

Angiogenesis terapéutica en la enfermedad coronaria*

Juan C. Llosa¹
 Jose M. Valle¹
 Rosario Cortina²
 Aurora Astudillo³
 Jose M. Vallina⁴
 Teresa Sanchez⁵
 Arturo Cortina²

¹Servicio de Cirugía Cardíaca

²Servicio de Cardiología

³Servicio de Anatomía Patológica

⁴Servicio de Anestesia

⁵Animalario

de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo

Correspondencia:

Juan C. Llosa Cortina
 Servicio de Cirugía Cardíaca
 Hospital Central de Asturias

Julián Clavería, s/n

Oviedo 33006

E-mail:

juan_llosa@hotmail.com

Resumen

Objetivo: Se realizó un estudio experimental para valorar la utilidad de la angiogénesis en la enfermedad coronaria empleando inicialmente un modelo en arteria femoral de conejo, seguido de un estudio en arteria coronaria de cerdo.

El estudio en conejos incluye catorce animales divididos en tres grupos: Grupo Tratado (seis animales con ligadura de la arteria femoral superficial más inyección de factor de crecimiento fibroblástico "in situ"), Grupo Placebo (cuatro animales con ligadura más placebo) y Grupo Sham (cuatro animales sin ligadura y sin placebo). El factor y el placebo se inyectaron a los siete días post-ligadura. Se comparó el desarrollo de circulación colateral valorando la densidad de capilares por mm² sacrificando al animal a los 15 días post-inyección.

La media y desviación estándar de los Grupos Tratado, Placebo y Sham fue de 40,1±5,0; 20,1±6,1 y 8,2±5,1 respectivamente. La diferencia entre los Grupos Factor y Placebo resultó estadísticamente significativa (p<0,001) así como entre Placebo y Sham (p<0,05).

El estudio en cerdos incluye 14 animales distribuidos en los siguientes grupos: seis casos con ligadura de la coronaria descendente anterior más factor de crecimiento fibroblástico "in situ", cuatro casos con ligadura más placebo y un cerdo como grupo Sham. Tres cerdos más murieron tras la ligadura.

La media y desviación estándar de los Grupos Tratado, Placebo y Sham fue de 133,5±35,1; 94,1±2,6 y 30,1±3,2 (diez cortes) respectivamente. La diferencia entre los Grupos Factor y Placebo resultó estadísticamente significativa (p<0,05) así como entre Placebo y Sham (p<0,001).

Conclusión: Los resultados obtenidos entre los tres grupos, tanto en el estudio en conejos como en cerdos, refuerza la idea de que la isquemia "per se" aumenta la circulación colateral, efecto que se potencia cuando se añaden factores de crecimiento.

Palabras clave: Angiogenesis. Circulación colateral. Enfermedad coronaria.

Summary

Objective: An experimental study was carried out to validate the utility of the angiogenic therapy in coronary artery disease using a model initially in rabbit femoral artery followed by a study in pig coronary artery.

The study in rabbits includes 14 animals divided in three groups: Treated Group (six animals with surgical ligation of the superficial femoral artery and local injection of fibroblastic growth factor), Placebo Group (four animals with ligation and placebo injection) and Sham Group (four animals neither ligated nor injected). The growth factor and the placebo were injected at 7th day post-ligation. The development of collateral circulation by capillary density was studied sacrificing the animal 15th day post-injection.

Mean and standard deviation values of the Treated, Placebo and Sham Groups were 40,1±5,0; 20,1±6,1 and 8,2±5,1 respectively. The difference between the Factor and Placebo Groups was statistically significant (p<0,001) as well as between Placebo and Sham Groups (p<0,05).

The study in pigs includes 14 animals distributed in the following groups: six cases with anterior descending coronary artery ligation and local fibroblastic growth factor injection, four cases with ligation and placebo injection and a pig as Sham Group. Three more pigs died after coronary ligation.

