



Archivos de Cardiología de México

www.elsevier.com.mx



REVISIÓN DE TEMAS CARDIOLÓGICOS

Terapia génica en la insuficiencia cardiaca

José Luis Reyes-Juárez,¹ Ángel Zarain-Herzberg^{1*}

¹ Facultad de Medicina, Depto. de Bioquímica. Universidad Nacional Autónoma de México.

Recibido el 28 de de enero de 2008; aceptado el 19 de enero de 2009.

PALABRAS CLAVE

Terapia génica;
Insuficiencia cardiaca;
Adenovirus;
Virus adeno-asociado;
México

KEY WORDS

Gene therapy;
Heart failure; Adenovirus;
Adeno-associated virus;
Mexico

Resumen

La terapia génica como estrategia de tratamiento para la insuficiencia cardiaca es un área en la que en los últimos 10 años la investigación se ha incrementado importantemente; es una de las de mayor promesa para obtener una terapia exitosa para la insuficiencia cardiaca, pues ofrece la posibilidad de corregir los defectos básicos de la enfermedad a escala celular. Uno de los primeros pasos a considerar en el uso de esta terapia es la forma de administrar el material genético; los vectores que han mostrado mayor utilidad en el miocardio son los adenovirus y los virus adeno-asociados; la administración local ha demostrado ser superior a la administración periférica. Se han identificado distintos mecanismos fisiopatológicos, susceptibles de ser modificados por terapia génica, entre los que se encuentran la regulación de los flujos de Ca^{2+} durante el proceso del acoplamiento excitación-contracción, alteraciones en la señalización intracelular y en el sistema adrenérgico, el desarrollo de apoptosis, y la angiogénesis. En la actualidad ya existen datos de ensayos clínicos en humanos empleando algunas de estas estrategias. El objeto de la presente revisión es hacer un recuento de los datos existentes en la literatura, así como de las perspectivas a futuro.

Gene therapy for heart failure

Abstract

Gene therapy as a therapeutic strategy for Heart Failure, is an area that within the last 10 years has experienced an important increase in research, becoming one of the most promising areas to obtain a successful therapy for heart failure due to the possibility of correcting the basic defects observed at the cellular level in this pathology. One of the first things to consider on the use of this therapy is the way to deliver the genetic material, Adenovirus, and Adeno-associated virus, have shown the best capabilities in the myocardium; the delivery by local means has shown best results when compared with peripheral administration. Multiple physiopathological mechanisms susceptible of modifying by gene therapy have been identified, including the regulation of Ca^{2+} fluxes during excitation-contraction coupling, altered intracellular signalling, and adrenergic system, blockade of apoptosis and angiogenesis. The objective of this review, is to made a recount about the status of the literature and analyze future perspectives for gene therapy.

*Autor para recibir correspondencia: Ángel Zarain-Herzberg. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina, Depto. de Bioquímica. Edificio D; 2^{do} Piso. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F. México. Teléfono: (5255) 5623-2258; FAX: (5255) 5616-2419. Correo electrónico: zarain@servidor.unam.mx

Introducción

A pesar de los avances en el manejo de factores de riesgo, la disponibilidad de terapias convencionales que incluyen tratamientos invasivos para la enfermedad coronaria, la enfermedad arterial periférica y una mejora en el pronóstico de la insuficiencia cardíaca (IC) las enfermedades cardiovasculares continúan siendo la principal causa de muerte en el mundo occidental.¹ La IC representa un gran desafío debido a que su mortalidad e incidencia continúan incrementándose; esto refleja en gran medida la ausencia de terapias enfocadas en los fundamentos moleculares de la patología, ya que a pesar de que la terapéutica ha mejorado en las últimas dos décadas, los tratamientos existentes no son ideales, debido a que no son suficientes para apoyar al miocardio e incrementar la función cardíaca global. Es por ello que se requiere de nuevas aproximaciones terapéuticas que estén dirigidas a los defectos moleculares de la disfunción ventricular.

La terapia génica (TG) puede ser definida como una transferencia de ácidos nucleicos a células somáticas de un individuo resultando en un efecto terapéutico.² Entre las ventajas de la terapia génica sobre las modalidades de tratamiento actuales se encuentran: el tratamiento selectivo de los tejidos afectados, la posibilidad de emplear localmente proteínas endógenas en casos en los que su aplicación sistémica incurriría en efectos secundarios graves, y la posibilidad de efectos terapéuticos a largo plazo tras una sola aplicación.³

En la última década se ha identificado un gran número de mecanismos moleculares que constituyen la base molecular de la insuficiencia cardíaca.⁴ De igual manera la posibilidad de realizar transferencia de material genómico *in vivo*, ha hecho posible explorar esta metodología como una opción para corregir los defectos presentes en la IC, bajo la premisa de ser una terapéutica capaz de corregir los defectos fundamentales en la IC.

Entre los defectos moleculares observados durante la IC, y que han sido explorados como blancos terapéuticos, se encuentran las alteraciones en el manejo de Ca^{2+} , durante el proceso del acoplamiento excitación-contracción,⁵⁻¹⁶ alteraciones en los receptores beta-adrenérgicos y en su acoplamiento a proteínas G,¹⁷⁻²¹ alteraciones de la señalización celular, incluyendo a la familia de la proteína cinasa C (PKC),²² y a la producción de segundos mensajeros por la enzima adenilato ciclasa.²³ La apoptosis de miocitos cardíacos también ha sido señalada y estudiada.^{24,25} Por último, el uso de factores angiogénicos, también se ha analizado como una opción en pacientes con IC secundaria a cardiopatía isquémica.³

A pesar de que el tratamiento por transferencia de material genético aún presenta múltiples dificultades, en la actualidad ya se han realizado pequeños ensayos clínicos, aplicando factores angiogénicos en cardiopatía isquémica.²⁶⁻²⁸ Con relación a otros mecanismos moleculares de la IC, varios de ellos se encuentran en fases muy cercanas a ensayos clínicos. El potencial que tiene esta nueva opción terapéutica, aunado a lo novedoso de su mecanismo de acción, hace imperativo que se conozcan sus ventajas y desventajas para poder aprovechar esta opción terapéutica emergente. El objetivo de esta revisión es examinar el estado actual de la investigación sobre el

uso de la terapia génica para la insuficiencia cardíaca, incluyendo a los vectores y métodos de aplicación y los blancos terapéuticos explorados en la actualidad.

Vectores y vías de administración

Los ensayos iniciales para transferir material genético al corazón empleaban fundamentalmente ADN plasmídico, por su fácil producción y seguridad. A pesar de que los primeros estudios mostraban resultados positivos^{29,30} en ensayos aleatorizados de mayor tamaño, donde se transfirieron genes codificantes para el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés) y otros factores angiogénicos, mostraron que no era una técnica útil debido a su muy baja eficiencia.²⁷ El uso de liposomas y de polímeros catiónicos, útiles en transferencia de material genético en cultivos celulares, no incrementa la eficiencia de la transferencia.^{31,32} Uno de los mayores problemas con el uso de ADN plasmídico es la falta de respuesta ante el incremento de la dosis.³³ El uso de este vector se considera relativamente seguro, pero se ha demostrado en modelos animales que puede producir fiebre, inflamación e infartos en el tejido muscular esquelético y en el miocardio.²⁶ Debido a estos factores, los vectores virales son una mejor opción para la terapia génica cardíaca (Tabla 1).

