

Artículo original

Implicación de la isoforma antiangiogénica VEGF-A_{165b} en la angiogénesis y la función sistólica tras un infarto de miocardio reperfundido

César Ríos-Navarro^{a,◇}, Luisa Hueso^{a,◇}, Ana Díaz^b, Víctor Marcos-Garcés^c, Clara Bonanad^{a,c,d}, Amparo Ruiz-Sauri^{a,e}, José M. Vila^f, María J. Sanz^{a,g,h}, Francisco J. Chorro^{a,c,d,i}, Laura Piqueras^{a,g,h,*} y Vicente Bodi^{a,c,d,i,*}

^a Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España

^b Unidad Central de Investigación Biomédica (UCIM), Universidad de Valencia, Valencia, España

^c Servicio de Cardiología, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, España

^d Departamento de Medicina, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia, Valencia, España

^e Departamento de Patología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia, Valencia, España

^f Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia, Valencia, España

^g Centro de Investigación Biomédica en Red Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Madrid, España

^h Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia, Valencia, España

ⁱ Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Madrid, España

Historia del artículo:

Recibido el 27 de septiembre de 2019

Aceptado el 30 de marzo de 2020

On-line el 3 de agosto de 2020

Palabras clave:

Infarto agudo de miocardio

Angiogénesis

VEGF-A_{165b}

RESUMEN

Introducción y objetivos: La angiogénesis participa en la restauración de la microcirculación después de un infarto agudo de miocardio (IAM). El objetivo de este estudio es explorar el papel que juega la isoforma anti-angiogénica del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-A_{165b} y explorar su potencial como terapia coadyuvante a la reperfusión coronaria.

Métodos: Se realizaron dos modelos murinos de IAM: a) ligadura permanente de la arteria coronaria (IAM no reperfundido) y b) oclusión transitoria durante 45 minutos de la arteria coronaria seguida de reperfusión (IAM reperfundido); en ambos modelos, se realizó a los animales una ecocardiografía previa a la eutanasia el día 21 pos-IAM. Se determinaron los niveles séricos y miocárdicos de VEGF-A_{165b}. En ambos modelos experimentales se evaluó la implicación funcional y estructural del bloqueo de esta isoforma. En una cohorte de 104 pacientes con IAM con elevación del segmento ST se cuantificaron los niveles circulantes de VEGF-A_{165b} y se estudió su asociación con la fracción de eyección del ventrículo izquierdo determinada mediante resonancia magnética cardíaca a los 6 meses del IAM, así como con la aparición de eventos adversos (muerte, insuficiencia cardíaca o reinfarcto) durante el seguimiento.

Resultados: En ambos modelos, los niveles séricos y tisulares de VEGF-A_{165b} habían aumentado a los 21 días de la inducción del IAM. Además, existía una correlación negativa entre los valores circulantes de VEGF-A_{165b} y la función sistólica evaluada mediante ecocardiografía. El bloqueo *in vivo* de VEGF-A_{165b} se relacionó con una mayor densidad microvascular, menor tamaño de infarto y mejor fracción de eyección en el modelo de IAM reperfundido, pero no en el modelo de IAM no reperfundido. En la cohorte de pacientes, aquellos con unos niveles séricos elevados de VEGF-A_{165b} presentaron una fracción de eyección deprimida y una mayor tasa de eventos adversos.

Conclusiones: En estudios experimentales y clínicos, valores séricos elevados de VEGF-A_{165b} se asocian con una peor función sistólica. Su bloqueo incrementa la neoangiogénesis, reduce el tamaño del infarto y aumenta la fracción de eyección en el modelo de IAM reperfundido, pero no en el de sin reperfundido. En consecuencia, la neutralización de VEGF-A_{165b} representa una potencial opción terapéutica como coadyuvante a la reperfusión coronaria.

© 2020 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Role of antiangiogenic VEGF-A_{165b} in angiogenesis and systolic function after reperfused myocardial infarction

ABSTRACT

Introduction and objectives: Angiogenesis helps to reestablish microcirculation after myocardial infarction (MI). In this study, we aimed to further understand the role of the antiangiogenic isoform vascular endothelial growth factor (VEGF)-A_{165b} after MI and to explore its potential as a coadjuvant therapy to coronary reperfusión.

Keywords:

Myocardial infarction

Angiogenesis

VEGF-A_{165b}

VÉASE CONTENIDO RELACIONADO:

<https://doi.org/10.1016/j.recesp.2020.07.027>

* Autor para correspondencia: Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA. Avda. Menéndez Pelayo 4acc, 46010 Valencia, España.

Correo electrónicos: piqueras_lau@gva.es (L. Piqueras), vicente.bodi@uv.es (V. Bodi).

◇ Ambos autores han contribuido por igual a este trabajo.

<https://doi.org/10.1016/j.recesp.2020.03.029>

0300-8932/© 2020 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Methods: Two mice MI models were formed: a) permanent coronary ligation (nonreperfused MI); b) transient 45-minute coronary occlusion followed by reperfusion (reperfused MI); in both models, animals underwent echocardiography before euthanasia at day 21 after MI induction. We determined serum and myocardial VEGF-A_{165b} levels. In both experimental MI models, we assessed the functional and structural role of VEGF-A_{165b} blockade. In a cohort of 104 ST-segment elevation MI patients, circulating VEGF-A_{165b} levels were correlated with cardiovascular magnetic resonance-derived left ventricular ejection fraction at 6 months and with the occurrence of adverse events (death, heart failure, and/or reinfarction).

Results: In both models, circulating and myocardial VEGF-A_{165b} levels were increased 21 days after MI induction. Serum VEGF-A_{165b} levels inversely correlated with systolic function evaluated by echocardiography. VEGF-A_{165b} blockade increased capillary density, reduced infarct size, and enhanced left ventricular function in reperfused, but not in nonreperfused, MI experiments. In patients, higher VEGF-A_{165b} levels correlated with depressed ejection fraction and worse outcomes.

Conclusions: In experimental and clinical studies, higher serum VEGF-A_{165b} levels are associated with worse systolic function. Their blockade enhances neoangiogenesis, reduces infarct size, and increases ejection fraction in reperfused, but not in nonreperfused, MI experiments. Therefore, VEGF-A_{165b} neutralization represents a potential adjuvant therapy to coronary reperfusion.

© 2020 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Abreviaturas

FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo
IAM: infarto agudo de miocardio
IAMCESTi: infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST
MACE: eventos adversos cardiacos mayores
RMC: resonancia magnética cardiovascular
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

INTRODUCCIÓN

A pesar de la perfusión completa del epicardio tras un infarto agudo de miocardio (IAM), el deterioro de la perfusión miocárdica puede persistir en más del 50% de los pacientes. Este fenómeno se conoce como obstrucción microvascular y tiene efectos perjudiciales en la estructura y el pronóstico^{1,2}. Para minimizar la afección microvascular, es importante evaluar nuevos tratamientos complementarios a la perfusión temprana.

La angiogénesis participa en el proceso de reparación tras un IAM restableciendo la circulación microvascular y proporcionando oxígeno y nutrientes al tejido cardíaco³. En el contexto de un IAM, la concentración del factor de crecimiento endotelial vascular proangiogénico (VEGF)-A aumenta rápidamente en el plasma y el miocardio infartado después de inducir el IAM⁴. El VEGF-A puede diferenciarse por *splicing* y generar la isoforma antiangiogénica⁵ VEGF-A_{165b}. En una cohorte de 50 pacientes con IAM con elevación del segmento ST (IAMCEST), se observó que la concentración sérica del VEGF-A_{165b} aumentaba tras el IAM y se relacionaba con alteración de la estructura cardíaca determinada por la resonancia magnética cardiovascular (RMC), realizada la primera semana después del IAM⁶. No obstante, hasta la fecha siguen sin conocerse los efectos de la actividad del VEGF-A_{165b} en modelos experimentales de IAM y los posibles efectos de bloquearlo.