Mean and standard deviation values of the Treated, Placebo and Sham Groups were 133,5±35,1; 94,1±2,6 and 30,1±3,2 respectively. The difference between the Factor and Placebo Groups is statistically significant (p<0,05) as well as between Placebo and Sham Groups (p<0,001).

Conclusion: The results obtained among the three groups, both in rabbits and pigs, reinforces the idea that the ischemia "per se" increases the collateral circulation, effect that is powered when growth factors are added.

Key words: Angiogenesis. Collateral circulation. Coronary artery disease.

*Estudio realizado con la ayuda de una Beca de la Sociedad Española de Cardiología.

Introducción

La enfermedad coronaria es una patología común en nuestro medio. El tratamiento médico, la angioplastia y la cirugía han obtenido grandes éxitos en este campo. No obstante existen pacientes que no obtienen beneficio con ninguno de estos métodos terapéuticos.

Si bien la isquemia coronaria o periférica puede producir un cierto aumento de la circulación colateral, en respuesta a las necesidades titulares¹, ésta se potencia si además se administran localmente factores de crecimiento². Por otra parte, por mecanismos no bien conocidos, ambos mecanismos parecen potenciarse mutuamente.

Por último, recientemente se ha empezado a conocer la existencia de células progenitoras con origen en la médula ósea o en el músculo estriado (mioblastos) responsables de la angiogénesis y vasculogénesis^{3,4}.

En este sentido el desarrollo de la angiogénesis y regeneración celular en el árbol coronario así como en el miocardio humano, es una prometedora vía de investigación.

En esta línea de trabajo y con la ayuda de una Beca de la Sociedad Española de Cardiología iniciamos un estudio que consta de dos fases. La primera de ellas consiste en un estudio experimental empleando factores de crecimiento, que incluye un modelo inicial en arteria femoral de conejo, seguido de un estudio en arteria coronaria de cerdo. La segunda fase, actualmente en desarrollo, incluye un estudio en el humano empleando células progenitoras adultas, dado los malos resultados que dieron en el humano los factores de crecimiento⁵⁻⁷. El presente trabajo muestra los resultados obtenidos en la fase experimental.

Estudio experimental en el conejo

Material y métodos

El estudio en conejos incluye catorce animales New Zealand, entre 2,5-3 Kg, divididos en tres grupos: al primero (grupo tratado), formado por seis animales, se les practicó ligadura de la arteria femoral superficial más inyección de FGF₂ (factor de crecimiento fibroblástico) "in situ". Al segundo grupo (grupo placebo), formado por cuatro animales, se les realizó ligadura arterial más inyección de placebo, existiendo un tercer grupo, (grupo sham, sin ligadura y

sin placebo) formado por los cuatro animales restantes.

Tanto el factor de crecimiento como el placebo (suero fisiológico) se inyectaron a los siete días post-ligadura. Se comparó el desarrollo de circulación colateral en los tres grupos valorando la densidad de capilares por mm², sacrificando al animal a los 15 días post-inyección. Todo el proceso se realizó en las instalaciones del Animalario y Quirófano Experimental de la Universidad de Oviedo.

Los animales permanecieron, a su llegada, una semana de reposo en el animalario con alimentación "ad libitum" (siguiendo las guías del animalario de la Facultad de Medicina de Oviedo y las normas del Comité Ético para el cuidado de animales).

Se empleó anestesia intramuscular con Ketamina® y Xilaona® para realizar la ligadura de la arteria femoral superficial, administrando posteriormente Cefazolina® y anti-inflamatorios no esteroideos (Finedine®) y sutura intradérmica de la incisión, dato éste de sumo interés para evitar que el conejo destruya el tejido cicatricial.

Se mantuvo a los animales con vida durante siete días, al cabo de los cuales se les inyectó en la zona isquémica una dosis de tres microgramos de factor de crecimiento FGF₂/Kg de peso (grupo tratado) o suero fisiológico (grupo placebo).