Entre los vectores virales, inicialmente se emplearon los retrovirus, debido a la poca respuesta inmune que generan y a la posibilidad de una expresión sostenida a largo plazo (años); sin embargo, los retrovirus tienen como desventajas una baja eficiencia de infección, un tropismo cardíaco limitado -ya que infecta principalmente células en división-, además de que se han mencionado preocupaciones en su seguridad, a causa del potencial oncogénico.³¹ Por ello, es un vector en el que el interés ha disminuido. Recientemente se han empleado lentivirus, principalmente para transferir material genético a células de la pared vascular, debido a que han demostrado una alta eficiencia en el músculo liso y provocan una respuesta inmune mínima; sin embargo, el tropismo por el miocardio es limitado y su producción en grandes cantidades es difícil, por lo que actualmente se requiere de una ingeniería de este vector para mejorar su utilidad, facilitando su producción a gran escala.³⁴ Los oligonucleótidos antisentido, o señuelo, fueron mencionados como opciones hace más de 10 años, pero su mínima eficacia *in vivo*, los descarta de alguna aplicación clínica.³⁵ Los sendaivirus y herpesvirus han sido mencionados como posibles vectores, pero a la fecha no existen datos suficientes sobre su utilidad.³⁸

Actualmente los adenovirus (Ad), y los virus adenoasociados (AAV), son los vectores más estudiados en la TG cardiovascular, ya que ambos han demostrado una gran eficacia en el tejido cardíaco, la pared vascular y el hígado.³² Los Ad de primera generación tienen una expresión inicial muy alta, alcanzando su efecto máximo en los primeros días tras la transferencia de material, pero disminuyen su expresión a las dos semanas aproximadamente.^{33,37,38} Por lo tanto, parecen tener utilidad cuando se requiere una expresión alta por poco tiempo como en la angiogénesis terapéutica para las heridas. La administración repetida de Ad para TG no es útil en mamíferos

Tabla 1 Vectores usados en la terapia génica cardíaca

Vector	Ventajas	Desventajas	Referencias
ADN plasmídico desnudo	Fácil producción. Seguro	Baja eficiencia de transducción Expresión temporal	29,30
Adenovirus	Alta eficiencia de transducción Fácil producción de títulos altos Transducción en células quiescentes Tamaño del transgen relativamente alto Tropismo por múltiples tipos celulares	Respuesta inflamatoria a dosis altas Expresión temporal	32, 33, 37, 38, 39
Virus Adeno-asociado (AAV-1, 2, 5, 6, 8, 9)	Expresión de transgen a largo plazo Respuesta inmune moderada Transducción en células quiescentes Alto tropismo por músculo esquelético (AAV-1, -6) y cardíaco (AAV-8, -9) Los serotipos nativos no causan enfermedad en el humano	Tamaño del transgen limitado Dificultad para producir a gran escala	40-42
Retrovirus	Expresión a largo plazo Poca respuesta inmune	Baja eficiencia de transducción Integración no específica al genoma Tropismo limitado Transduce sólo a células en división	31
Oligonucleótidos antisentido	Fácil producción	Eficacia <i>in vivo</i> limitada Requiere alta eficiencia de transferencia.	35

grandes, debido a que evoca una respuesta inmune importante. Los Ad en dosis pequeñas producen una respuesta inflamatoria mínima en el miocardio. Los Ad de segunda y tercera generación causan una menor respuesta inmune y parecen tener una expresión más prolongada, pero su utilidad en TG en humanos aún es desconocida.³⁸ La seguridad de los Ad ha indicado ser muy alta en ensayos clínicos; la fiebre es su complicación más importante.

Los AAV poseen un número de cualidades que los hace potencialmente útiles para TG cardíaca, debido a que tienen un tropismo natural hacia el músculo liso vascular, músculo esquelético y el miocardio.⁴⁰ Son capaces de expresar genes en células quiescentes, y por un largo periodo de tiempo, a pesar de que la expresión máxima se alcanza en días.⁴¹ Como no producen enfermedades en el humano, la respuesta inflamatoria que generan es mínima; los AAV nativos son capaces de integrarse al genoma humano, pero los vectores AAV modificados no pueden, y mantienen su expresión a largo plazo por medio de asociaciones episómicas con el ADN genómico. La ventaja de esta forma de asociación es que se elimina el riesgo de inserciones mutagénicas y oncogénicas, que se encuentran con otros vectores de expresión a largo plazo, como los retrovirus.⁴²

Vías de administración

La transferencia de material genético al corazón puede lograrse por tres vías: transferencia intravascular, transferencia *ex vivo* y por inyección intraórgano.

Transferencia intravascular

Para la transferencia intravascular se han desarrollado distintos sistemas por catéter para mejorar la penetración

de vectores a través de la íntima. Sin embargo, la transferencia en lesiones con calcificaciones, depósitos de colesterol, infiltrados e inflamación continúa siendo un gran desafío.⁴³ El uso de *stents* porosos, por los cuales puedan ser eluidos los vectores con genes terapéuticos, ha sido propuesto como una opción para mejorar la transferencia, pero no hay suficientes datos para determinar su utilidad hasta este momento.^{44,45} La vía de administración ideal para TG es un vector intravenoso, pero la cantidad requerida de virus para lograr una expresión adecuada en mamíferos grandes es probablemente muy alta como para considerarla segura.

Transferencia *ex vivo*

La administración *ex vivo* es una combinación de la terapia celular, incluyendo a las células madre y la terapia génica. Consiste en la administración del vector *in vitro* a células madre aisladas de la médula ósea, o cultivos de mioblastos esqueléticos, con el objeto de transferir posteriormente a las células con los transgenes al organismo del paciente.⁴⁶⁻⁵⁴ Esta forma de administración ha sido estudiada principalmente en la expresión de factores angiogénicos y citocinas.^{46,54,55} Entre las ventajas de esta forma de administración está la posibilidad de usar métodos más eficientes para la transferencia de material genético, como lípidos catiónicos o electroporación, que no son posibles de emplear *in vivo*, y que, además, la localización de las células modificadas en el corazón tengan una expresión localizada, continua y con niveles constantes, sin efectos sistémicos.^{48,51,52} Los cardiomiocitos son, por naturaleza, resistentes a la transferencia de material genético, y esta forma de administración evita esta complicación. La administración *ex vivo*, tiene el potencial de convertirse en una herramienta de gran utilidad, pero

Tabla 2 Mecanismos fisiopatológicos susceptibles de ser modificados por terapia génica

Mecanismo fisiopatológico	Objetivo	Blanco terapéutico	Referencias
Regulación de Ca^{2+} durante el acoplamiento excitación-contracción	Mejorar la recaptura de Ca^{2+} por el RS	Sobre-expresión de S100A1 Sobre-expresión de SERCA2a Expresión de dominante negativa de PLN. Inhibición de PP1.	6, 9, 10 15, 70 11, 13 72
Isquemia miocárdica	Aumentar la velocidad de relajación Inducción de angiogénesis en el miocardio	Sobre-expresión de parvalbúmina Expresión de VEGF, FGF, HGF, MCP-1, GM-CSF	14, 16 26-28, 35, 75, 76
Desensibilización de receptores β -adrenérgicos	Mejorar la respuesta a agonistas β -adrenérgicos	Sobre-expresión de inhibidores de β ARK1	17-21
Alteraciones en la señalización intracelular	Aumentar niveles de AMPc en el miocardio Disminución de los niveles de PKC α	Sobre-expresión de la adenilato ciclasa VI Expresión de dominante negativa de PKC α en el miocardio	23 22
Apoptosis	Prevención de la apoptosis posinfarto	Sobre-expresión de Bcl-2 en el miocardio Sobre-expresión de p38	24 25