Para obtener más información sobre el papel del VEGF-A_{165b} tras un IAM y explorar su potencial como tratamiento complementario a la perfusión coronaria temprana, los objetivos concretos del presente estudio son los siguientes. En 2 modelos murinos experimentales de IAM (IAM reperfundido y IAM no reperfundido): a) determinar la función del VEGF-A_{165b} en el suero y el miocardio infartado; b) investigar *in vivo* los posibles efectos de la neutralización del VEGF-A_{165b} en la densidad de los capilares, el tamaño del infarto y la función sistólica; y en una cohorte

prospectiva de 104 pacientes con IAMCEST: c) evaluar la concentración del VEGF-A_{165b} circulante, su relación con la estructura cardíaca resultante, evaluada a los 6 meses mediante RMC, y la aparición de eventos adversos cardiacos mayores (MACE) durante el seguimiento.

MÉTODOS

Estudios con animales

Los protocolos con los animales se realizaron siguiendo las guías de la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y el comité de ética de la junta supervisora los aprobó (número de protocolo: 2016/VCS/PEA/00075).

Los ratones C57BL/6J procedían de los Charles River Laboratories (Châtillon-sur-Chalaronne, Francia). Los ratones (edad, 16 ± 2 semanas) se criaron y mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos, a una temperatura constante de 22 ± 2 °C, una humedad del 60-65% con un ciclo luz/oscuridad de 12 h y con acceso libre a la comida normal y al agua esterilizada en autoclave.

Modelo murino de IAM

Se indujo IAM en ratones (n = 60) por ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda, pero 8 de estos fallecieron antes. Los ratones se separaron en 2 modelos de IAM: a) IAM no reperfundido (ligadura coronaria permanente, sin perfusión), y b) IAM reperfundido (oclusión transitoria de 45 min de la arteria coronaria seguida de perfusión). En el modelo de IAM no reperfundido, se apretó el nudo, con la consiguiente oclusión de la arteria coronaria. En el modelo de IAM reperfundido, se colocó un tubo de 23 G entre la arteria coronaria y la sutura de seda del 6-0, y después se eliminó para poder realizar la perfusión completa tras el periodo de isquemia. El tubo se colocó a través del sexto espacio intercostal hacia la parte externa del animal. En ambos modelos, una vez confirmado el inicio de la isquemia, tanto a simple vista como mediante un electrocardiograma, se cerró el tórax del ratón. En el modelo de IAM reperfundido, se extrajo el tubo al cabo de 45 min de la oclusión para realizar la perfusión coronaria, que quedó confirmada en el electrocardiograma por la resolución de la elevación del segmento ST.

Además, se incluyó en el estudio un grupo con intervención simulada (n = 13). A estos animales se les aplicó el mismo

protocolo quirúrgico, excepto por la oclusión de la arteria coronaria.

Grupos experimentales

Se aleatorizó a los ratones a los siguientes grupos de tratamiento: a) grupo con intervención simulada; b) IAM no reperfundido con anticuerpo de isotipo anti-IgG; c) IAM no reperfundido con anticuerpo bloqueador del VEGF-A_{165b}; d) IAM reperfundido con anticuerpo de isotipo anti-IgG, y e) IAM reperfundido con anticuerpo bloqueador del VEGF-A_{165b}. Cada grupo experimental constaba de 13 animales, por lo que el grupo de estudio definitivo estaba formado por 65 ratones ([figura 1 del material adicional](#)).

Estudio en pacientes con IAMCEST

El estudio se ajustó a la Declaración de Helsinki en lo que respecta al uso de voluntarios humanos. El protocolo del estudio fue aprobado por el comité de ética local y se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes.

Los criterios de inclusión fueron: pacientes con un primer IAMCEST tratados con intervención coronaria primaria en las primeras 12 h tras el inicio del dolor torácico, de los que se obtuvo RMC a los 6 meses del IAMCEST. Se incluyó prospectivamente a 127 pacientes consecutivos con estas características dados de alta entre julio de 2013 y diciembre de 2017.

Los criterios de exclusión fueron: muerte (n = 2), reinfarcto (n = 4), inestabilidad clínica (n = 4) durante los primeros 6 meses después del alta y cualquier contraindicación para la RMC (n = 13). Así pues, el grupo definitivo del estudio constaba de 104 pacientes con IAMCEST. El diagrama de flujo de los pacientes del estudio se presenta en la [figura 2 del material adicional](#).

Se incluyó un grupo de control emparejado por edad y sexo con el grupo del estudio ([tabla 1 del material adicional](#)), formado por 25 pacientes en quienes se descartó cualquier enfermedad cardiaca mediante anamnesis, exploración física y estudio ecocardiográfico exhaustivos realizados por un cardiólogo clínico.

Análisis estadístico

Se evaluó la normalidad de la distribución con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos continuos con distribución normal se expresan como media ± desviación estándar de la media y se compararon utilizando la prueba de la t de Student para datos no emparejados o el ANOVA unilaterial. Los datos no paramétricos se expresan como mediana [intervalo intercuartílico] y se compararon utilizando la prueba de la U de Mann-Whitney. Los porcentajes de grupo se compararon utilizando la prueba de la χ^2 o la prueba exacta de Fisher, según fuera oportuno. Se evaluaron las correlaciones lineales utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Puesto que no se validaron valores de corte previos para la concentración sérica del VEGF-A_{165b}, se dividió a los pacientes en función del valor medio de la cohorte de estudio (405 pg/ml). La relación entre la concentración del VEGF-A_{165b} (alta, > 405 pg/ml) y el tiempo transcurrido hasta el primer MACE se determinó mediante la curva de Kaplan-Meier y la prueba de rangos logarítmicos. Se calculó la concentración sérica del VEGF-A_{165b} con su intervalo de confianza del 95% (IC95%) en pacientes con IAMCEST para cada grupo. Se consideró que había significación estadística con valores bilaterales de $p < 0,05$. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con SPSS 19.0 (SPSS, Inc., Estados Unidos).

Se especifican más detalles en el apartado «Métodos» del [material adicional](#).

RESULTADOS

La concentración del VEGF-A_{165b} circulante aumentó tras el IAM y se relacionó con alteración de la función sistólica

La concentración del VEGF-A_{165b} circulante aumentó considerablemente a los 21 días de la inducción del IAM en ambos grupos experimentales de IAM no reperfundido (212 ± 10 pg/ml; $p < 0,01$) e IAM reperfundido (213 ± 12 pg/ml; $p < 0,05$) comparados con la intervención simulada (167 ± 7 pg/ml) ([figura 1A](#)). A continuación, se investigó la relación entre los parámetros derivados de la ecocardiografía y los valores del VEGF-A_{165b} circulante previos al sacrificio. Se obtuvo una correlación inversa entre la concentración sérica del VEGF-A_{165b} y la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) ([figura 1B](#)) y la fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo (FAVE) ([figura 1C](#)).

Expresión aumentada del VEGF-A_{165b} en modelos experimentales de IAM

Se detectó una tendencia hacia una mayor expresión del VEGF-A_{165b} en muestras de miocardio obtenidas a partir del área infartada de ambos grupos de IAM, comparadas con la intervención simulada ([figura 1D](#)). Los estudios de inmunofluorescencia revelaron que, aunque se observó una expresión constitutiva débil del VEGF-A_{165b} en los controles, la presencia del VEGF-A_{165b} era mayor en las áreas de infarto de ambos grupos de IAM ($p < 0,05$) ([figura 1D,E](#)). Además, la inmunofluorescencia de doble marcado confirmó la expresión del VEGF-A_{165b} en las células endoteliales (CD31+) ([figura 1G](#)).

