

## Medicina del futuro

# Proliferación vascular inducida por genes

Alejandra R. Bosque Gómez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

El objetivo de la terapéutica genética es alterar, para prevenir o tratar una enfermedad congénita o adquirida, el programa genético de las células. Básicamente es una técnica que logra introducir en células blanco, genes transformados artificialmente en el laboratorio. Cualquier aplicación de la terapéutica genómica requiere primero identificar el gen de interés; después, unirlo a un vector para introducirlo en la célula blanco. El nuevo gen se transcribe en ácido ribonucleico mensajero (mRNA) y es trasladado a una nueva proteína mediante enzimas del huésped, culminando con la expresión de los productos del gen introducido.

Los genes transformados pueden transferirse al huésped en dos formas: *in vivo*, cuando se obtienen células del huésped, se desarrollan en un cultivo celular y, después de un periodo de incubación, se introducen nuevamente al huésped por inyección o infusión. Este método es atractivo por su rapidez y sencillez relativa pero no permite manipular la regulación de la expresión del gen. *In vitro*, cuando mediante vectores virales y no virales se supera la resistencia natural de las células al DNA extraño. Los vectores virales utilizados con mayor frecuencia incluyen retrovirus, adenovirus y herpesvirus. Los vectores virales se manipulan para que su replicación en la célula huésped sea defectuosa ya que pueden ser peligrosos para el huésped si no se controla su reproducción. A pesar de la construcción cuidadosa de vectores virales, se desconoce la seguridad de su uso a largo plazo. En un estudio, en que se introdujeron vectores retrovirales en células madre hematopoyéticas de primates, se observó la generación de virus de tipo natural que produjo linfoma.<sup>1</sup> El interés en evitar las complicaciones infecciosas de los sistemas vector viral ha estimulado el estudio de otros métodos para transportar los genes transformados. Algunas técnicas innovadoras incluyen la siembra directa de genes sobre arterias coronarias, arterias periféricas, prótesis stents, y músculo cardíaco.

### Citoquinas angiogénicas

En la actualidad, diversos modelos experimentales han evidenciado los beneficios de manipular genéticamente la proliferación celular vascular (angiogénesis); es más, algunos ensayos clínicos en pacientes con enfermedad coronaria y enfermedad vascular periférica ya se realizan en este sentido.<sup>2</sup>

Hace poco más de una década, se identificaron una serie de factores de crecimiento, denominados en conjunto citoquinas angiogénicas directas, demostraron ser responsables de la angiogénesis. A continuación las enumeraremos junto con algunas de sus características individuales más sobresalientes.

### Factor de crecimiento de fibroblástico (FGF)

El factor de crecimiento de fibroblástico ácido (aFGF o FGF-1) y FGF básico (bFGF, o FGF-2) son polipéptidos homólogos estructuralmente de 18 kilodaltones (kd) que actúan como mitogénicos potentes para las células endoteliales y las de músculo liso. Estos factores tienen propiedades biológicas importantes como las siguientes: tienen una gran afinidad por la heparina y el sulfato de heparán; una fuente de bFGF endógeno son las células o la matriz extracelular dañadas por una lesión. La angioplastia de la arteria carótida en la rata origina hiperplasia de la capa muscular lisa así como engrosamiento de la íntima; en este modelo experimental bFGF es mitógeno porque la administración de anticuerpos en su contra disminuye la proliferación celular hasta un 80%.<sup>4</sup>

### Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

El VEGF (también conocido como factor de permeabilidad vascular VPF, y vasculotropina VAS) es una proteína dimerica de 46 kd, mitogénica específica para células endoteliales.<sup>5</sup> Tiene homología en un 20% de su estructura con otro factor de crecimiento (el factor de crecimiento derivado de las plaquetas o PDGF).

Cuatro especies homodiméricas de VEGF han sido identificadas; cada monómero posee 121, 165, 189 y 206 aminoácidos respectivamente, siendo su actividad similar pero diferentes sus perfiles de secreción. VEGF<sub>121</sub> es un polipéptido débilmente ácido que no se une a la heparina. Las capacidades de unión a la heparina de las restantes tres isoformas aumentan progresivamente de acuerdo a su enriquecimiento con residuos básicos. VEGF<sub>165</sub> es la forma que secretan de manera predominante células normales y transformadas, se trata de una glucoproteína básica con un punto isoelectrico de 8.5; mientras es producida, una porción significativa de la misma, permanece unida a la superficie celular o matriz extracelular

(ECM). VEGF<sub>189</sub> es una isoforma que no se secreta libremente. Una isoforma rara VEGF<sub>206</sub> ha sido identificada solamente en el hígado fetal humano.