Abreviaturas: RS, Reticulo Sarcoplásmico; SERCA2a, ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico de corazón; PLN, Fosfolamban; PP1, Fosfatasa-1; VEGF, Factor de crecimiento vascular endotelial; FGF, Factor de crecimiento fibroblástico; HGF, Factor de crecimiento Hepático; MCP-1, Proteína quimiotáctica de monocitos-1; GM-CSF, Factor estimulador de crecimiento de granulocitos macrófagos; β ARK1, cinasa asociada a receptores adrenérgicos-1; AMPc, Adenosin monofosfato cíclico; PKC α , Proteína Cinasa C- α .

en la actualidad depende de la investigación en células madre y su diferenciación al fenotipo cardíaco, para poder ser explorada ampliamente y conocer sus alcances y limitaciones. Uno de los mayores problemas con esta vía de administración es la localización de las células al ser transferidas al receptor. La inyección intramuscular de células transducidas *ex vivo* para expresar el gen de interés ha sido mencionada, pero la poca distribución de las células transferidas ha dificultado su uso.^{56,57}

Transferencia intraórgano

La administración por inyección intramiocárdica se considera actualmente la forma más eficiente para lograr la expresión deseada en el tejido cardíaco, pero se ha mencionado que la administración de un volumen alto para lograr una expresión se puede asociar con lesión local y alteraciones en la estructura de la pared.^{27,33,58} Distintos estudios han demostrado que la ruta intraarterial es poco efectiva a menos que se incremente la permeabilidad del endotelio, o se emplee un gradiente de alta presión; en estos casos un problema a considerar es la biodistribución aumentada y expresión ectópica del gen transferido.^{32,38,56} Las formas en las que se ha encontrado mayor efectividad para la transferencia consisten en perfusiones del miocardio, por métodos quirúrgicos. En modelos animales la técnica más empleada, consiste en ligar la aorta por 30 segundos, acompañada de una canulación de las arterias coronarias, perfundiendo de manera simultánea con una solución que contiene el vector de TG (generalmente Ad o AAV), y posteriormente se retira el pinzamiento aórtico; este método ha demostrado ser eficiente para lograr un buen grado de infección con el vector y en consecuencia de transferencia del gen de interés.^{59,60} En humanos se han explorado variaciones

de esta misma técnica con resultados promisorios. Un sistema recientemente descrito para la administración intraórgano, y que resulta de gran interés, es el sistema "V-focus", el cual consiste en el establecimiento de una circulación coronaria en paralelo, por medio de la cateterización del seno coronario, que se conecta a un sistema de bombeo extracorpóreo con oxigenador, y que se adiciona con una infusión de la solución con vectores virales, para ser administrada al corazón por medio de un catéter en la arteria coronaria izquierda.⁶¹ Este sistema ha sido probado en modelos animales con resultados satisfactorios, y tiene la ventaja de evitar los procedimientos quirúrgicos para administrar el vector, obteniendo resultados equiparables o superiores a los obtenidos con técnicas quirúrgicas.

Una opción para evitar la expresión ectópica del gen transferido es ponerlo bajo el control de un promotor cardíaco específico, como el del gen de calsecuestina cardíaca humana (*hCasq2*).⁶² Actualmente, en nuestro laboratorio estamos desarrollando vectores adenovirales que contienen el promotor del gen *hCasq2* y dirigen la expresión de la bomba de calcio SERCA2a de forma específica para los miocitos cardíacos (datos no publicados).

Blancos terapéuticos

Uno de los mayores atractivos de la TG como opción terapéutica lo constituye la posibilidad de corregir los defectos celulares básicos que se encuentran en la IC. En los últimos años el conocimiento de las bases de la IC ha avanzado de forma importante, por lo que hoy se conocen de forma detallada múltiples alteraciones presentes durante la IC (Tabla 2). Aunque no se cuenta con un modelo capaz de integrar las múltiples alteraciones descritas en la IC,⁶³ debido a las múltiples etiologías, los datos existentes permiten identificar blancos para TG.

Alteraciones en el manejo de calcio

Sin duda, el área de mayor interés en los mecanismos moleculares de la IC son las alteraciones en la regulación de las concentraciones de Ca^{2+} durante el proceso del acoplamiento excitación-contracción, las cuales han demostrado tener un papel crítico en la disminución de la capacidad contráctil del miocardio. Entre las alteraciones involucradas se encuentran cambios en los niveles de expresión de proteínas reguladoras y que actúan como sensores de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular.⁵

Entre las alteraciones descritas se incluye una disminución de los niveles de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA2a), con una baja consecuente de la recaptura de Ca^{2+} al retículo sarcoplásmico (RS) durante la diástole, derivando en una menor cantidad del ion disponible para ser liberado en la siguiente contracción.⁵ La disminución de los niveles funcionales de fosfolamban (PLN) fosforilado, un regulador de la actividad de la bomba de calcio SERCA2a, provoca que la actividad de ésta se encuentre disminuida durante la IC; esta disminución no se debe a una menor expresión de la proteína, sino a alteraciones en los reguladores de su fosforilación; en estos cambios se incluyen un aumento en los niveles de la familia de la proteína cinasa C, la cual fosforila al inhibidor de la fosfatasa-1 (PP1), activándola, lo que provoca una defosforilación de fosfolamban.¹² El canal de liberación de Ca^{2+} (receptor de rianodina, RyR), ha sido reportado en un estado inestable, debido a la disociación de la proteína calstabin, lo que provoca que la probabilidad de apertura del canal esté incrementada y se presenten liberaciones espontáneas de Ca^{2+} durante la diástole (fuga diastólica) que se asocian con arritmias ventriculares y de mayor relevancia con una disminución de la reserva de Ca^{2+} disponible para la contracción.^{4,63,64}

Los trabajos existentes se han enfocado en la corrección de estos defectos; los blancos más mencionados incluyen a la proteína reguladora S100A1, al aumento de la expresión de SERCA2a o bloqueo de la expresión de su regulador PLN y a la proteína reguladora parvalbúmina, para hacer más eficiente la relajación cardíaca. A continuación se detalla cada una de estas estrategias.

S100A1

Esta proteína une Ca^{2+} , el cual tiene un dominio de tipo "EF-hand". Es miembro de la familia de proteínas S100. Los miembros de esta familia están involucrados en varias funciones, a saber: la transducción de señales, el control del ciclo celular, interacciones con el citoesqueleto y diferenciación celular. La S100A1 es relevante para la función del músculo estriado, se expresa de forma abundante en el tejido muscular, particularmente en el músculo cardíaco, en donde colocaliza con el RS y los filamentos contráctiles. La expresión de S100A1 se ve afectada negativamente durante la IC secundaria a miocardiopatías.⁷⁻⁹

Se ha demostrado que la S100A1 tiene un papel positivo sobre el inotropismo y el lusitropismo. Sus efectos inotrópicos son debidos a la interacción con el RS y sus componentes, especialmente SERCA2a, incrementando su actividad, aumentando la recaptura de Ca^{2+} durante la relajación del miocardio, incrementando la cantidad de

Ca^{2+} disponible para liberar en la contracción, la cual está directamente relacionada con la fuerza de contracción. La S100A1 también interactúa con el RyR, estabilizándolo y disminuyendo la fuga diastólica.^{6,65} Estos datos indican que la S100A1 está involucrada en dos de los procesos moleculares de mayor importancia para la IC, a lo que se agrega el hecho de que su expresión disminuye en esta enfermedad; por ello, es un objetivo de gran valor para explorar.