En resumen, se aumentó la presencia del VEGF-A_{165b} circulante y miocárdico en los 2 modelos experimentales de IAM (reperfundido y no reperfundido) y mediante ecocardiografía se asoció con una función sistólica más deprimida.

El bloqueo de la actividad del VEGF-A_{165b} mejoró la angiogénesis, la función sistólica y el tamaño del infarto en ratones con IAM reperfundido, pero no con IAM no reperfundido

Para explorar las consecuencias del bloqueo *in vivo* del VEGF-A_{165b}, se incluyó un grupo experimental para cada modelo de IAM en el cual se trataba a los animales con una inyección intraperitoneal de un anticuerpo bloqueador específico anti-VEGF-A_{165b} o con un isotipo emparejado anti-IgG.

Efectos en la función sistólica y el tamaño del infarto

Comparados con la intervención simulada, los animales de los grupos de IAM reperfundido y IAM no reperfundido tratados con anticuerpo de isotipo anti-IgG mostraron peor función sistólica, tal como reflejan el aumento del diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo (VI) (no reperfundido, $44,4 \pm 4,1$ mm y reperfundido, $43,8 \pm 5,7$ mm frente a la intervención simulada, $38,2 \pm 3,5$ mm; $p < 0,01$) y una FEVI reducida (no reperfundido, el $41,4 \pm 5,8\%$ y reperfundido, el $49,8 \pm 6,4\%$ frente a la intervención simulada, el $59,5 \pm 8,1\%$; $p < 0,01$) y la FAVE (no reperfundido, el $21,8 \pm 5,4\%$ y reperfundido, el $28,8 \pm 4,5\%$ frente a la intervención simulada, el $35,9 \pm 6,3\%$; $p < 0,01$). No obstante, no se detectaron diferencias en la función sistólica entre los grupos de IAM reperfundido y no reperfundido tratados con anticuerpo del isotipo anti-IgG ([tabla 1](#)).

Curiosamente, en el modelo de IAM reperfundido, el tratamiento con un anticuerpo específico anti-VEGF-A_{165b} produjo una mejora de la FEVI (el $57,1 \pm 8,5\%$ frente al $49,8 \pm 6,4\%$; $p < 0,05$) ([figura 2D,E](#)) y la FAVE (el $34,2 \pm 6,2\%$ frente al $28,8 \pm 4,5\%$; $p < 0,05$)

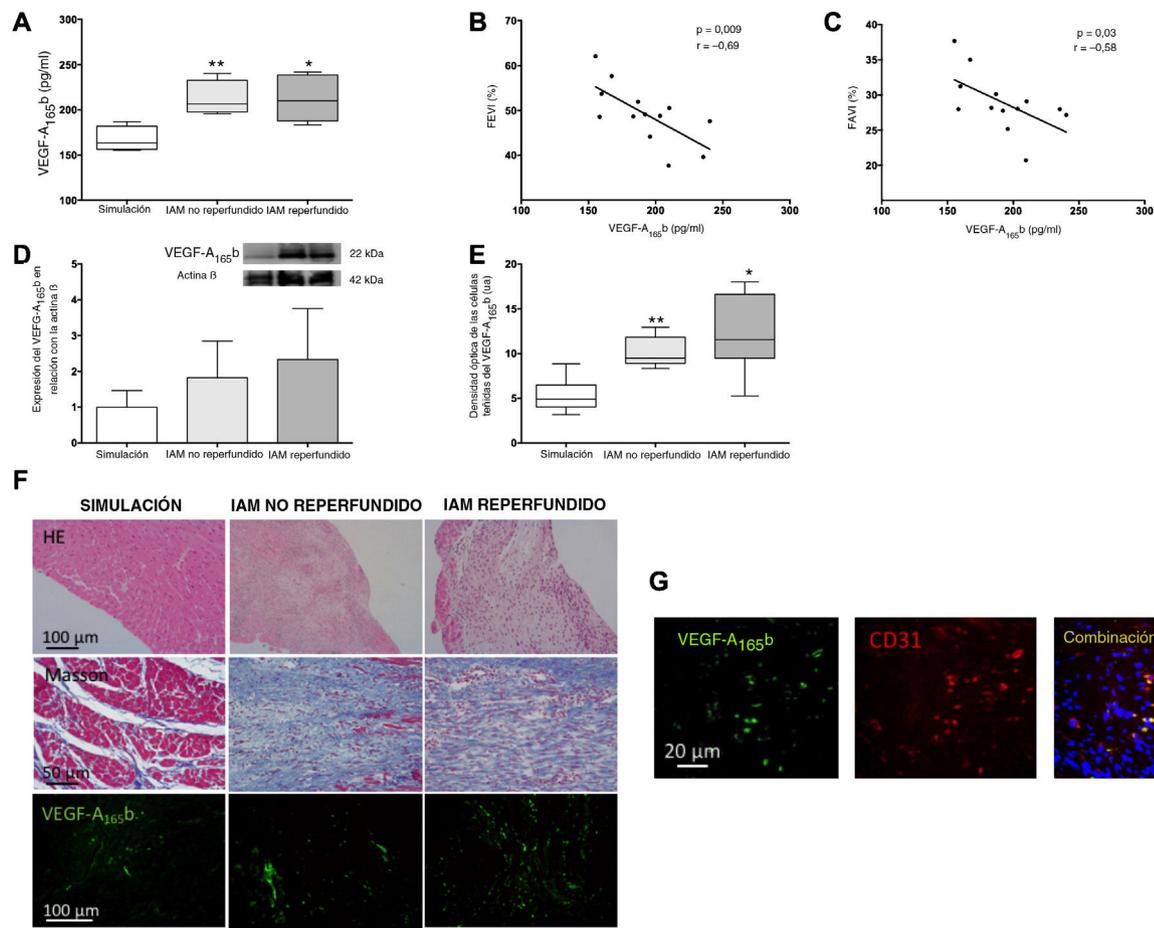


Figura 1. Las concentraciones sérica y miocárdica del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-A_{165b} se hallan aumentadas en los modelos experimentales de infarto agudo de miocardio (IAM). A: la concentración sérica del VEGF-A_{165b} antes del sacrificio estaba elevada en ratones que se sufrían IAM comparados con la intervención simulada. La concentración del VEGF-A_{165b} circulante se relacionó indirectamente con la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) (B) y la fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo (FAVI) (C), evaluadas mediante ecocardiografía transtorácica. D: análisis de inmunotransferencia de la expresión de proteínas del VEGF-A_{165b} en muestras miocárdicas infartadas y aisladas de ambos modelos de IAM, comparado con la intervención simulada. E: análisis de densitometría del análisis de inmunofluorescencia del VEGF-A_{165b}. Se incubaron las secciones de miocardio con un anticuerpo antimurino del VEGF-A_{165b} y se visualizó un etiquetado específico y equilibrado con Alexa Fluor 488 (VEGF-A_{165b}, verde). Se capturaron y digitalizaron las imágenes y a continuación se analizaron con el *software* de análisis de Image-Pro Plus. La puntuación se realizó a ciegas en dispositivos codificados. F: imágenes representativas de la hematoxilina-eosina (HE, fila superior), tricrómico de Masson (fila central) e inmunofluorescencia específica para el VEGF-A_{165b} (fila inferior, verde). G: imágenes representativas que muestran la colocalización del CD31/VEGF-A_{165b} en el tejido miocárdico infartado. La inmunoreactividad se visualizó con anticuerpos secundarios de Alexa Fluor 594 (CD31, rojo) y Alexa Fluor 488 (VEGF-A_{165b}, verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). La correlación entre el VEGF-A_{165b} y las variables derivadas de la ecocardiografía (B y C) se evaluó con el coeficiente de correlación de Pearson. Los datos continuos de distribución normal (n = 13 animales por grupo) expresan media ± desviación estándar y se analizaron mediante análisis ANOVA unilateral seguido de la prueba de Bonferroni. *p < 0,05. **p < 0,01 frente a la intervención simulada en A y E. Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