Houck y colaboradores<sup>6</sup> han propuesto que las distintas isoformas de VEGF, son resultado de activar la cascada proteolítica del plasminógeno (un paso clave durante la angiogénesis), de esta manera se liberaría siempre un VEGF<sub>121</sub> soluble, mediador final común de la angiogénesis *in vivo*.

Además de VEGF, han sido purificadas dos proteínas adicionales que abundan en el corazón y en el músculo esquelético, VEGF-2 o VEGF-C, y VEGF-3 o VEGF-B, han sido purificadas. En contraste con la amplia distribución de estas proteínas, un cuarto miembro de la familia VEGF, ha sido identificado: el factor de crecimiento placentario (PIGF), parece estar restringido a la placenta y ciertas especies tumorales.

VEGF se une a receptores de alta afinidad, expresados en células endoteliales. Hasta la fecha, se han clonado tres receptores de VEGF homólogos estructuralmente: Flt-1, Flk-1 (receptor equivalente murino), y Flt-4. El Flk-1 es el principal receptor para VEGF<sub>121</sub> y se expresa en angioblastos. Experimentalmente no es de sorprender que en ratones transgénicos con deficiencia adquirida para Flk-1, la muerte se produzca in útero de 8.5 a 9.5 días después de la gestación, con ausencia de islotes sanguíneos y de vasos sanguíneos organizados. Los ratones con carencia de uno o dos alelos para VEGF mueren in útero entre los días 10.5 y 12 de la gestación, y en estos casos se observan aortas hipoplásicas, apoptosis de los vasos sanguíneos y desorganización de las células neuroepiteliales.<sup>7</sup>

El receptor Flt-1 es el segundo más afín para VEGF. En otro experimento los embriones de ratón homocigotos para una mutación blanco creada en el locus de Flt-1 conservaron la capacidad para formar células endoteliales totalmente diferenciadas pero éstas se agruparon anormalmente con la consecuente muerte del producto.<sup>8</sup> Lo anterior permitió suponer que la cascada de señales que inicia en el embrión Flt-1 regula las interacciones célula endotelial-célula endotelial-matriz extracelular.

VEGF-1/VEGF-A es un ligando de alta afinidad para los receptores Flt-1 y Flk-1, por su parte VEGF-2/VEGF-C se une con gran especificidad a Flt-4, así como a Flk-1 pero no Flt-1. El factor de crecimiento placentario ha demostrado alta afinidad para Flt-1 y Flt-4. El receptor para VEGF-3/VEGF-B aún no ha sido caracterizado.

Tie-1 y Tie-2 son miembros de una segunda familia de receptores tirosin kinasa, altamente específicos para células endoteliales. En experimentos los embriones de ratón que carecían de Tie-1 no lograban establecer la integridad estructural del vaso sanguíneo en formación, por lo que se observaba extravasación de los eritrocitos y muerte del producto inmediatamente después del nacimiento con graves hemorragias.<sup>9</sup> Los embriones homocigotos para una mutación de Tie-2 morían de manera temprana (a los 10.5 días de gestación intrauterina) con dilatación de los lechos vasculares y falta de dife-

renciación de arterias y vénulas, esto permitió concluir que en estos casos la vasculogénesis no se alteraba pero en cambio sí, la angiogénesis. El análisis del desarrollo embrionario, el ciclo reproductor femenino, y el crecimiento de tumores sugiere que VEGF sólo se expresa durante los periodos de angiogénesis activa, por lo que pudiera ser que VEGF funciona como un factor paracrino puro.

Si sabemos que la vida media de VEGF es de menos de tres minutos, resalta la importancia de la vía autocrina que proporciona un suplemento endógeno de VEGF para conseguir (en varios días) el desarrollo de la circulación colateral después de una pequeña administración en bolo de este factor.<sup>10</sup>

Para comprender mejor los mecanismos por los cuales VEGF modula la biología de las células endoteliales, Isner y colaboradores<sup>11</sup> al aplicar VEGF a segmentos arteriales con endotelio intacto comprobaron que de acuerdo a dosis-respuesta se producía y/o liberaba óxido nítrico. Este mismo grupo, también logró demostrar que los suplementos dietéticos de L-arginina aumentaban la angiogénesis durante la isquemia experimental, lo que favorece la hipótesis de que el óxido nítrico actúa como un promotor de la angiogénesis *in vivo* a través de la acción de VEGF.

### Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)

El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) es un factor de crecimiento dimérico, que contiene dos subunidades homólogas distintas, 17kd-PDGF A y 14kd-PDGF B. Existen tres formas de PDGF: PDGF AB heterodimérica y PDGF AA y BB homodiméricas. El receptor PDGF, un receptor de cinasa de tirosina de alta afinidad de 170 a 180 kd, está constituido por dos subunidades: una cadena alfa (que une cadenas PDGF A o B) y una cadena beta (que une sólo cadenas PDGF B). Por ello, PDGF A sólo se une al receptor alfa-alfa, PDGF AB al receptor alfa-alfa o alfa-beta y, por último, PDGF BB a los receptores alfa-alfa, alfa-beta o beta-beta.

PDGF BB, actúa como un factor quimiotáctico y mitógeno potente para células de músculo liso *in vitro*. Numerosos factores estimulan al gen de PDGF: la trombina, angiotensina II, las lipoproteínas de baja densidad oxidadas y la interleucina 1 (IL-1).

### Angiogénesis entre vasos sanguíneos: Vasa vasorum

Vasa vasorum, se denomina así a un grupo de vasos sanguíneos confinados en la capa adventicia, de tamaño variable que se encuentran en todo el territorio vascular. Se les considera la reserva angiogénica posnatal y últimamente se ha estudiado su contribución en la disfunción endotelial.

En piezas ateroscleróticas humanas obtenidas durante atrectomía direccional,<sup>12</sup> así como en estudios experimentales se ha documentado la mayor extensión de vasa vasorum que

típicamente acompaña al crecimiento de la placa. Esta evidencia ha sugerido que la disfunción endotelial ocasionada con la angioplastia estimula también la proliferación de este grupo de vasos. Los experimentos de Sheiki y colaboradores permitió identificar que hipoxia e hipoglucemia son elementos responsables de estimular la microangiogénesis en tejidos hipoperfundidos. Las lesiones de reestenosis pudieran considerarse como regiones relativamente poco perfundidas, con lo que se promueve la microangiogénesis y la secreción local de VEGF y bFGF. Además dada la asociación de mayores tasas de reestenosis posangioplastia en diabéticos, permitiría considerar que las células de la neointima y/o de la capa media, relativamente escasas en glucosas, adquieren la capacidad de elaborar citoquinas angiogénicas cuya combinación facilitaría el crecimiento progresivo de la placa.

Lo anterior, ha dado lugar a considerar novedosas estrategias terapéuticas para la aterosclerosis y la reestenosis posangioplastia. Con relación a la primera, existen al menos dos potenciales aplicaciones que considerar. Una podría ser la disminución (o incluso, la regresión) de la placa al inhibir selectivamente la microangiogénesis a nivel de vasa vasorum. La segunda consideración terapéutica sería la estabilización aguda de la denominada lesión vulnerable, puesto que la ruptura de vasa vasorum ha sido propuesta como el mecanismo patológico que subyace a la ruptura de la placa.<sup>13</sup>

### Angiogénesis terapéutica

La transferencia arterial génica es una alternativa terapéutica en pacientes con insuficiencia arterial periférica o enfermedad vascular coronaria. En el caso de VEGF es una estrategia muy adecuada, ya que esta citoquina es secretada naturalmente por las células sanas. Los estudios de Isner y colaboradores,<sup>14</sup> demostraron que la transferencia génica arterial de DNA que codifica para VEGF supera los resultados biológicos que se obtienen con vectores virales. En este sentido sus estudios preclínicos se orientaron a establecer la facilidad con la que se transportaba un gen específico de VEGF liberándolo percutáneamente a la arteria ilíaca de conejos en los que había escindido previamente la arteria femoral para ocasionarles una isquemia selectiva. La administración exitosa específica de VEGF<sub>165</sub> se confirmó usando la reacción en cadena de polimerasa en unión con transcriptasa reversa (RT-PCR), y posteriormente secuenciando el producto RT-PCR. Así se documentó un aumento en el desarrollo de la circulación colateral mediante angiogramas seriados y una disminución del déficit vascular en la extremidad isquémica. Hallazgos similares se observaron utilizando VEGF<sub>121</sub> y VEGF<sub>189</sub>.

