa de acompanhar os processos de terapia gênica. Em estudo anterior⁸³, desenvolvemos um modelo canino de cardiopatia isquêmica com controle cintilográfico e testamos a transfecção do gene responsável pela produção da proteína verde fluorescente, demonstrando a efetiva produção proteína na área tratada, e portanto, a eficácia do processo de transfecção gênica desse modelo.

Posteriormente, utilizando um modelo semelhante, verificamos a indução de angiogênese miocárdica pela injeção transmural de plasmídeo VEGF 165 (Genentech/ USA) em zonas do infarto agudo do miocárdio (IAM) de cães. Para tal, em onze cães anestesiados, o coração foi abordado em toracotomia antero-lateral esquerda e produzido IAM pela ligadura simples de ramo diagonal da artéria coronária descendente anterior. Em cada 10 pontos selecionados da área infartada e sua periferia foi realizada a injeção de um total de 1 ml de solução salina (grupo controle: 5 cães) ou de solução contendo plasmídeo VEGF 165 na concentração de 200 ug/ml (grupo tratado: 6 cães). Os animais foram recuperados e foi realizada cintilografia miocárdica com Tecnécio imediatamente e 14 dias após IAM. Os animais foram sacrificados e o coração retirado para estudo histológico da área de infarto, de sua periferia e de área da parede ventricular posterior, visando à contagem eletrônica de capilares e arteríolas. A cintilografia miocárdica mostrou modificações na perfusão miocárdica comparáveis entre os grupos quanto ao estudo imediato e 15 dias após IAM, sendo que os dois grupos mostraram uma recuperação de 70 a 90 % da hipoperfusão demonstrada no 1º exame. O estudo histológico da área de transição do IAM revelou um maior número de vasos no grupo tratado em relação ao grupo controle (média de 123,81 ± 21,48 e 40 ± 6,13, respectivamente; p < 0,01). Este crescimento do número de vasos é atribuível principalmente ao aumento do número de capilares (97,5 ± 16,04 no grupo tratado e 22,18 ± 3,25 no grupo controle, p < 0,01), sendo que em relação ao número de arteríolas o aumento não foi significativo (25,16 ± 10,89 e 16,8 ± 4,75; NS). A comparação entre a região de transição do IAM do grupo tratado e de área normal, revelou maior número de vasos na região tratada, ainda que a diferença não fosse significativa (respectivamente 123,81 ± 21,48 e 95,14 ± 41,19, p > 0,05). Desta forma, a injeção transmural de plasmídeo VEGF 165 resultou em significativo aumento no número de capilares na zona de transição do IAM experimental. O aumento de capilares pela terapia gênica tem presumível efeito benéfico na redução e recuperação da área isquêmica.

Perspectivas

A terapia gênica, especialmente como indutora de angiogênese miocárdica, despertou grande interesse nos últimos anos. Alguns estudos randomizados e multicêntricos, já em fase II, foram iniciados, para avaliar sua eficácia na cardiopatia isquêmica. A ocorrência de alguns eventos negativos, em especial o óbito de um paciente submetido à terapia com adenovírus em dose elevada, levou os pesquisadores a refrear seu entusiasmo, e as agências reguladoras a examinar mais detidamente as pesquisas em andamento. Desta forma, a terapia gênica passa hoje por um processo de reavaliação cautelosa de seus efeitos e complicações. Mantém-se, entretanto, com grande campo potencial de atuação e, por certo, encontrando seu ponto de equilíbrio, como ocorre com todos os novos processos, na medicina principalmente, deverá ter papel significativo na terapêutica cardiovascular do futuro, em particular naquelas situações onde se esgotam os recursos atualmente disponíveis.

Legendas

Figura 1 - Esquematização da seqüência de eventos no processo de angiogênese (Segundo Rakusan (3).