Tabla 1
Parámetros ecocardiográficos previos al sacrificio de los animales en los 5 grupos experimentales

	IAM no reperfundido			IAM reperfundido	
	Simulación (n = 13)	Anti-IgG (n = 10)	Anti-VEGF-A _{165b} (n = 13)	Anti-IgG (n = 12)	Anti-VEGF-A _{165b} (n = 13)
DTDVI (mm)	38,2 ± 3,5	44,4 ± 4,1 ^a	43,5 ± 4,8 ^b	43,8 ± 5,7 ^a	41,9 ± 4,6
FEVI (%)	59,5 ± 8,1	41,4 ± 5,8 ^a	48,6 ± 6,0 ^a	49,8 ± 6,4 ^a	57,1 ± 8,5 ^c
FAVI (%)	35,9 ± 6,3	21,8 ± 5,4 ^a	26,1 ± 5,1 ^a	28,8 ± 4,5 ^a	34,2 ± 6,2 ^c

DTDVI: diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo; FAVI: fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; IAM: infarto agudo de miocardio; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

Los valores expresan media ± desviación estándar y se analizaron mediante la prueba de la t de Student.

^a p < 0,01 frente al grupo con intervención simulada.

^b p < 0,05.

^c p < 0,05 frente a los animales con IAM reperfundido tratado con anticuerpo anti-IgG.

respecto a los animales tratados con anticuerpo anti-IgG (figura 2D,F). En cambio, a pesar del bloqueo del VEGF-A_{165b}, no se observó mejora en la función sistólica en ninguno de los grupos experimentales de IAM no reperfundido (tabla 1).

A continuación, se realizó el análisis macroscópico de los corazones aislados de los 4 grupos experimentales (figura 2A). En los ratones tratados con anticuerpo de isotipo anti-IgG, el tamaño del infarto fue similar entre los distintos grupos de IAM reperfundido y

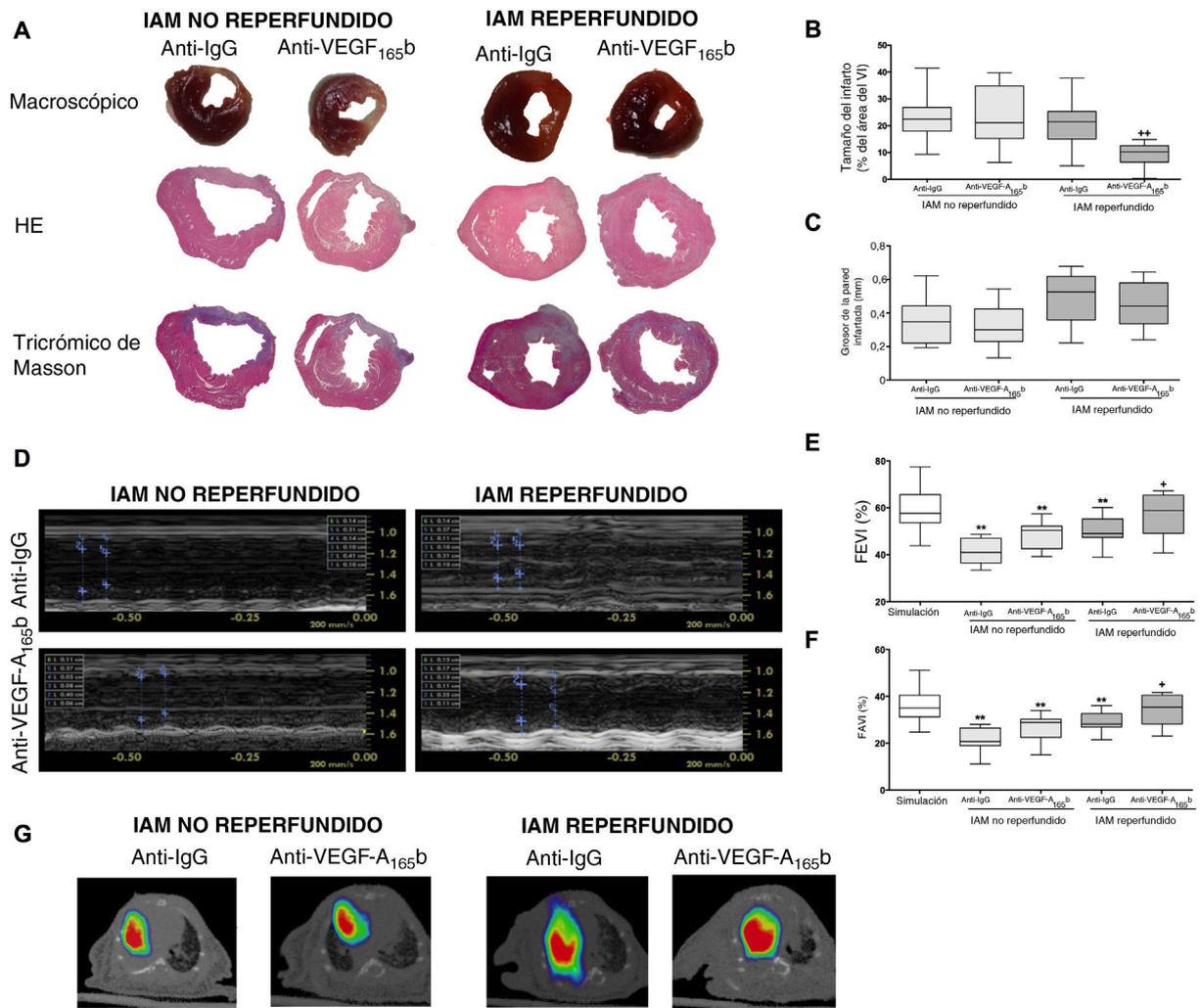


Figura 2. El bloqueo del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-A_{165b} produjo una disminución del tamaño del infarto y una mejora de la función sistólica en modelos de infarto agudo de miocardio (IAM) reperfundido, pero no en modelos no reperfundidos. A: imágenes representativas macroscópicas (fila superior) y microscópicas teñidas con hematoxilina-eosina (HE, fila central), y con tricrómico de Masson (fila inferior). En el modelo de IAM reperfundido, el tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF-A_{165b} específico dio como resultado una reducción en el tamaño del infarto (B), mientras que no se observaron cambios en el grosor de la pared infartada (C). Antes del sacrificio, la función sistólica se evaluaba mediante ecocardiografía con enmascaramiento. D: imágenes representativas de la ecocardiografía en modo M. En el modelo de IAM reperfundido, el tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF-A_{165b} específico produjo una mejora de (E) la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) y (F) la fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo (FAVI), mientras que el tratamiento no tuvo efecto en el modelo de IAM no reperfundido. G: imágenes representativas de la tomografía por emisión de positrones/tomografía computarizada de los 4 grupos de IAM. Los datos continuos de distribución normal (n = 13 ratones por grupo) se expresan como media ± desviación estándar. Los datos se analizaron mediante la prueba de la t de Student para datos no emparejados. Un observador que desconocía el grupo experimental se encargó de la puntuación. VI: ventrículo izquierdo. **p < 0,01 frente al grupo con intervención simulada. *p < 0,05 y **p < 0,01 frente a animales con un IAM reperfundido tratados con anticuerpo anti-IgG. Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