La relevancia de sus resultados permitió establecer un diseño dosis-respuesta en humanos; se inició con una dosis de 100 µg de VEGF. Los tres pacientes elegidos tenían claudicación intermitente, y tras un año de seguimiento demostraron

mejoría en sus síntomas, y angiográficamente la evidencia de formación neo-vascular era evidente.<sup>15</sup> Posteriormente, realizaron la transferencia de gen intramuscular en pacientes con insuficiencia arterial periférica, que resultó en mejoría hemodinámica considerable de la extremidad afectada y en muchos casos una curación genuina de la misma. La reproducibilidad de estos hallazgos está supeditada a la extensión natural de receptores VEGF que posea de manera individual cada paciente.

Por su parte, Saymes y colaboradores, iniciaron la fase I de un estudio clínico utilizando VEGF<sub>165</sub>; se han reclutado 20 pacientes, todos ellos con angina refractaria a tratamiento médico, clase III y IV según la Sociedad Cardiovascular Canadiense; estos pacientes con enfermedad multivascular coronaria avanzada ya no eran candidatos a procedimientos intervencionistas o quirúrgicos. Se excluyeron del estudio los pacientes con neoplasias, retinopatía diabética, o una fracción de eyección menor de 20%. En un seguimiento a 180 días, mejoró la función, el 70% de los pacientes no tenían ya angina, y se redujo de manera notable la necesidad de utilizar nitratos orales a partir del día 30 pos-inyección de VEGF.

El entusiasmo que ha generado la angiogénesis como una herramienta terapéutica útil ha sido considerable, sin embargo, todavía quedan muchas interrogantes. Por ejemplo, aún no se sabe cuánta estabilidad tendrá una intervención génica, en términos de la permanencia de sus efectos benéficos a largo plazo. No se conoce con exactitud cuánto persisten los vasos recién formados después de que el estímulo exógeno artificial que los generó termina. En este contexto, elementos como remodelación vascular, regresión vascular y competición de flujo necesitarán ser considerados. En el caso de que los vasos recién formados tuvieran una vida media limitada, los trabajos experimentales deberán en lo futuro investigar si la exposición adicional a los factores de crecimiento sería útil para conservar la funcionalidad de los elementos recién adquiridos. El desarrollo de esta nueva biotecnología significa de cualquier manera un beneficio potencial terapéutico que, de convertirse en una realidad práctica, cambiará la historia natural de muchas enfermedades isquémicas, así como el pensamiento clínico médico por una visión más molecular.

### Referencias

1. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis *J Biol. Chem* 1992; 267: 10931-10934.
2. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-30.
3. Selke FW, Jianyi L, Stamler A. Angiogenesis induced by acidic fibroblast growth factor as an alternative method of revascularization for chronic myocardial ischemia. *Surgery* 1996; 120: 182-188.
4. Nabel EG, Yang ZY, Plautz G. Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries *in vivo*. *Nature* 1993; 362: 844-846.

5. Asahara T, Bauters C, Zheng LP. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis *in vivo*. *Circulation* 1995; 92: II-365 II-371.
6. Houck KA, Leung DW, Rowland AM. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992; 267:26031-26037.
7. Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA. Flk-1 and flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 1993; 118: 489-498.
8. Sato TN, Qin Y, Kozak CA, Audus KL. Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9355-9358.
9. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995; 376: 70-74.
10. Bauters C, Asahara T, Zheng LP. Recovery of disturbed endothelium dependent flow in the collateral-perfused rabbit ischemic hindlimb after administration of vascular endothelial growth factor. *Circulation* 1995; 91: 2802-2809.
11. Isner JM, Walsh K, Symes J. Arterial genes transfer for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Human Gene Ther* 1996; 4: 749-758.
12. Williams JK, Heistad DD. Structure and function of vasa vasorum. *Trends Cardiovasc Med* 1996; 6: 53-57.
13. O'Brien ER, Garvin MR, Dev R. Angiogenesis in humans coronary atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1994; 145: 883-894.
14. Tabata H, Silver M, Isner JM. Arterial gene transfer of acidic fibroblast growth factor for therapeutic angiogenesis *in vivo*: critical role of secretion signal in use of naked DNA. *Cardiovasc Res* 1997; 164: 289-299.
15. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R. Clinical evidence of angiogenesis following arterial gene transfer of ph VEGF165. *Lancet* 1996; 348: 370-374.