Ensayos *in vitro* han demostrado que la sobre-expresión de S100A1 mejora la función contráctil de los cardiomiocitos por medio de los dos mecanismos antes referidos.^{6,10} En modelos animales de IC se ha demostrado que la sobre-expresión de S100A1 es suficiente para preservar la función miocárdica después de un infarto agudo, y para prevenir la aparición de IC. Ensayos más recientes, que han empleado vectores de adeno-asociados, han seguido estos modelos por periodos prolongados (20 semanas), donde se ha observado que la sobre-expresión de S100A1 mejora la función miocárdica de forma sostenida, y en un efecto independiente y sinérgico al del tratamiento con β -bloqueadores⁹, llegando a restituir la sensibilidad del miocardio a agonistas β -adrenérgicos, que habitualmente se encuentra muy disminuida. En estos modelos, la sobre-expresión es capaz de revertir el fenotipo de IC expresado por el miocardio, regresando después de dos meses al patrón de expresión normal del músculo cardíaco adulto, de forma similar a lo observado en pacientes con IC en espera de trasplante cardíaco, con dispositivo de asistencia ventricular izquierda, los cuales pueden llegar a ser destetados del dispositivo después de un periodo prolongado, con una mejoría significativa de la función cardíaca.⁶⁶⁻⁶⁸ Los datos disponibles, indican que la S100A1 es un importante blanco terapéutico que se encuentra cerca de llegar a una fase de experimentación clínica.

La ATPasa de Ca^{2+} y Fosfolamban

La SERCA2a tiene un papel fundamental en la función miocárdica normal, durante la relajación muscular, recapturando la mayoría (60%) del Ca^{2+} liberado del RS para la contracción, y recargando el RS, manteniendo una cantidad suficiente de Ca^{2+} para lograr una contracción óptima. Debido a este mismo papel, se encuentra en un punto central de las bases moleculares de la IC, en donde su expresión se encuentra regulada de forma negativa, disminuyendo la capacidad de recargar el RS después de cada contracción, y provocando una contracción deficiente por falta de calcio.⁵ En los últimos años la expresión de SERCA2a se convirtió en uno de los blancos farmacológicos más explorados en investigación básica y, en menor medida, clínica, sin que se obtuvieran resultados positivos.^{69,70} El uso de TG para sobre-expresar a SERCA2a tiene la ventaja de eliminar los efectos secundarios asociados al uso de fármacos para incrementar su expresión.⁷¹

De la misma manera que la inducción de la expresión de SERCA2a ha sido extensamente explorada por medios farmacológicos, la sobre-expresión por transferencia de material genético ha sido también analizada *in vitro* e *in vivo*. La sobre-expresión de SERCA2a mejora la función contráctil y el consumo de energía en modelos animales con IC, mejorando el grosor de la pared anterior y reduciendo las

arritmias ventriculares.¹⁵ Los ensayos de TG con la SERCA2a sólo han sido realizados con vectores adenovirales de primera generación, lo que no permite hacer un seguimiento a largo plazo para evaluar los efectos de la sobre-expresión; sin embargo, los datos obtenidos hasta la fecha, aunque son promisorios, requieren de profundizarse.

Estrechamente relacionado con la SERCA2a se encuentra PLN, un péptido de 52 aminoácidos, que tiene un papel como regulador de la función de SERCA2a, inhibiéndola en su estado nativo; se disocia de la bomba cuando es fosforilado por la proteína cinasa A (PKA), aumentando la velocidad de transporte de Ca^{2+} por la enzima. Durante la IC, la relación SERCA2a/PLN baja en gran medida por la disminución de SERCA2a, lo que provoca que disminuya su actividad y capacidad para recapturar el Ca^{2+} , liberado durante la contracción.¹²

La estrategia de TG más empleada que involucra al PLN consiste en la transferencia de un péptido que codifica para una mutante pseudo-fosforilada de PLN, la cual imita los cambios conformacionales inducidos por la fosforilación y desplaza a la forma nativa de PLN, incrementando la actividad de SERCA2a.¹¹ Los ensayos realizados en modelos animales han empleado vectores de AAV y seguido la evolución hasta por 6 meses posterior a la transferencia de genes. En los animales con IC tratados con TG con la mutante de PLN se observa una mejoría de la función cardíaca, deteniendo la progresión de la IC y acercando a niveles normales, corroborado por los valores hemodinámicos; de igual manera esta estrategia previene la remodelación de la pared cardíaca e incluso revierte los cambios observados en la IC, disminuyendo la fibrosis.¹³ Al igual que en el caso de la S100A1, el fenotipo fetal expresado durante la IC revierte al fenotipo adulto del corazón normal, mejorando su metabolismo.

Otra estrategia que involucra a PLN es la inhibición de la PP1, la enzima responsable de defosforilarlo, manteniendo a SERCA2a en un estado activado. Esta estrategia produjo una mejoría en el manejo de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular y, consecuentemente, de la función cardíaca, así como disminución de la remodelación ventricular, disminuyendo significativamente la fibrosis.⁷²

Los estudios mencionados indican que la TG dirigida hacia PLN o su regulación es un área que puede ser de importancia en un futuro, pero requiere de profundizarse con más estudios en modelos de IC, para alcanzar una fase de investigación clínica.

Parvalbúmina

La disfunción diastólica es un componente asociado a la IC, encontrado principalmente en pacientes mayores de 65 años, y actualmente no existen tratamientos específicos para esta disfunción. En miocitos cardíacos obtenidos de estos pacientes, se observa que el tiempo requerido para retirar el Ca^{2+} del citoplasma se encuentra aumentado; esto retarda la relajación del corazón y compromete el llenado de las cámaras cardíacas para el siguiente latido.¹⁴ La parvalbúmina es una proteína soluble intracelular de bajo peso molecular, con capacidad para unir Ca^{2+} , que se expresa de manera importante en músculo estriado de contracción ultrarrápida, pero no se expresa nativamente

en el corazón. Tiene como función principal acelerar la tasa de disminución del Ca^{2+} intracelular en una manera independiente de ATP.

Las intervenciones de TG que involucran a la parvalbúmina, hasta la fecha se han limitado a estudios *in vitro* y a modelos animales seguidos por plazos cortos de tiempo de hasta una semana; estos ensayos han demostrado que la expresión de parvalbúmina en el corazón se asocia con un incremento de la velocidad de relajación.^{14,16} Los datos pueden ser empleados como base para expresar parvalbúmina en el corazón, por medio de vectores con AAV, para hacer una evaluación a largo plazo. A pesar de que los efectos que se obtienen expresando parvalbúmina en el corazón son muy similares a los observados con la sobre-expresión de SERCA2a, los efectos obtenidos con parvalbúmina no requieren de ATP, evitando comprometer aún más las necesidades energéticas del corazón. Debido a esto, la parvalbúmina constituye un blanco terapéutico que debe de ser más explorado en el futuro.