Tabla 2
Análisis de la estructura cardíaca de los 5 grupos experimentales

	IAM no reperfundido			IAM reperfundido	
	Simulación (n = 13)	Anti-IgG (n = 13)	Anti-VEGF-A _{165b} (n = 13)	Anti-IgG (n = 12)	Anti-VEGF-A _{165b} (n = 13)
Área del VI (mm ²)	0,6 ± 0,3	1,0 ± 0,5 ^a	1,3 ± 0,6 ^b	0,7 ± 0,2 ^c	0,8 ± 0,2
Área infartada (mm ²)	0	0,8 ± 0,3	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,2	0,3 ± 0,2 ^d
Tamaño del infarto (%)	0	23,2 ± 7,9	23,6 ± 11,0	20,8 ± 8,8	9,4 ± 4,2 ^d
Grosor de la pared infartada (mm)	0	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1 ^c	0,5 ± 0,1

IAM: infarto agudo de miocardio; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; VI: ventrículo izquierdo. Los valores expresan media ± desviación estándar y se analizaron mediante la prueba de la t de Student.

^a p < 0,05.
^b p < 0,01 frente a la intervención simulada.
^c p < 0,05 frente a los animales con IAM reperfundido tratados con anticuerpo anti-IgG.
^d p < 0,01 frente a animales con IAM reperfundido tratados con anticuerpo anti-IgG.

no reperfundido, mientras que se detectó mayor grosor de la pared infartada y menor volumen del VI en los animales con IAM reperfundido comparados con los de IAM no reperfundido (tabla 2).

Hay que destacar que el tratamiento con un anticuerpo específico anti-VEGF-A₁₆₅b en el modelo de IAM reperfundido redujo el tamaño del infarto respecto al tratamiento con anticuerpo anti-IgG (el $9,4 \pm 4,2\%$ frente al $20,8 \pm 8,8\%$; $p < 0,01$) (figura 2B), pero no se detectaron cambios en el grosor de la pared infartada ($0,5 \pm 0,1$ frente a $0,5 \pm 0,1$ mm) (figura 2C). En cambio, en el modelo de IAM no reperfundido, el bloqueo de la isoforma antiangiogénica VEGF-A₁₆₅b no tuvo efecto en el tamaño del infarto o el grosor de la pared infartada (tabla 2).

Por último, en las imágenes de tomografía por emisión de positrones/tomografía computarizada, el bloqueo del VEGF-A₁₆₅b en ratones con IAM reperfundido redujo el tamaño del infarto (figura 2G). Por consiguiente, para mejorar la función sistólica resultante y minimizar el tamaño del infarto, son necesarios el bloqueo del VEGF-A₁₆₅b y la reperfusión coronaria.

Implicaciones del bloqueo in vivo del VEGF-A₁₆₅b en la neoangiogénesis

Las concentraciones del VEGF-A₁₆₅b circulante fueron similares en los 4 modelos experimentales de IAM independientemente del tratamiento recibido (figura 3A). En los modelos de IAM reperfundido, la densidad de los capilares evaluados mediante inmunohistoquímica fue considerablemente mayor en los animales tratados con anticuerpo anti-VEGF-A₁₆₅b (666 ± 211 células/mm²; $p < 0,05$) frente a anti-IgG (451 ± 115 células/mm²). Sin

embargo, el bloqueo del VEGF-A₁₆₅b no tuvo efecto en la densidad de los capilares en los grupos a los que se aplicó el modelo de IAM no reperfundido (anti-VEGF-A₁₆₅b frente a anti-IgG, 377 ± 60 frente a 478 ± 75 células/mm²) (figura 3B, C). En realidad, el análisis mediante inmunotransferencia (Western blot) reveló un aumento de la expresión de la proteína CD31 en el miocardio infartado aislado de animales con IAM reperfundido tratados con anticuerpo anti-VEGF-A₁₆₅b comparado con anti-IgG (figura 3D).

Comparado con los controles, la fosforilación de la AKT fue considerablemente alta en las muestras cardíacas del grupo con IAM reperfundido, mientras que el bloqueo de la función del VEGF-A₁₆₅b redujo la fosforilación de la AKT (figura 3E). No obstante, la concentración de interleucina 6 circulante no se hallaba alterada en ninguno de los grupos con IAM reperfundido comparado con la intervención simulada (anti-VEGF-A₁₆₅b, $11,1 \pm 3,6$ pg/ml y anti-IgG, $14,9 \pm 5,7$ pg/ml frente a la intervención simulada, $11,7 \pm 3,0$ pg/ml) (figura 3F).

En resumen, el bloqueo del VEGF-A₁₆₅b fomentó la neoangiogénesis, mejoró la función sistólica y redujo el infarto en el modelo de IAM reperfundido, pero no en el de IAM no reperfundido.

La mayor concentración sérica del VEGF-A₁₆₅b en pacientes con IAMCEST se relacionó con función sistólica más reducida en las fases crónicas y con la aparición de MACE durante el seguimiento

Caracterización del VEGF-A₁₆₅b después del IAMCEST

Se cuantificó la concentración sérica del VEGF-A₁₆₅b en muestras extraídas 24 h después de la revascularización coronaria