Figura 2 - Mediadores bioquímicos envolvidos no processo pelo qual a hipóxia e a inflamação levam à angiogênese. HIF=fator hipóxia-induzível, VEGF=vascular endothelial growth factor, Flt1 e Flk1=receptores de VEGF, eNOS=endothelial cell nitric oxide synthase, TGF=transforming growth factor, TNF=tumor necrosis factor,

Referências Bibliográficas

- 1 American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics: 2004 Update. Dallas, Tex: American Heart Association; 2003.
- 2 Golberg RJ, Kostam MA. Assessing the population burden from heart failure: need for sentinel population based-surveillance systems. *Arch Int Med.* 1999;159:
- 3 Svensson EC, Marshall DJ, Woodard K, et al. Efficient and stable transduction of cardiomyocytes after intramyocardial injection or intracoronary perfusion with recombinant adeno-associated viral vectors *Circulation.* 1999;99:201-205.
- 4 Raffi S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ revascularization and regeneration. *Nat Med.* 2003;9:702-712.
- 5 Duckers HJ, Nabel EG. Prospects for genetic therapy of cardiovascular disease. *Med Clin North Am* 2000;84(1):199-213.
- 6 Laham RJ, Rezaee M, Garcia L, et al. Tissue and myocardial distribution of intracoronary, intravenous, intraepicardial and intramyocardial 125I-labeled basic fibroblast growth factor favor intramyocardial delivery [Abstract]. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:10A.
- 7 Mello LG, Pachori AS, Kong D, et al. Molecular and cell-based therapies for protection, rescue and repair of ischemic myocardium. Reasons for cautious optimism. *Circulation.* 2004;109:2386-2393.
- 8 Melo LG, Agrawal R, Zhang L, et al. Gene therapy strategy for long term myocardial protection using adeno-associated virus-mediated delivery of heme oxygenase gene. *Circulation.* 2002;105:602-607.
- 9 Woo YZ, Zhang JC, Vijayasathay C, et al. Recombinant adenovirus-mediated cardiac gene transfer of superoxide dismutase and catalase attenuates postischemic contractile dysfunction. *Circulation.* 1998;98 (suppl): II-255-II-260.
- 10 Zhu HL, Stewart AS, Taylor MD. Blocking free radicals production via adenoviral gene transfer decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *Mol Ther.* 2001;3:A837.
- 11 Suzuki K, Sawa Y, Kaneda Y. In vivo gene transfer of heat shock protein 70 enhances myocardial tolerance to myocardial ischemia-reperfusion injury in rat. *J Clin Invest.* 1997;99:1645-1650.
- 12 Matsui T, Li L, Del Monte F, et al. Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro. *Circulation.* 1999;100:2373-2379.
- 13 Tsui TY, Wu X, Lau CK, et al. Prevention of chronic deterioration of heart allograft by recombinant adeno-associated virus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer. *Circulation.* 2003;107:2623-2629.
- 14 Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, et al. In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor kB binding sites prevents myocardial infarction. *Nat Med.* 1997;3:894-899.
- 15 Poston RS, Mann MJ, Hoyt EG, et al. Antisense oligodeoxynucleotides prevent acute cardiac allograft rejection via a novel, non-toxic, highly efficient transfection method.
- 16 Rissau W. Differentiation of endothelium. *FASEB J* 1995;9:926-33.
- 17 Flamme I, Rissau W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development.* 1992;116:435-9.
- 18 Weiss MJ, Orkin SH. In vitro differentiation of murine embryonic stem cells. New approaches to old problems. *J Clin Invest.* 1996;97:591-5.
- 19 Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalla C, Pastore C, Silver M, et al. Isolation of putative progenitor endothelial progenitor cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275:964-
- 20 Asahara T, Masuda H, Takashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85:221-8.
- 21 Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia- and cytokine-induced of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 1999;5:434-8.
- 20 Kalka C, Masuda H, Takahashi, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:3342-7.
- 21 Rukusan K. Coronary angiogenesis- from morphometry to molecular biology and back. *Annals New York Academy of Sciences* 1995;752:257-266.
- 22 Habek M. Wielding more power over angiogenesis. *Molecular Medicine Today* 2000;6:138-139.
- 23 Hariawala MD, Horowitz JR, Esakof D, et al. VEGF improves myocardial blood flow but EDRF-mediated hypotension in porcine hearts. *J Surg Res.* 1996;63:77-82.
- 24 Lazarous DF, Shou M, Stiber JA, et al. Pharmacodynamics of basic fibroblast growth factor: route of administration determines myocardial and systemic distribution. *Cardiovasc Res.* 1997;36:78-85.
- 25 Giordano FJ, Piong P, McKirnan MD, 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;2:534-9.
- 26 Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, et al. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet.* 1992;1:363-9.
- 27 Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, et al. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation.* 1996;74:1061-5.
- 28 Schaper W, Munoz-Chapuli R, Wolf C, et al. Collateral circulation of the heart. In: Ware JA, Simons M, eds. *Angiogenesis and the cardiovascular disease.* New York: Oxford Univ Pr; 1999:159-98.
- 29 Unger EF, Banai S, Shou M, et al. Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am J Physiol.* 1994;266:H1588-95.
- 30 Lazarous DF, Shou M, Scheinowitz M, et al. Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. *Circulation.* 1996;94:1074-82.
- 31 Rajanayagam MA, Shou M, Thirumurti V, et al. Intracoronary basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral perfusion in dogs. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:519-26.
- 32 Tabata H, Silver M, Isner JM, et al. 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;35:470-9.
- 33 Hariawala MD, Horowitz JR, Esakof D, et al. VEGF improves myocardial blood flow but produces EDRF-mediated hypotension in porcine hearts. *J Surg Res* 1996;63:77-82.
- 34 Lopez JJ, Laham RJ, Stamler A, et al. VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs. *Cardiovasc Res.* 1998;40:272-81.
- 35 Harada K, Friedman M, Lopez JJ, et al. Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol.* 1996;270:H1791-802.
- 36 Hughes CG, Biswas SS, Yin B, et al. Intramyocardial but not intravenous vascular endothelial growth factor improves regional perfusion in hibernating porcine myocardium.