Angiogénesis

La isquemia miocárdica se reporta como la principal causa de IC, debido a que el miocardio hibernante es un tejido con poca o nula función. A pesar de que la isquemia miocárdica puede ser tratada por angioplastia o cirugía de revascularización coronaria, la enfermedad coronaria difusa no es habitualmente manejable por medio de estas opciones. Lo anterior, deja un universo de pacientes sin una opción terapéutica para la base de su enfermedad. Es en estos pacientes en quienes se ha pensado al emplear estrategias de transferencia de material genético, para fomentar el desarrollo de nueva vascularización.³

Dentro de las estrategias para inducir angiogénesis se han empleado diferentes factores que incluyen al factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), las angiopoietinas, el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento hepático (HGF), la proteína quimio-táctica de monocitos-1 (MCP-1) y el factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF). La estrategia consiste en transferir el material genético que codifica para alguna de estas proteínas al tejido de interés, para favorecer el desarrollo de neovascularización en el tejido isquémico. En los modelos animales preclínicos esta metodología ha demostrado ser efectiva, en cuanto al crecimiento y generación de capilares, aunque la relevancia para el tejido muscular no se ha determinado.^{73,74} Se ha demostrado que con una expresión por más de cuatro semanas, los vasos formados experimentan una remodelación que les permite permanecer incluso cuando el estímulo ya no se encuentre.

En modelos animales con IC secundaria a isquemia, la administración de TG para angiogénesis mediada por VEGF se asoció con una mejoría de la perfusión miocárdica observada a las tres semanas, y también mejoró la función miocárdica global. La angiogénesis inducida por TG, es sin duda el área más explorada en la actualidad, respecto a la patología cardiovascular en humanos, con varios ensayos clínicos de fase I ya completados y 11 ensayos de fase II/III,^{26-28,34,75,76} con distintos objetivos, que incluyen la angiogénesis terapéutica para mejorar la perfusión miocárdica, la prevención de re-estenosis de stents,

y la prevención de la falla de injertos venosos en revascularización; sin embargo, los resultados son difíciles de interpretar, debido a la gran variación entre los vectores empleados, las vías de administración y los blancos terapéuticos. Uno de los problemas más importantes a considerar es que la eficiencia de la transferencia de material genético es inversa al tamaño del huésped, en parte por la difusión limitada del vector en una mayor cantidad de tejido. Por ello, a pesar de que varios estudios sean promisorios en modelos animales, los resultados pueden ser difíciles de reproducir en humanos. Sin embargo, los resultados de los pocos ensayos clínicos realizados comprueban que la TG es una estrategia con viabilidad para tratar grupos de pacientes que no son susceptibles de ser tratados con opciones convencionales.

Sistema β -adrenérgico

Las alteraciones de los receptores β -adrenérgicos durante la IC han sido descritas extensamente, abarcando desde una disminución de la densidad de receptores en el miocardio, hasta una desensibilización a los β -agonistas. La desensibilización de los receptores explica en gran medida la naturaleza refractaria a los tratamientos dirigidos a las vías adrenérgicas. Los receptores β -adrenérgicos se encuentran acoplados a proteínas G, y éstas, reguladas por proteínas cinasas de receptores acoplados a proteínas G, conocidas en el caso de los receptores adrenérgicos como β ARK1 (*Beta Adrenergic Receptor Kinase*) y ARK2; estas dos enzimas se encuentran aumentadas durante la IC, lo que contribuye de manera importante a la desensibilización de los receptores.²⁰ En ratones transgénicos con sobre-expresión de los receptores β se desarrolla miocardiopatía, mientras que en animales que sobre-expresan receptores β_2 , la contractilidad se encuentra aumentada sin que se desarrolle ninguna enfermedad.

En modelos animales se ha demostrado que la sobre-expresión de receptores β_2 dirigida al tejido cardíaco, se asocia con una contractilidad aumentada y una mayor respuesta a isoproterenol.¹⁷⁻¹⁹ En ratones en los que se sobre-expresa β ARK1 se encuentra una contractilidad disminuida en respuesta a isoproterenol, mientras que ratones sobre-expresando un inhibidor de β ARK1, llamado β ARK1ct, tienen una función cardíaca incrementada.²⁰ Estos datos sugieren que la manipulación de la función de β ARK1 tiene un impacto sobre la función cardíaca, susceptible de manipularse por TG.

En modelos animales de IC, se ha demostrado que la transferencia de un vector adenoviral con β ARK1ct en conejos con infarto agudo, previene las alteraciones en el sistema β -adrenérgico, mejora la función miocárdica y previene la aparición de IC.²⁰ Otra estrategia empleada para modificar por TG componentes del sistema β -adrenérgico, incluye la sobre-expresión del recaptador-1 de norepinefrina en el corazón. Esta proteína se encuentra disminuida durante la IC, lo que provoca un aumento de los niveles extracelulares de catecolaminas, derivando en el estado hiperadrenérgico que tiene un papel central en la desensibilización de los receptores. En conejos con IC, en los que se generó una sobre-expresión del recaptador-1, la concentración de norepinefrina se mantuvo en niveles similares a los normales, lo que se asoció con

una mejor función cardíaca, y se revirtió la hipertrofia cardíaca, recuperándose el fenotipo normal del corazón.²¹

Señalización intracelular

En la patogénesis de la IC, el estado hiperadrenérgico y las alteraciones en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , contribuyen a alterar la activación de distintas vías intracelulares, lo que las convierte en blancos potenciales para TG. Hasta la fecha se han explorado la adenilato ciclasa y la proteína cinasa C (PKC).

La adenilato ciclasa es una molécula central en los miocitos cardíacos, en particular la tipo VI (AC_{VI}). En modelos animales con IC se ha demostrado que la sobre-expresión de la AC_{VI} , mejora la función cardíaca e incrementa la sobrevida. En cerdos con IC establecida, además de mejorar los valores hemodinámicos, la función cardíaca y la respuesta al isoproterenol, la expresión de la AC_{VI} previene la remodelación de la pared cardíaca y la aparición de fibrosis.²³ Se cree que la función de la AC_{VI} en el tratamiento de la IC no es sólo en relación con un aumento de los niveles de AMPc, ya que también modifica la expresión de otros genes, favoreciendo la expresión de genes útiles para la contracción miocárdica.

El otro blanco para TG que ha sido explorado es la familia de la PKC, la cual es un componente de varias vías de transducción asociadas a membrana. La isoforma $\text{PKC}\alpha$ es la más abundante en el corazón, en donde se ha reportado un papel muy importante en la regulación de la contractilidad cardíaca; la pérdida de la función contráctil en la IC va acompañada de un incremento en los niveles de $\text{PKC}\alpha$ en el corazón. Con base en esta función, se han realizado estudios en modelos animales transfiriendo una dominante negativa de $\text{PKC}\alpha$ por medio de un vector adenoviral, para determinar su viabilidad como opción terapéutica. En ratas con IC posinfarto, se encontró que la transferencia de una dominante negativa de $\text{PKC}\alpha$ mejora la contractilidad miocárdica y los valores hemodinámicos.²²

Apoptosis

Se sabe que durante la dilatación de cavidades observada en la IC existe una remodelación de la pared miocárdica; se ha propuesto que uno de los mecanismos responsables de este proceso es la apoptosis de los miocitos cardíacos. A pesar de que no se conocen los mecanismos precisos por los que la apoptosis contribuye a la remodelación de la pared miocárdica, se han realizado estudios bloqueando por TG vías apoptóticas con resultados positivos.