Al cabo de 15 días de la inyección, los animales fueron sacrificados, previa anestesia y administración de una sobredosis de Pentotal®, tomándose muestras del tejido muscular próximo a la arteria ligada e incluyendo la propia arteria. Las muestras fueron fijadas inmediatamente en formol para valorar el desarrollo de la circulación colateral (densidad de vasos en los cortes anatomopatológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina y Tricómico de Masson), contando el número de vasos por milímetro cuadrado.

Todos los animales fueron evaluados con referencia a infecciones, atrofiaciones musculares consecuentes a la ligadura arterial, necrosis distales y variaciones de la temperatura corporal, así como la aparición de posibles efectos secundarios a la administración de factores de crecimiento.

La densidad capilar se evaluó midiendo el número de capilares, en el microscopio de luz, de las diversas secciones tomadas del área peri-adventicial isquémica. Para ello, se cortó en secciones trasversas el estroma peri-adventicial del músculo abductor en el miembro isquémico. La densidad capilar y el área relativa capilar/estroma se evaluaron en fotografías

microscópicas que se tomaron de una manera randomizada del territorio peri-adventicial, incluyendo músculo de vecindad, en secciones perpendiculares al vaso. Las mediciones se hicieron en 10 fotografías de cada caso a 20 aumentos, calculándose el número de capilares por área y el volumen relativo mediante plantillas de estereología proporcionadas por el programa Image Tool®.

El análisis estadístico se realizó mediante el Test de Student.

Resultados

Con referencia a la densidad de capilares por mm², la media y desviación estándar de los resultados comparando el grupo tratado (ligadura más factor de crecimiento) y grupo placebo (ligadura más placebo) son los siguientes: 40,1±5,02 vs. 20,1±6,1 (p<0,001). Estos valores en el grupo sham eran de 8,2±5,1 constituyendo los valores basales sin ligadura y sin placebo. La diferencia entre el grupo placebo y el grupo sham resultó estadísticamente significativa, con un valor de p<0,05.

Estos datos se muestran en la Figura 1.

En conclusión, los animales del grupo tratado tenían una densidad capilar mayor que los del grupo placebo y en éstos a su vez era superior a los valores basales del grupo sham.

Estudio experimental en el cerdo

Material y métodos

El protocolo en cerdos incluye 14 animales (hembras Yorkshire) entre 25 y 28 Kg distribuidos en los

siguientes grupos: seis casos (grupo tratado) con ligadura de la coronaria descendente anterior más inyección "in situ" de factor FGF₂, cuatro casos (grupo placebo) con ligadura coronaria más inyección de placebo y un cerdo como grupo sham (sin ligadura ni inyección). Tres cerdos más murieron tras la ligadura coronaria.

Todos los procedimientos se realizaron en el Animalario y Quirófano Experimental de la Universidad de Oviedo. Se les practicó una sedación moderada con Zolecopan® intramuscular (4-6 mg/Kg). La inducción anestésica se realizó con Tiopental® intravenoso (8 mg/Kg), empleando ventilación mecánica con oxígeno a 6 l/min. y sedación con Isoflorano® al 2% durante toda la intervención. Tras el procedimiento se administraron corticoides intravenosos (20 mg de Urbason®) a todos los animales.

Asimismo, todos los animales recibieron cobertura antibiótica con Cefazolina® durante los dos días siguientes a la intervención, así como analgesia cuando era precisa.

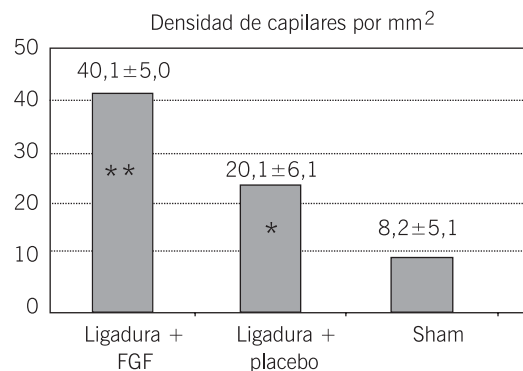
El estudio constaba de tres fases: En una primera fase se les practicó una toracotomía por vía lateral izquierda hasta llegar a la arteria coronaria descendente anterior. Posteriormente se procedía a la ligadura de la misma en su tercio medio empleando sutura de seda no reabsorbible, con objeto de provocar un infarto de miocardio, comprobándose bajo monitorización electrocardiográfica durante todo el proceso. En algunos casos se realizó registro ecocardiográfico. Por último se realizaba el cierre por planos de la toracotomía.