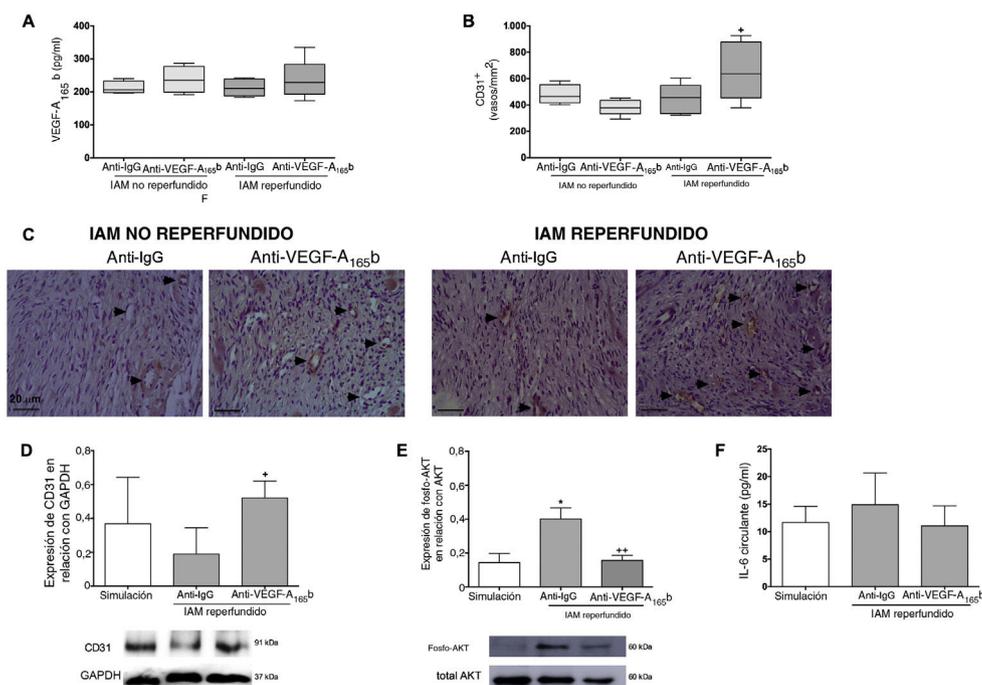


Figura 3. El bloqueo del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-A₁₆₅b aumentó la densidad de los capilares en los animales con infarto agudo de miocardio (IAM) reperfundido, pero no en los que sufrieron un IAM no reperfundido. A: la concentración sérica del VEGF-A₁₆₅b previa al sacrificio fue similar en los 4 grupos experimentales. B: cuantificación de vasos CD31⁺. Se obtuvieron 5 imágenes independientes del área infartada aisladas de los 4 grupos distintos de IAM y a continuación las analizó un observador que desconocía el grupo experimental. C: imágenes representativas del tejido infartado aisladas de los 4 grupos experimentales teñidas con el marcador vascular específico CD31. D: análisis de inmunotransferencia de la expresión de la proteína CD31 en el tejido miocárdico aislado del grupo con intervención simulada y de ambos grupos de IAM reperfundido tratados con anticuerpo bloqueador anti-IgG o anti-VEGF-A₁₆₅b. E: análisis de inmunotransferencia de la relación entre la (fosfo) AKT y la AKT total en el tejido infartado del grupo con intervención simulada y de ambos grupos de IAM reperfundido tratados con anticuerpo bloqueador anti-IgG o anti-VEGF-A₁₆₅b. F: concentración de interleucina 6 (IL-6) circulante de ambos grupos de IAM reperfundido tratados con anticuerpo bloqueador anti-IgG o anti-VEGF-A₁₆₅b. Los datos continuos de distribución normal (n = 13 animales por grupo) se expresan como media ± desviación estándar y se analizaron mediante la prueba de la t de Student para datos no emparejados. * $p < 0,05$ frente a intervención simulada. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ frente a animales con IAM reperfundido tratados con anticuerpo anti-IgG. Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

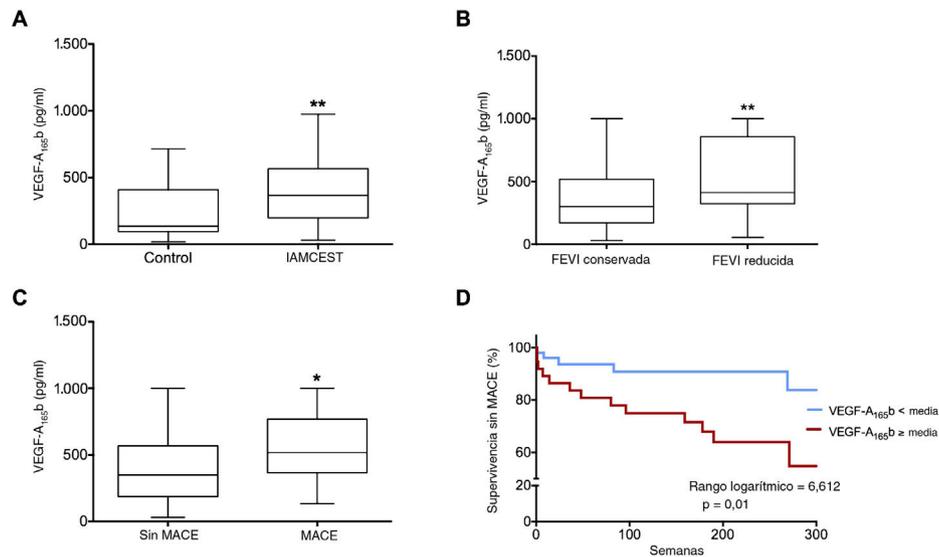


Figura 4. El aumento del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-A_{165b} en pacientes con infarto de miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST) se relacionó con una FEVI más reducida en la resonancia magnética cardiovascular (RMC) a los 6 meses y la aparición de eventos adversos durante el seguimiento. A: la concentración sérica del VEGF-A_{165b} a las 24 h de la reperusión coronaria está aumentada en los pacientes con IAMCEST (n = 104) comparados con los del grupo de control (n = 23). Se detecta una concentración alta del VEGF-A_{165b} en los pacientes con IAMCEST y fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) (B) reducida a los 6 meses y con eventos cardiacos adversos mayores (C) (MACE) (muerte cardiaca, reinfarto o reingreso por insuficiencia cardiaca) durante el seguimiento. D: VEGF-A_{165b} circulante y curvas de resultado de Kaplan-Meier para la supervivencia sin MACE durante el seguimiento, dependiendo de la concentración sérica del VEGF-A_{165b}. Los datos continuos de distribución normal se expresan como media ± error estándar de la media y el intervalo de confianza del 95% (IC95%) y se analizaron mediante la prueba de la t de Student para datos no emparejados. La relación entre la concentración del VEGF-A_{165b} y el tiempo transcurrido hasta el primer MACE (D) se determinó mediante la curva de Kaplan-Meier y la prueba de rangos logarítmicos. *p < 0,05 y **p < 0,01 frente al grupo de control.

de 104 pacientes con IAMCEST y de 25 participantes del grupo de control. La concentración del VEGF-A_{165b} circulante era considerablemente alta en los pacientes con IAMCEST (405 ± 26 pg/ml; IC95%, 355-458 pg/ml; p < 0,01) que en los controles (234 ± 35 pg/ml; IC95%, 161-307) (figura 4A).

Función de la concentración del VEGF-A_{165b} en la función sistólica resultante

A continuación, se procuró evaluar la relación entre la concentración del VEGF-A_{165b} en este momento puntual y la FEVI evaluada mediante RMC a los 6 meses. Para ello, se dividió a los pacientes con IAMCEST según tuvieran la FEVI reducida o conservada. Se detectó una menor concentración del VEGF-A_{165b} circulante al cabo de 24 h de la reperusión coronaria de pacientes con FEVI conservada en la RMC realizada a los 6 meses (conservada, 362 ± 32 pg/ml [IC95%, 298-427] frente a reducida, 533 ± 44 pg/ml [IC95%, 444-621]; p < 0,01) (figura 4B).

Relación entre el VEGF-A_{165b} y la aparición de MACE

Durante el seguimiento (mediana, 186 [33-242] semanas), se produjeron 21 MACE (5 muertes cardiacas, 9 infartos de miocardio no mortales y 7 reingresos por insuficiencia cardiaca).

Los pacientes con MACE mostraron mayor concentración sérica del VEGF-A_{165b} (552 ± 56 pg/ml; IC95%, 435-670; p < 0,05) que los pacientes sin MACE (413 ± 32 pg/ml; IC95%, 350-475) (figura 4C). En realidad, tal como puede observarse en el análisis de las curvas de supervivencia (figura 4D), la concentración del VEGF-A_{165b} > 405 pg/ml (media) se relacionó estrechamente con un aumento de la probabilidad de MACE (inferior el 10% frente a superior el 35%; p < 0,01). Así pues, en los pacientes con IAMCEST, los

valores del VEGF-A_{165b} durante las primeras 24 h de la reperusión se relacionaron con un mayor riesgo de eventos cardiacos durante el seguimiento.

DISCUSIÓN

Las concentraciones sérica y miocárdica del VEGF-A_{165b} habían aumentado considerablemente en los 2 modelos murinos experimentales (IAM reperfundido y no reperfundido) y se relacionaron con una función sistólica más reducida según la ecocardiografía. En resumen, el bloqueo del VEGF-A_{165b} mejoró la densidad de los capilares, redujo el tamaño del infarto y aumentó la función sistólica en el modelo de IAM reperfundido, pero no en el no reperfundido. Por último, en una cohorte de pacientes con IAMCEST, la mayor concentración sérica del VEGF-A_{165b} se correlacionó con una FEVI reducida según la RMC realizada en la fase crónica (6 meses) tras el IAM y con la aparición de MACE durante el seguimiento.