El factor Bcl-2 es capaz de bloquear la apoptosis; ha sido administrado por medio de un vector adenoviral, después de un periodo de isquemia miocárdica en conejos, donde se encontró que es capaz de evitar el deterioro de la función cardíaca a corto y a largo plazo, además de prevenir la dilatación de cavidades y su remodelación.²⁴ También se demostró que previene la apoptosis en los bordes del área lesionada, aunque no se ha determinado si la expresión de Bcl-2 es requerida en el momento inicial o se requiere de una expresión a largo plazo.

La proteína p38, es un miembro de las cinasas, de proteínas mitógeno-activadas (MPAK), un regulador fundamental del crecimiento, sobrevida y muerte celular. Se

ha reportado que después de un infarto al miocardio la actividad de p38 disminuye, lo que contribuye al desarrollo de apoptosis en el corazón, aumentando el deterioro de la función y la remodelación de la pared. Cuando ratas pos-infarto son tratadas con un vector adenoviral para sobre-expresar p38, se encuentra que previene el deterioro de la función miocárdica, tiene un efecto antiapoptótico, y evita la fibrosis y remodelación de la pared ventricular.²⁵

Terapia para causas genéticas de insuficiencia cardíaca

Se han identificado múltiples causas de IC que se deben a mutaciones genéticas; sin embargo, se sabe que éstas constituyen un porcentaje mínimo de los casos de IC. Estas causas involucran a varios mecanismos patológicos, principalmente proteínas de la sarcómera y del citoesqueleto.⁷⁷⁻⁸³ En teoría estas causas de IC ofrecen un blanco inmediato para IC, debido a que al ser monogénicas tienen un mecanismo patológico más directo, y aislado de las redes de regulación involucradas en otros elementos ya mencionados. En esta línea de investigación, se ha demostrado que al sobre-expresar una proteína sarcomérica exógena, ésta se ensambla de forma ordenada y estequiométrica en el citoplasma. La idea en este tipo de terapia es desplazar a la proteína endógena que tiene el defecto, al cambiar la estequiometría en el interior de la célula. Este tipo de terapia no ha sido explorada experimentalmente, aunque es susceptible de serlo con modelos animales que reproducen a miocardiopatías hereditarias.

También se han identificado mutaciones de proteínas de mayor tamaño, como la distrofina en la distrofia muscular de Duchenne, en donde se han descrito varias mutaciones e incluso se ha encontrado que truncan a la proteína.⁸⁴ En estos casos la posibilidad de ser tratados por TG presenta mayores dificultades técnicas, aunque se ha demostrado que la transferencia de un mini gen de distrofina puede mejorar la sintomatología.^{85,86}

Conclusiones

A pesar de los avances terapéuticos, la insuficiencia cardíaca continúa siendo una de las principales causas de mortalidad; la TG se presenta como una opción promisoriosa, al tener la capacidad de corregir los defectos fundamentales observados en la insuficiencia cardíaca. En la actualidad es un área de investigación básica, preclínica y clínica de gran importancia, que puede dar resultados positivos en un futuro no distante. Uno de los mayores obstáculos que presenta la experimentación y aplicación clínica de ésta y otras opciones terapéuticas es la complejidad de los mecanismos de acción, por lo que se requiere que éstos, junto con las indicaciones, sean conocidos y entendidos para explotar al máximo las nuevas capacidades que esta opción terapéutica ofrece, por lo que es necesario seguir estrechamente los avances que se tengan en este campo en los próximos años.

Agradecimientos

Agradecemos los valiosos comentarios del Dr. David Jay (Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México,

D.F.) y del Dr. Francisco Martínez Flores (Instituto Nacional de Rehabilitación, México, D.F.).

Este trabajo se realizó con el apoyo de una beca doctoral de CONACYT para José Luis Reyes, y del proyecto PAPIIT-UNAM IN215002.

Bibliografía

1. American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics: 2005 Update. Dallas, Texas; American Heart Association; 2005.
2. Yla-Herttuala S, Martin JF. Cardiovascular gene therapy. *Lancet* 2000 Jan 15;355(9199):213-22.
3. Yla-Herttuala S, Alitalo K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med* 2003 Jun;9(6):694-701.
4. Reyes-Juarez JL, Zarain-Herzberg A. [Function and role of the sarcoplasmic reticulum in heart disease]. *Arch Cardiol Mex* 2006 Oct-Dec;76 Suppl 4:S18-32.
5. Kaprielian R, del Monte F, Hajjar RJ. Targeting Ca²⁺ cycling proteins and the action potential in heart failure by gene transfer. *Basic Res Cardiol* 2002;97 Suppl 1:I136-45.
6. Most P, Plegier ST, Volkers M, Heidt B, et al. Cardiac adenoviral S100A1 gene delivery rescues failing myocardium. *J Clin Invest* 2004 Dec;114(11):1550-63.
7. Most P, Remppis A, Plegier ST, Katus HA, et al. S100A1: a novel inotropic regulator of cardiac performance. Transition from molecular physiology to pathophysiological relevance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007 Aug;293(2):R568-77.
8. Most P, Seifert H, Gao E, Funakoshi H, et al. Cardiac S100A1 protein levels determine contractile performance and propensity toward heart failure after myocardial infarction. *Circulation* 2006 Sep 19;114(12):1258-68.
9. Plegier ST, Most P, Boucher M, Soltys S, et al. Stable myocardial-specific AAV6-S100A1 gene therapy results in chronic functional heart failure rescue. *Circulation* 2007 May 15;115(19):2506-15.
10. Plegier ST, Remppis A, Heidt B, Volkers M, et al. S100A1 gene therapy preserves in vivo cardiac function after myocardial infarction. *Mol Ther* 2005 Dec;12(6):1120-9.
11. Hoshijima M, Ikeda Y, Iwanaga Y, Minamisawa S, et al. Chronic suppression of heart-failure progression by a pseudophosphorylated mutant of phospholamban via in vivo cardiac rAAV gene delivery. *Nat Med* 2002 Aug;8(8):864-71.
12. Hoshijima M, Knoll R, Pashmforoush M, Chien KR. Reversal of calcium cycling defects in advanced heart failure toward molecular therapy. *J Am Coll Cardiol* 2006 Nov 7;48(9 Suppl 1):A15-23.
13. Iwanaga Y, Hoshijima M, Gu Y, Iwatate M, et al. Chronic phospholamban inhibition prevents progressive cardiac dysfunction and pathological remodeling after infarction in rats. *J Clin Invest* 2004 Mar;113(5):727-36.
14. Michele DE, Szatkowski ML, Albayya FP, Metzger JM. Parvalbumin gene delivery improves diastolic function in the aged myocardium in vivo. *Mol Ther* 2004 Aug;10(2):399-403.
15. Miyamoto MI, del Monte F, Schmidt U, DiSalvo TS, et al. Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Jan 18;97(2):793-8.
16. Szatkowski ML, Westfall MV, Gomez CA, Wahr PA, et al. In vivo acceleration of heart relaxation performance by parvalbumin gene delivery. *J Clin Invest* 2001 Jan;107(2):191-8.
17. Jones JM, Wilson KH, Steenbergen C, Koch WJ, et al. Dose dependent effects of cardiac beta2 adrenoceptor gene therapy. *J Surg Res* 2004 Nov;122(1):113-20.
18. Maurice JP, Hata JA, Shah AS, White DC, et al. Enhancement of cardiac function after adenoviral-mediated in vivo intracoronary beta2-adrenergic receptor gene delivery. *J Clin Invest* 1999 Jul;104(1):21-9.
19. Tevæarai HT, Eckhart AD, Walton GB, Keys JR, et al. Myocardial gene transfer and overexpression of beta2-adrenergic receptors