En la segunda fase, a los siete días de postoperatorio, se llevaba al animal de nuevo al quirófano y se inyectaban 200 microgramos de factor de crecimiento fibroblástico (FGF₂) (diluido en suero fisiológico hasta tres ml.) o bien placebo (suero fisiológico) en el área de infarto. La inyección se practicaba en cinco puntos alrededor de la ligadura.

En una tercera fase, a los quince días de la inyección, se sacrificaba al animal con una sobredosis de Pentobarbital® y Cloruro Potásico, procediéndose a la extracción del corazón para realizar un estudio anatomopatológico valorando el desarrollo de circulación colateral en el área inyectada.

Los corazones, una vez extraídos, fueron pesados y medidos en tres dimensiones. A continuación se realizó una fotografía macroscópica y se efectuaron cortes seriados cada 0,5 cm. en sentido perpendicular al eje vertical. Se fotografiaron las zonas patológicas de infarto y las zonas de ligadura, evidenciables por

Figura 1. Desarrollo de circulación colateral en arteria femoral de conejo. Estudio experimental en el conejo. Valor medio y desviación estándar de la densidad de capilares por mm² correspondiente a los Grupos Tratado (ligadura más FGF) Placebo (ligadura más placebo) y Sham (sin ligadura ni inyección). FGF: Factor de crecimiento fibroblástico *Estadísticamente significativo (p<0,05) comparado con el Grupo Sham **Estadísticamente significativo (p<0,001) comparado con el Grupo Placebo



tratarse de una ligadura permanente. Se tomaron bloques representativos, (incluyendo miocardio y epicardio), de la zona previa a la ligadura, zona de ligadura y zona post-ligadura.

Los bloques de 5 mm de espesor se incluyeron en parafina, realizándose cortes seriados de los mismos efectuando tinciones con Hematoxilina-eosina, Tricrómico de Mason y Tinción Inmuno-histoquímica para factor VIII⁵.

La valoración de la densidad de perfiles vasculares se realizó mediante el método morfométrico empleando campos aleatorios de veinte aumentos, analizando uno de cada tres campos.

Resultados

Todos los animales estuvieron controlados con electrocardiograma y mostraron una elevación del segmento ST, así como arritmias ventriculares frecuentes. Tres cerdos murieron tras de la ligadura coronaria no pudiendo ser asignados a ningún grupo de estudio.

En los casos en los que se realizó ecocardiografía (2D y modo M) se pudo apreciar una marcada hipoquinesia de la cara anterior del ventrículo izquierdo.

Con referencia a la densidad de capilares por mm², la media y desviación estándar del grupo tratado, placebo y sham fue de 133,5±35,1; 94,1±2,6 y 30,1±3,2 respectivamente. La diferencia entre los grupos factor y placebo resultó significativa (p<0,05) así como entre placebo y sham (p<0,001). Los valores del grupo sham se obtuvieron al estudiar diez cortes realizados en un único animal.

Estos datos se muestran en la Figura 2.

En los animales ligados y tratados con FGF₂ la densidad capilar en la zona de infarto es mayor que en los ligados y tratados con placebo. A su vez estos valores son superiores a la densidad capilar basal del grupo sham.

Discusión

Como se puede apreciar por los datos obtenidos, existe una marcada diferencia en el desarrollo de circulación colateral entre los grupos estudiados, tanto en el modelo de conejo como en el cerdo, con un significativo aumento de la densidad capilar en la zona infartada en los animales tratados con FGF₂.