En pacientes con IAMCEST, hay que realizar una reperusión coronaria inmediata para minimizar el tamaño del infarto y aumentar la esperanza de vida de los pacientes. A pesar de una reperusión epicárdica satisfactoria, la microvasculatura se halla afectada en un 50-60% de los pacientes. Este fenómeno, conocido como obstrucción microvascular, desempeña una función perjudicial en la afección estructural resultante y en la supervivencia de los pacientes con IAMCEST^{1,2}. No obstante, los estudios clínicos y experimentales han demostrado claramente la reparación espontánea de la microcirculación tras el IAMCEST, probablemente por el aumento endógeno de los factores proangiogénicos poco después de inducir el IAM⁷.

Se ha estudiado la angiogénesis como un potente mecanismo para reparar la pérdida de la microcirculación tras el IAM que

produce efectos favorables en la curación del infarto, la recuperación sistólica y la oportuna remodelación del VI. La angiogénesis consiste en la formación de nuevos microvasos a partir de capilares preexistentes como respuesta a señales y factores diversos³. En consecuencia, es crucial comprender qué vías fisiopatológicas facilitan la angiogénesis a la hora de buscar alternativas terapéuticas complementarias, aparte de la reperfusión coronaria inmediata, para minimizar la carga del IAM en términos de morbilidad y mortalidad.

Función del VEGF-A_{165b} en ratones que sufren un IAM

El VEGF-A interviene de manera activa en la reparación tisular regulando la angiogénesis, la permeabilidad vascular y la inflamación. Tras el IAM, se ha evaluado su función en suero y en el miocardio infartado tanto en pacientes como en modelos experimentales⁴. No obstante, el proceso de *splicing* alternativo del VEGF-A produce varias isoformas de ARNm, que incluyen una selección distal del sitio de corte y empalme en el exón 8 para generar una secuencia de exón 8 b, que produce la isoforma antiangiogénica VEGF-A_{165b}⁵. En estados angiogénicos patológicos, tales como la retinopatía diabética y el cáncer, se observa que la concentración del VEGF-A_{165b} disminuye^{8,9}. En cambio, el VEGF-A_{165b} se relaciona con una menor densidad de capilares en la arteriopatía periférica^{10,11}. En particular tras el IAM, un estudio anterior informó por primera vez de que la concentración del VEGF-A_{165b} circulante se incrementó rápidamente en las primeras fases (1 semana) en pacientes con IAMCEST, lo que indica que esta isoforma también puede contribuir a alterar la neovascularización en la fase aguda posterior al IAM⁶.

Puesto que hasta ahora ningún estudio *in vivo* ha investigado la función del VEGF-A_{165b} tras un IAM, nuestro objetivo era dilucidar la función de la isoforma del VEGF-A_{165b} en 2 modelos de IAM experimentales: IAM reperfundido y IAM no reperfundido.

Según los resultados obtenidos, la concentración del VEGF-A_{165b} circulante aumentó en ambos modelos murinos, y una mayor concentración sérica de este factor antiangiogénico se relacionó con menores FEVI y FAVI. Además, cuando se evaluó el área infartada de ambos modelos de IAM, se detectó un aumento de la expresión del VEGF-A_{165b}, principalmente en las células endoteliales. Así pues, la regulación del proceso de *splicing* en el VEGF-A también es importante en el contexto del IAM en ratones.

Bloqueo del VEGF-A_{165b} como potente diana para recuperar la densidad de los capilares y aumentar la función sistólica tras el IAM

Con respecto a los resultados clínicos⁶ y experimentales previos, se especuló que una concentración alta del VEGF-A_{165b} circulante podría obstaculizar la tendencia endógena hacia la recuperación de la perfusión microvascular. De hecho, cuando se utilizó un test de diferenciación de células endoteliales *in vitro*, el bloqueo del VEGF-A_{165b} aumentó la capacidad angiogénica del suero de los pacientes con IAMCEST⁶. En realidad, en un estudio previo realizado con un modelo murino de arteriopatía periférica, se demostró que el tratamiento con un anticuerpo bloqueador contra la isoforma del VEGF-A_{165b} revertía la revascularización alterada en la extremidad posterior isquémica^{10,11}.

En el contexto de un IAM, los estudios clínicos y experimentales han demostrado que, aunque la densidad de los microvasos disminuya unos minutos después de la oclusión coronaria, poco después de la reperfusión coronaria se produce obstrucción microvascular masiva y macroscópica^{2,7}. Este fenómeno se restaura espontáneamente debido a que aumenta la expresión

de los factores proangiogénicos inmediatamente después del inicio de la isquemia⁷. Por lo tanto, investigar el bloqueo funcional del VEGF-A_{165b} en un modelo básico de IAM debería ser el primer paso para descubrir una nueva y prometedora opción terapéutica para acelerar la neoangiogénesis en el área infartada.

Comparados con el grupo con IAM no reperfundido, el grosor de la pared infartada de los ratones sometidos a reperfusión coronaria era mayor, mientras que la FEVI y el tamaño del infarto seguían alterados. La reperfusión coronaria oportuna es el principal objetivo terapéutico para minimizar la apoptosis irreversible de los cardiomiocitos y, por lo tanto, reducir la lesión cardiaca. No obstante, aunque la reperfusión temprana es necesaria por la remodelación adversa, en los estudios clínicos y experimentales se ha observado su relación con estrés hemodinámico y oxidativo^{1,12}. En consecuencia, descubrir nuevos tratamientos complementarios además de la reperfusión disminuirá aún más el tamaño del infarto y mejorará el resultado de los pacientes.

En este contexto, se observó que el bloqueo de la actividad del VEGF-A_{165b} en ratones sometidos a 45 min de isquemia seguida de 21 días de reperfusión coronaria aumentaba considerablemente la densidad de los capilares, disminuía el tamaño del infarto y mejoraba la función sistólica. No obstante, no se observaron estos efectos favorables en el modelo de IAM no reperfundido. Según los resultados *in vivo*, el VEGF-A_{165b} podría ser un prometedor tratamiento complementario a la reperfusión para disminuir aún más el tamaño del infarto y el daño microvascular.

Para comprender el mecanismo de acción del VEGF-A_{165b}, se evaluó la expresión de AKT, dada su participación en múltiples vías de señalización en la regulación de la angiogénesis mediada por el VEGF-A¹³. Los datos presentes indican que la vía de señalización de la AKT se activa después del IAM y que el efecto antiangiogénico del VEGF-A_{165b} podría estar causado en parte por la activación de la AKT.

Se ha informado de que el VEGF-A_{165b} reduce el factor de necrosis tumoral alfa en las células epiteliales pigmentadas de la retina y, en consecuencia, tiene efectos antiinflamatorios⁹. No obstante, según los resultados, la concentración de interleucina 6 en ambos grupos de IAM reperfundido 21 días después del IAM fue similar a la de los controles, probablemente debido a la casi completa resolución del ambiente proinflamatorio que aparece durante los primeros días tras la inducción del IAM.

En conclusión, el VEGF-A_{165b} puede representar un nuevo objetivo farmacológico complementario a la reperfusión coronaria (el actual tratamiento de referencia para pacientes con IAMCEST), ya que su bloqueo podría aumentar la actividad de los factores de crecimiento proangiogénicos liberados desde el inicio de la isquemia⁷.