- potentiates the functional recovery of unloaded failing hearts. *Circulation* 2002 Jul 2;106(1):124-9.
20. Koch WJ. Genetic and phenotypic targeting of beta-adrenergic signaling in heart failure. *Mol Cell Biochem* 2004 Aug;263(1-2):5-9.
 21. Munch G, Rosport K, Bultmann A, Baumgartner C, et al. Cardiac overexpression of the norepinephrine transporter uptake-1 results in marked improvement of heart failure. *Circ Res* 2005 Oct 28;97(9):928-36.
 22. Hambleton M, Hahn H, Plegier ST, Kuhn MC, et al. Pharmacological- and gene therapy-based inhibition of protein kinase Calpha/beta enhances cardiac contractility and attenuates heart failure. *Circulation* 2006 Aug 8;114(6):574-82.
 23. Lai NC, Roth DM, Gao MH, Tang T, et al. Intracoronary adenovirus encoding adenylyl cyclase VI increases left ventricular function in heart failure. *Circulation* 2004 Jul 20;110(3):330-6.
 24. Chatterjee S, Stewart AS, Bish LT, Jayasankar V, et al. Viral gene transfer of the antiapoptotic factor Bcl-2 protects against chronic postischemic heart failure. *Circulation* 2002 Sep 24;106(12 Suppl 1):I212-7.
 25. Tenhunen O, Soini Y, Ilves M, Rysa J, et al. p38 Kinase rescues failing myocardium after myocardial infarction: evidence for angiogenic and anti-apoptotic mechanisms. *FASEB J* 2006 Sep;20(11):1907-9.
 26. Hedman M, Hartikainen J, Syvanne M, Stjernvall J, 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 Jun 3;107(21):2677-83.
 27. Kastrup J, Jorgensen E, Ruck A, Tagil K, et al. 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 Apr 5;45(7):982-8.
 28. Stewart DJ, Hilton JD, Arnold JM, Gregoire J, 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 Nov;13(21):1503-11.
 29. Fortuin FD, Vale P, Losordo DW, Symes J, et al. One-year follow-up of direct myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor-2 using naked plasmid deoxyribonucleic acid by way of thoracotomy in no-option patients. *Am J Cardiol* 2003 Aug 15;92(4):436-9.
 30. Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, Kearney M, Rossow ST, Passeri J, et al. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation* 1996 Dec 15;94(12):3281-90.
 31. Laitinen M, Pakkanen T, Donetti E, Baetta R, Luoma J, Lehtolainen P, et al. Gene transfer into the carotid artery using an adventitial collar: comparison of the effectiveness of the plasmid-liposome complexes, retroviruses, pseudotyped retroviruses, and adenoviruses. *Hum Gene Ther* 1997 Sep 20;8(14):1645-50.
 32. Wright MJ, Wightman LM, Latchman DS, Marber MS. In vivo myocardial gene transfer: optimization and evaluation of intracoronary gene delivery in vivo. *Gene Ther* 2001 Dec;8(24):1833-9.
 33. Rutanen J, Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, et al. Adenoviral catheter-mediated intramyocardial gene transfer using the mature form of vascular endothelial growth factor-D induces transmural angiogenesis in porcine heart. *Circulation* 2004 Mar 2;109(8):1029-35.
 34. Kankkonen HM, Vahakangas E, Marr RA, Pakkanen T, et al. Long-term lowering of plasma cholesterol levels in LDL-receptor-deficient WHHL rabbits by gene therapy. *Mol Ther* 2004 Apr;9(4):548-56.
 35. Alexander JH, Hafley G, Harrington RA, Peterson ED, et al. Efficacy and safety of edifoligide, an E2F transcription factor decoy, for prevention of vein graft failure following coronary artery bypass graft surgery: PREVENT IV: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005 Nov 16;294(19):2446-54.
 36. Masaki I, Yonemitsu Y, Komori K, Ueno H, et al. Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer to vasculature: a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system. *FASEB J* 2001 May;15(7):1294-6.
 37. Poliakova L, Kovesdi I, Wang X, Capogrossi MC, et al. Vascular permeability effect of adenovirus-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to the rabbit and rat skeletal muscle. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999 Aug;118(2):339-47.
 38. Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, Heikura T, et al. VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res* 2003 May 30;92(10):1098-106.
 39. Wen S, Graf S, Massey PG, Dichek DA. Improved vascular gene transfer with a helper-dependent adenoviral vector. *Circulation* 2004 Sep 14;110(11):1484-91.
 40. Gruchala M, Bhardwaj S, Pajusola K, Roy H, et al. Gene transfer into rabbit arteries with adeno-associated virus and adenovirus vectors. *J Gene Med* 2004 May;6(5):545-54.
 41. Su H, Joho S, Huang Y, Barcena A, et al. Adeno-associated viral vector delivers cardiac-specific and hypoxia-inducible VEGF expression in ischemic mouse hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Nov 16;101(46):16280-5.
 42. Schnepf BC, Clark KR, Klemanski DL, Pacak CA, et al. Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol* 2003 Mar;77(6):3495-504.
 43. Laitinen M, Mäkinen K, Manninen H, Matsi P, et al. Adenovirus-mediated gene transfer to lower limb artery of patients with chronic critical leg ischemia. *Hum Gene Ther* 1998 Jul 1;9(10):1481-6.
 44. Sharif F, Hynes SO, McMahon J, Cooney R, et al. Gene-eluting stents: comparison of adenoviral and adeno-associated viral gene delivery to the blood vessel wall in vivo. *Hum Gene Ther* 2006 Jul;17(7):741-50.
 45. Walter DH, Cejna M, Diaz-Sandoval L, Willis S, et al. Local gene transfer of phVEGF-2 plasmid by gene-eluting stents: an alternative strategy for inhibition of restenosis. *Circulation* 2004 Jul 6;110(1):36-45.
 46. Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, et al. Transcatheter transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006 Sep 21;355(12):1222-32.
 47. Dib N, Michler RE, Pagani FD, Wright S, et al. Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: four-year follow-up. *Circulation* 2005 Sep 20;112(12):1748-55.
 48. Haider HK, Elmadbouh I, Jean-Baptiste M, Ashraf M. Nonviral vector gene modification of stem cells for myocardial repair. *Mol Med* 2008 Jan-Feb;14(1-2):79-86.
 49. Haider HK, Ye L, Ashraf M. Skeletal muscle derived stem cells for myocardial repair. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2007 Nov;2(3):205-13.
 50. Nasser BA, Kukucka M, Dandel M, Knosalla C, et al. Intramyocardial delivery of bone marrow mononuclear cells and mechanical assist device implantation in patients with end-stage cardiomyopathy. *Cell Transplant* 2007;16(9):941-9.
 51. Sim EK, Ye L, Haider H. New strategy for cardiac repair: genetically modified skeletal myoblasts. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2007 Jun;15(3):183-4.
 52. Smits PC. Myocardial repair with autologous skeletal myoblasts: a review of the clinical studies and problems. *Minerva Cardioangiolog* 2004 Dec;52(6):525-35.
 53. Yau TM, Kim C, Ng D, Li G, et al. Increasing transplanted cell survival with cell-based angiogenic gene therapy. *Ann Thorac Surg* 2005 Nov;80(5):1779-86.
 54. Ye L, Haider H, Jiang S, Ling LH, et al. Reversal of myocardial injury using genetically modulated human skeletal myoblasts in a rodent cryoinjured heart model. *Eur J Heart Fail* 2005 Oct;7(6):945-52.