- 37 Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation*. 1994;89:2183-9.
- 45 Tio RA, Tkebuchava T, Scheuermann TH, Leberherz C, Magner M, Kearny M, et al. Intramyocardial gene therapy with naked DNA encoding vascular endothelial growth factor improves collateral flow to ischemic myocardium. *Hum Gene Ther*. 1999;10:2953-60.
- 46 Vale PR, Milliken CE, Tkebuchava T, Chen D, Igawura H, Magner M, et al. Catheter-based gene transfer of VEGF utilizing electromechanical LV mapping accomplishes therapeutic angiogenesis: pre-clinical studies in swine. [Abstract]. *Circulation*. 1999;100:I-512.
- 47 Vale PR, Tkebuchava T, Milliken CE, Chen D, Symes JF, Isner JM. Percutaneous electromechanical mapping demonstrates efficacy of pVGL1 (VEGF2) in an animal model of chronic myocardial ischemia [Abstract]. *Circulation*. 1999;100:I-22.
- 48 Mack CA, Patel SR, Schwarz EA, Zanzonico P, Hahn RT, Iltercil 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;115:168-76.
- 49 Lee LY, Patel SR, Hackett NR, Mack CA, Polce DR, El-Sawy T, et al. focal angiogen therapy using intramyocardial delivery of an adenovirus vector coding for vascular endothelial growth factor 121. *Ann Thorac Surg*. 2000;69:14-23.
- 50 Lazarous DF, Shou M, Stiber JA, Hodge E, Thirumurti V, Goncalves L, et al. Adenoviral-mediated gene transfer induces sustained pericardial VEGF expression in dogs: effect on myocardial angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 1999;44:294-302.
- 51 Hughes GC, Biswas SS, Yin B, Coleman RE, DeGrado TR, Landolfo CK, et al. Therapeutic angiogenesis in chronically ischemic porcine myocardium: comparative effects of bFGF and VEGF. *Ann Thorac Surg*. 2004 Mar;77(3):812-818.
- 52 Schumacher B, Pecher P, von Specht BU, Stegmann T. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation*. 1998;97:645-50.
- 53 Laham RJ, Sellke FW, Edelman ER, Pearlman JD, Ware JA, Brown DL, et al. 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;100:1865-71.
- 54 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;101:118-21.
- 55 Henry TD, Rocha-Singh K, Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ, Simons M, et al. Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial factor (rhVEGF) to patients with coronary artery disease. *Am Heart J*. 2001;142:872-80.
- 56 Udelson JE, Dilsizian V, Lahan RJ, Chronos N, Vansant J, Blais M, et al. 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;102:1605-10.
- 57 Ruel M, Laham RJ, Parker JA, Post MJ, Ware JA, Simons M, Sellke FW, et al. Long-term effects of surgical angiogenic therapy with fibroblast growth factor 2 protein. *J Thorac Cardiovasc surg*. 2002; 124(1):28-34.
- 58 Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, Shah PK, Willerson JT, Benza RL, Berman DS, Gibson CM, Bajamonde A, Rundle AC, Fine J, McCluskey ER. The VIVA Trial – Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation*. 2003;107:1359-65.
- 59 Kleiman NS, Califf RM. Results from late-breaking clinical trials sessions at ACCIS2000 and ACC2000. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 36:310-25.
- 60 Lazarous DF, Shou M, Stiber JA, Dadhania DM, Thirumurti V, Hodge E, et al. Pharmacodynamics of basic fibroblast growth factor: route of administration determines myocardial and systemic distribution. *Cardiovasc Res*. 1997; 36:78-85.
- 61 Lahan RJ, Rezaee M, Garcia L, Post M, Sellke FW, Baim DS, et al. Tissue and myocardial distribution of intracoronary, intravenous, intrapericardial and intramyocardial 125I-labeled basic fibroblast growth factor (bFGF) favor intramyocardial delivery [Abstract]. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:10A.
- 62 Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*. 1998;98:2800-4.
- 63 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;102:965-74.
- 64 Vale PR, Losordo DW, Dunnington C, Esakof DD, Maysky M, Milliken CE, et al. Direct myocardial injection of phVEGF165: results of complete patient cohort in phase 1/2 clinical trial [Abstract]. *Circulation*. 1999;100:I-477.
- 65 Dilsizian V, Bonow RO. Current diagnostic techniques of assessing myocardial viability in patients with hibernating and stunned myocardium. *Circulation*. 1993; 87:1-20.
- 66 Vale PR, Milliken CE, Fortuin FD, Schatz RA, Esakof DD, Maysky M, et al. Effective gene transfer of phVEGF-2 for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia as assessed by NOGA left ventricular electromechanical mapping [Abstract]. *Circulation*. 2000;102:II-689.
- 67 Hendel RC, Vale PR, Losordo DW, Schatz RA, Fortuin FD, Schaer GL, et al. The effects of VEGF-2 gene therapy on rest and stress myocardial perfusion: results of serial SPECT imaging. *Circulation*. 2000; 102:II-769.
- 68 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;103:2138-2143.
- 69 Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, Schatz RA, Fortuin FD, Esakof DD, et al. Randomized, placebo-controlled clinical study of percutaneous catheter-based left ventricular endocardial gene transfer of VEGF-2 for myocardial angiogenesis in patients with chronic myocardial ischemia [Abstract]. *Circulation*. 2001;102:II-563.
- 70 Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, Fortuin FD, Symes JF, Schatz RA, et al. Phase I placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor-2 (VEGF-2) gene transfer utilizing catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia [Abstract]. *Circulation*. 2001;104:II-253.
- 71 Kerwin TC, Isner JM, Leonard SM, Losordo DW, Vale PR, Schatz RA, et al. Double-blind catheter-based VEGF gene transfer for myocardial ischemia. Effect on myocardial perfusion assessed by SPECT imaging [Abstract]. *Circulation*. 2001;104:II-456
- 72 Schofield PM, Sharples LD, Caine N, Burns S, Tait S, Wistow T, et al. Transmyocardial laser revascularization in patients with refractory angina: a randomized controlled trial. *Lancet*. 1999;353:519-24.