Este desarrollo de capilares es importante a pesar de que sólo hemos esperado 15 días tras la administración del factor, con objeto de no retrasar excesivamente esta primera fase experimental.

Las diferencias existentes entre los tres grupos estudiados refuerza la idea de que la isquemia "per se" es un factor que estimula el desarrollo de la circulación colateral, efecto que se potencia cuando se añaden factores de crecimiento⁵.

En el caso concreto del modelo en cerdos es interesante hacer notar que la densidad capilar por mm² de miocardio en corazones normales es un parámetro muy estable (30±3), de modo que estos valores difieren significativamente de los obtenidos en el grupo de animales con ligadura coronaria, tanto con administración de factor como con placebo.

En ningún caso ha habido efectos secundarios, lo cual parece estar en relación con el hecho de que hayamos empleado el factor de crecimiento en forma de proteína recombinante, inyectada localmente y no a través de virus vectores⁶. Por otra parte, es sabido que las isoformas del FGF (factor fibroblástico) producen menos efectos secundarios que las del VEGF (factor vascular endotelial)⁷.

Dados los pobres resultados obtenidos con los factores de crecimiento en humanos⁵⁻⁷, la segunda fase del estudio (fase clínica) se realizará empleando células progenitoras autólogas C133+⁸ en el ámbito de un Protocolo Europeo.

Conclusiones

Los resultados obtenidos entre los tres grupos, tanto en el estudio en conejos como en cerdos, refuerza la idea de que la isquemia "per se" aumenta la circula-

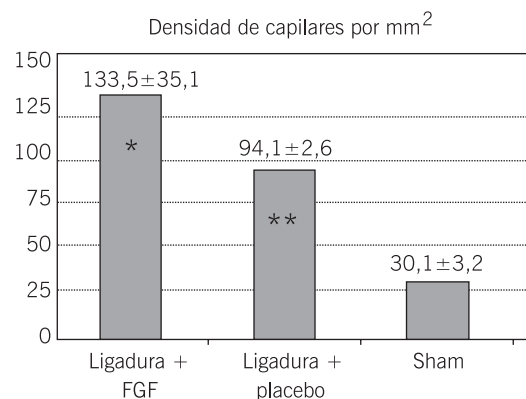


Figura 2. Desarrollo de circulación colateral en arteria coronaria de cerdo. Estudio experimental en el cerdo. Valor medio y desviación estándar de la densidad de capilares por mm² correspondiente a los Grupos Tratado (Ligadura mas FGF), Placebo (Ligadura mas placebo) y Sham (sin ligadura ni inyección). FGF: Factor de crecimiento fibroblástico. *Estadísticamente significativo (p<0,05) comparado con el Grupo Placebo. **Estadísticamente significativo (p<0,001) comparado con el Grupo Sham.

ción colateral. Este efecto se potencia cuando se añaden factores de crecimiento.

El empleo de factores de crecimiento no ha provocado efectos secundarios, probablemente al ser administrados en forma de proteína recombinante.

Bibliografía

1. Schaper V. Collateral circulation. Kluwer Academic Boston Publishers 1993.
2. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003;9:653-60.
3. Menasche P, Hagege A, Scorsin M, *et al.* Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001;357: 279-80.
4. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Nadal-Guinard B, *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-5.
5. Sakakibara Y, Tambara K, Sakaguchi G, *et al.* Toward surgical angiogenesis using slow-released basic fibroblast grow factor. *Eur J Cardio-thoracic Surg* 2003; 24:105-12.
6. Isner JM. Vascular endotelial grow factor in ischemia for vascular angiogenesis (VIVA). *Clin Cardiol* 1999;22:369-72.
7. Simons M, Anex BH, Laham RJ, *et al.* FGF Initiating Revascularitation Trial (FIRST). *Circulation* 2002;105: 788-93.
8. Quirici N, Soligo D, Caneva L, *et al.* Differentiation and expansion of endotelial cells from human bone marrow CD133+ cells. *Br J Haematol* 2001;115: 186-94.