55. Haider HK, Ashraf M. Strategies to promote donor cell survival: Combining preconditioning approach with stem cell transplantation. *J Mol Cell Cardiol* 2008 May 10.
56. Lee RJ, Springer ML, Blanco-Bose WE, Shaw R, et al. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* 2000 Aug 22;102(8):898-901.
57. Springer ML, Chen AS, Kraft PE, Bednarski M, et al. VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults. *Mol Cell* 1998 Nov;2(5):549-58.
58. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, McDonald MC, 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 May 1;103(17):2138-43.
59. Hayase M, Del Monte F, Kawase Y, Macneill BD, et al. Catheter-based antegrade intracoronary viral gene delivery with coronary venous blockade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005 Jun;288(6):H2995-3000.
60. Raake P, von Degenfeld G, Hinkel R, Vachenaue R, et al. Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins: comparison with surgical and percutaneous intramyocardial gene delivery. *J Am Coll Cardiol* 2004 Sep 1;44(5):1124-9.
61. Kaye DM, Prevolos A, Marshall T, Byrne M, et al. Percutaneous cardiac recirculation-mediated gene transfer of an inhibitory phospholamban peptide reverses advanced heart failure in large animals. *J Am Coll Cardiol* 2007 Jul 17;50(3):253-60.
62. Reyes-Juarez JL, Juarez-Rubi R, Rodriguez G, Zarain-Herzberg A. Transcriptional analysis of the human cardiac calsequestrin gene in cardiac and skeletal myocytes. *J Biol Chem* 2007 Dec 7;282(49):35554-63.
63. Braunwald E, Bristow MR. Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation* 2000 Nov 14;102(20 Suppl 4):IV14-23.
64. Bers DM, Eisner DA, Valdivia HH. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ and heart failure: roles of diastolic leak and Ca²⁺ transport. *Circ Res* 2003 Sep 19;93(6):487-90.
65. Most P, Bernotat J, Ehlermann P, Plegier ST, et al. S100A1: a regulator of myocardial contractility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Nov 20;98(24):13889-94.
66. Entwistle JW, 3rd. Long-term mechanical ventricular assistance toward myocardial recovery. *Cardiol Clin* 2003 Feb;21(1):75-82.
67. Hall JL, Birks EJ, Grindle S, Cullen ME, et al. Molecular signature of recovery following combination left ventricular assist device (LVAD) support and pharmacologic therapy. *Eur Heart J* 2007 Mar;28(5):613-27.
68. Kuhn M, Voss M, Mitko D, Stypmann J, et al. Left ventricular assist device support reverses altered cardiac expression and function of natriuretic peptides and receptors in end-stage heart failure. *Cardiovasc Res* 2004 Nov 1;64(2):308-14.
69. Zarain-Herzberg A, Rupp H. Therapeutic potential of CPT I inhibitors: cardiac gene transcription as a target. *Expert Opin Investig Drugs* 2002 Mar;11(3):345-56.
70. Zarain-Herzberg A, Rupp H, Elimban V, Dhalla NS. Modification of sarcoplasmic reticulum gene expression in pressure overload cardiac hypertrophy by etomoxir. *FASEB J* 1996 Sep;10(11):1303-9.
71. Gianni D, Chan J, Gwathmey JK, del Monte F, et al. SERCA2a in heart failure: role and therapeutic prospects. *J Bioenerg Biomembr* 2005 Dec;37(6):375-80.
72. Yamada M, Ikeda Y, Yano M, Yoshimura K, et al. Inhibition of protein phosphatase 1 by inhibitor-2 gene delivery ameliorates heart failure progression in genetic cardiomyopathy. *FASEB J* 2006 Jun;20(8):1197-9.
73. Lee LY, Patel SR, Hackett NR, Mack CA, et al. Focal angiogenic therapy using intramyocardial delivery of an adenovirus vector coding for vascular endothelial growth factor 121. *Ann Thorac Surg* 2000 Jan;69(1):14-23.
74. Leotta E, Patejunas G, Murphy G, Szokol J, et al. Gene therapy with adenovirus-mediated myocardial transfer of vascular endothelial growth factor 121 improves cardiac performance in a pacing model of congestive heart failure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002 Jun;123(6):1101-13.
75. Kastelein JJ, Wedel MK, Baker BF, Su J, et al. Potent reduction of apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol by short-term administration of an antisense inhibitor of apolipoprotein B. *Circulation* 2006 Oct 17;114(16):1729-35.
76. Kutryk MJ, Foley DP, van den Brand M, Hamburger JN, et al. Local intracoronary administration of antisense oligonucleotide against c-myc for the prevention of in-stent restenosis: results of the randomized investigation by the Thoraxcenter of antisense DNA using local delivery and IVUS after coronary stenting (ITAL-ICS) trial. *J Am Coll Cardiol* 2002 Jan 16;39(2):281-7.
77. Bos JM, Ommen SR, Ackerman MJ. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: one, two, or more diseases? *Curr Opin Cardiol* 2007 May;22(3):193-9.
78. Karkkainen S, Peuhkurinen K. Genetics of dilated cardiomyopathy. *Ann Med* 2007;39(2):91-107.
79. Lind JM, Chiu C, Semsarian C. Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2006 Nov;4(6):927-34.
80. Ramaraj R. Hypertrophic cardiomyopathy: etiology, diagnosis, and treatment. *Cardiol Rev* 2008 Jul-Aug;16(4):172-80.
81. Chang AN, Parvatiyar MS, Potter JD. Troponin and cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 Apr 25;369(1):74-81.
82. van Spaendonck-Zwarts KY, van den Berg MP, van Tintelen JP. DNA analysis in inherited cardiomyopathies: current status and clinical relevance. *Pacing Clin Electrophysiol* 2008 Feb;31 Suppl 1:S46-9.
83. Wiersma AC, Leegwater PA, van Oost BA, Ollier WE, et al. Canine candidate genes for dilated cardiomyopathy: annotation of and polymorphic markers for 14 genes. *BMC Vet Res* 2007;3:28.
84. Rodino-Klapac LR, Chicoine LG, Kaspar BK, Mendell JR. Gene therapy for duchenne muscular dystrophy: expectations and challenges. *Arch Neurol* 2007 Sep;64(9):1236-41.
85. Goyenvall A, Vulin A, Fougereousse F, Leturcq F, et al. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 2004 Dec 3;306(5702):1796-9.
86. Townsend D, Blankinship MJ, Allen JM, Gregorevic P, et al. Systemic administration of micro-dystrophin restores cardiac geometry and prevents dobutamine-induced cardiac pump failure. *Mol Ther* 2007 Jun;15(6):1086-92.