- 73 Allen KB, Dowling RD, Fudge TL, Schoettle GP, Selinger SL, Gangahar DM, et al. Comparison of transmyocardial revascularization with medical therapy in patients with refractory angina. *N Engl J Med.* 1999;341:1029-36.
- 74 Aaberge L, Nordstrand K, Dragsund M, Saatvedt K, Endresen K, Golf S, et al. Transmyocardial revascularization with CO2 laser in patient with refractory angina pectoris. Clinical results from the Norwegian randomized trial. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:1170-7.
- 75 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; 100:468-74.
- 76 Rosengart TK, Lee LY, Port JL, Hahn RT, Devereux RB, Finnin E, et al. Video assisted epicardial delivery of angiogenic gene therapy to the human myocardium utilizing an adenovirus vector encoding for VEGF121 [Abstract]. *Circulation.* 1999;100:1-770.
- 77 Grines CL, Watkins MW, Helmer G, et al. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation.* 2002;105:1291-1297.
- 78 Hedman M, Hartikainen J, Syväne M, Sterjnvall J, Hedmann 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 treatment of chronic myocardial ischemia. *Circulation.* 2003; 107:2677-2683.
- 81 Matsuki A, Yamamoto S, Nakagami H, Aoki M, Tamai K, Matsumoto K, nakamura T, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R. Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines e threshold between normal and aberrant angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;315(1):59-65.
- 83 Kalil RAK, Teixeira LAK, Mastalir ET, Fricke CH, Moreno P, Nardi NB. Experimental model of gene transfection in healthy canine myocardium. Perspectives of gene therapy for ischemic heart disease. *Arq Bras Cardiol* 2002;79: 228-32.