Implicaciones sistólicas y de pronóstico del VEGF-A_{165b} en pacientes con IAMCEST

La alteración de la microcirculación en pacientes con IAMCEST se relaciona con la remodelación ventricular adversa y con la aparición de eventos cardíacos durante el seguimiento^{1,2}. En consecuencia, comprender la función de un nuevo y potente regulador de la angiogénesis en este contexto podría ser crucial.

Tal como se observó anteriormente en una cohorte preliminar de 50 pacientes⁶ y como se ha confirmado aquí, la concentración del VEGF-A_{165b} circulante está considerablemente elevada en los pacientes con IAMCEST comparados con los pacientes sanos. En realidad, se ha demostrado una mayor expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de este factor antiangiogénico en la sangre periférica de pacientes con enfermedad coronaria¹⁴. Aunque ya se ha informado de que los valores altos del VEGF-A_{165b} se relacionan con función sistólica afectada en la fase aguda (1 semana después del IAM), la novedad de este estudio radica en

relacionar los valores del VEGF-A_{165b} circulante con la función sistólica resultante en la fase crónica (6 meses después del IAM) y el pronóstico de los pacientes de la que es hasta ahora la mayor cohorte de pacientes con IAMCEST. Según los resultados, la mayor concentración sérica del VEGF-A_{165b} se relaciona con función del VI más reducida según la RMC en la fase crónica (6 meses) posterior al IAM y con la aparición de MACE durante el seguimiento. Harada et al.¹⁵ también observaron la función de esta isoforma en el pronóstico del paciente en una cohorte de pacientes con IAMCEST muy pequeña.

Nuestro objetivo específico es establecer una relación entre este nuevo factor y la función del VI, ambos en las fases aguda⁶ y crónica, así como en lo que respecta al pronóstico de los pacientes. En este estudio, la intención no es demostrar su valor independiente para la estratificación del riesgo de los pacientes con IAMCEST más allá del arsenal ya disponible para este objetivo.

En resumen, y con respecto a los resultados clínicos y experimentales, la mayor concentración del VEGF-A_{165b} se relacionó con peores función sistólica y pronóstico del paciente. Esto probablemente se deba a su interferencia en el restablecimiento fisiológico endógeno de la microcirculación afectada impulsado por el aumento de moléculas proangiogénicas en la región infartada⁷. De ahí que el bloqueo del VEGF-A_{165b} pueda representar una estrategia terapéutica prometedora para mejorar la angiogénesis tras el IAMCEST y, por lo tanto, aumentar la función sistólica y la esperanza de vida de los pacientes.

Limitaciones del estudio

Dado el reducido número de pacientes, esta es solo una prueba de concepto para explorar un marcador en un modelo animal y en un pequeño número de pacientes. Se requiere otra validación en una cohorte de pacientes con IAMCEST más amplia.

CONCLUSIONES

Se proporcionan pruebas de que el VEGF-A_{165b} endógeno está considerablemente aumentado en modelos animales experimentales de IAM y en pacientes con IAMCEST. Su neutralización *in vivo* fomenta la angiogénesis, reduce el tamaño del infarto y aumenta la función sistólica siempre que se permita la reperfusión. En pacientes con IAMCEST, la mayor concentración de esta isoforma se correlaciona con peor función sistólica y con mayor incidencia de eventos adversos durante el seguimiento. La modulación farmacológica del VEGF-A_{165b} podría ser un nuevo objetivo posible como tratamiento complementario a la reperfusión coronaria y merece más investigación clínica.

FINANCIACIÓN

Este estudio fue financiado por el Instituto de Salud Carlos III y los Fondos Europeos de Desarrollo Regional FEDER (subvenciones de investigación PIE15/00013, PI17/01836, PI18/00209 y CIBERC16/11/00486 y un contrato de posgrado FI18/00320 a C.R.-N. y FI19/00033 a L.H.); el Ministerio de Economía y Competitividad de España (SAF2017-89714-R); por la Sociedad Española de Cardiología (subvención SEC2017), y por la Generalitat Valenciana (GV/2018/116, CDEI-04/20 y AICO/2019/250).

CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

¿QUÉ SE SABE DEL TEMA?

- A pesar de la revascularización completa, la microvasculatura miocárdica se halla alterada en aproximadamente el 50% de los pacientes con IAM. Es fundamental descubrir tratamientos complementarios para disminuir la afección microvascular. La angiogénesis ayuda a restablecer la microvasculatura afectada tras el IAM. El objetivo es evaluar la función de la isoforma antiangiogénica del VEGF-A_{165b}.

¿QUÉ APORTA DE NUEVO?

- Se demuestra que los modelos experimentales de IAM muestran concentraciones del VEGF-A_{165b} circulante y miocárdico aumentadas. Su bloqueo *in vivo* aumentó la neoangiogénesis, redujo el tamaño del infarto y mejoró la función sistólica en los modelos de IAM reperfundido, pero no en los de IAM no reperfundido. En los pacientes, la mayor concentración del VEGF-A_{165b} se relacionó con una fracción de eyección reducida y con peor pronóstico. El bloqueo de este factor antiangiogénico puede tener efectos favorables después del IAM.

ANEXO. MATERIAL ADICIONAL

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2020.03.029>

BIBLIOGRAFÍA

- Ibañez B, Heusch G, Ovize M, van de Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:1454–1471.
- Niccoli G, Scalone G, Lerman A, Crea F. Coronary microvascular obstruction in acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2016;37:1024–1033.
- Cochain C, Channon KM, Silvestre JS. Angiogenesis in the infarcted myocardium. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013;18:1100–1113.
- Banai S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 1994;28:1176–1179.
- Qiu Y, Hoareau-Aveilla C, Oltean S, Harper SJ, Bates DO. The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease. *Biochem Soc Trans*. 2009;37:1207–1213.
- Hueso L, Ríos-Navarro C, Ruiz-Sauri A, et al. Dynamics and implications of circulating anti-angiogenic VEGF-A_{165b} isoform in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Sci Rep*. 2017;7:9962.
- Ríos-Navarro C, Hueso L, Miñana G, et al. Coronary serum obtained after myocardial infarction induces angiogenesis and microvascular obstruction repair. Role of hypoxia-inducible factor-1A. *Rev Esp Cardiol*. 2018;71:440–449.
- Bates DO, Cui TG, Doughty JM, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2002;62:4123–4131.
- Ved N, Hulse RP, Bestall SM, Donaldson LF, Bainbridge JW, Bates DO. Vascular endothelial growth factor-A165b ameliorates outer-retinal barrier and vascular dysfunction in the diabetic retina. *Clin Sci*. 2017;131:1225–1243.
- Kikuchi R, Nakamura K, MacLaughlan S, et al. An antiangiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease. *Nat Med*. 2014;20:1464–1471.
- Ganta VC, Choi M, Kutateladze A, Annex BH. VEGF165b modulates endothelial VEGFR1-STAT3 signaling pathway and angiogenesis in human and experimental peripheral arterial disease. *Circ Res*. 2017;131:282–295.
- Davidson SM, Ferdinandy P, Andreadou I, et al. Multitarget strategies to reduce myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73:89–99.
- Shiojima I, Walsh K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes Dev*. 2006;20:3347–3365.
- Latorre E, Pilling LC, Lee BP, et al. The VEGFA165b isoform is dysregulated in senescent endothelial cells and may be associated with prevalent and incident coronary heart disease. *Clin Sci*. 2018;132:313–325.
- Harada K, Kikuchi R, Ishii H, et al. Association between the ratio of anti-angiogenic isoform of VEGF-A to total VEGF-A and adverse clinical outcomes in patients after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol Heart Vasc*. 2018;19:3–7.