## Noticias destacadas de la Facultad de Medicina, UNAM

### Octubre

Destacados investigadores de la Facultad de Medicina y de otras instituciones de la Universidad Nacional Autónoma de México recibieron un reconocimiento del Institute for Scientific Information (ISI), por los artículos más citados de 1990 a 1999. En esta ceremonia se nombraron 35 trabajos de casi 20 disciplinas, así como a más de cien investigadores que tuvieron 50 o más citas, entre los que destacaron los doctores Alejandro Cravioto, Carlos Eslava, Fernando Ortiz Monasterio, Ignacio Madrazo, Donato Alarcón Segovia, Julio Sotelo, entre otros investigadores de la FM.

Durante una gira académica por el estado de Guerrero, Juan Ramón de la Fuente, rector de la UNAM, acompañado por el doctor Alejandro Cravioto, director de la FM, inauguró un Centro de Cómputo donado al Hospital General de Acapulco.

El 10 de octubre se clausuró el primer Diplomado en Medicina Legal y Forense, que tuvo como objetivo capacitar y actualizar los conocimientos de los peritos, con base en investigaciones en las ciencias forenses que realizan diversos países.

Por primera vez en la Facultad de Medicina se lleva a cabo el **Coloquio Anual de Estudios de Género de la UNAM**, organizado por el Programa Universitario de Estudios de Género (PUEG), este IX Coloquio se complementó con la exposición de pintura, grabado y fotografía titulada: *El cuerpo y sus desvelos*.

Por iniciativa de la Secretaría General de la FM, se realizaron ocho visitas guiadas de estudiantes que están a punto de concluir el bachillerato, a las instalaciones de esta institución educativa, y además están interesados en estudiar la carrera de médico cirujano.

### Noviembre

El pasado 23 de octubre, el doctor Ramón de la Fuente Muñiz, profesor emérito de la FM, fue galardonado con el reconocimiento

al Mérito Médico 2000, entregado por el Presidente de la República, Ernesto Zedillo. En esta ceremonia y por primera ocasión, 43 médicos -35 de ellos realizaron estudios en la FM-, recibieron la Medalla a la Excelencia Médica por haber destacado en cada una de las especialidades en las que se desempeñan. Se entregó también un reconocimiento a los pioneros de los trasplantes en México en las áreas de corazón, de hígado, de médula ósea, de páncreas, de pulmón y de riñón. Entre ellos destacan quienes se han desempeñado dentro de la máxima casa de estudios los doctores Ruy Pérez Tamayo, Fernando Ortiz Monasterio, José Laguna García, Clemente Robles Castillo, Manuel Quijano Narezo, Magin Puig Solanés, Donato Alarcón Segovia, Guillermo Santín García e Ignacio Chávez Rivera entre otras personalidades.

Utilizando la más reciente tecnología Multimedia e Internet, la FM presentó concluido el proyecto titulado *Hospital Virtual de la Facultad de Medicina de la UNAM*, que consiste en un sistema interactivo orientado a una audiencia global con acceso a grandes bancos de información.

Se otorga el **Premio Lola e Igo Flisser-PUIS** por primera ocasión a una investigadora del estado de Sinaloa, quien realizó estudios de posgrado en la FM, la doctora Sylvia Paz Díaz Camacho; así como mención honorífica a otro científico de Yucatán, el doctor Manuel Chan Bacab.

El doctor Jaime Davidson, presidente de la Asociación de Médicos Egresados de la UNAM radicados en el Extranjero (AMEE-UNAM), visitó la Facultad de Medicina para entregar al doctor Alejandro Cravioto, un donativo de 10 mil dólares, cantidad que será destinada para reconstruir algunas aulas del área de Anatomía de esa Facultad.

Se realizó por primera vez en el Antiguo Palacio de Medicina el **VI Congreso Nacional de Historia y Filosofía de la Medicina**, organizado por la *Asociación de Historia y Filosofía de la Medicina* que tiene estrechas relaciones con el Departamento de Historia y Filosofía de la Medicina, FM, UNAM, donde se reunieron expertos que reflexionaron acerca de los avances que se han logrado en los últimos tiempos en la medicina, la filosofía y la antropología, entre otros.