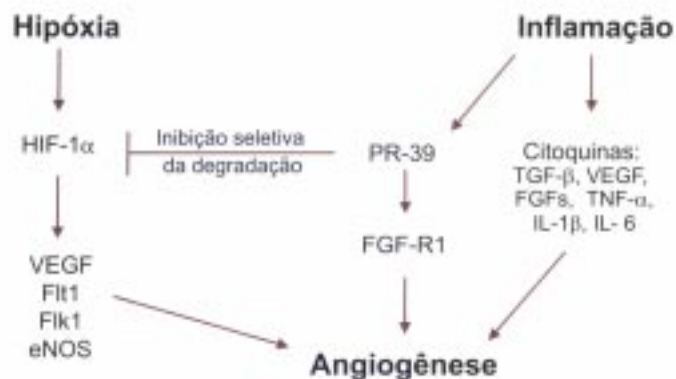


Figura 2.

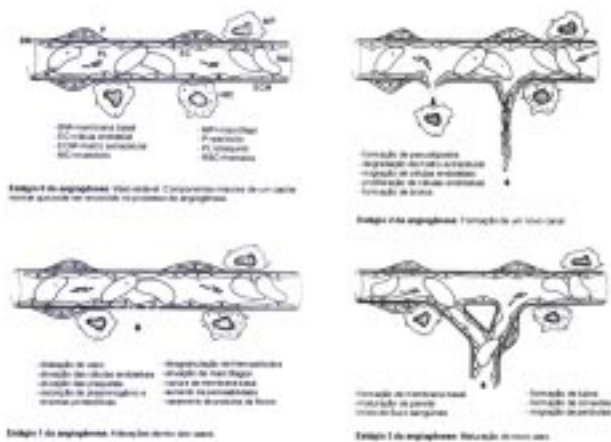


Figura 1.