

Revisión general

Proliferación vascular en las extremidades isquémicas: una revisión de los mecanismos y posible estimulación terapéutica

V. van Weel^{1,2}, R.B. van Tongeren¹, V.W.M. van Hinsbergh³, J.H. van Bockel¹
y P.H.A. Quax^{1,2}, Leiden y Ámsterdam, Países Bajos

La estimulación de la proliferación vascular para tratar la isquemia de las extremidades es prometedora, y los resultados obtenidos a partir de ensayos clínicos no controlados, que utilizaron agentes angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular, dieron lugar a grandes expectativas. No obstante, los resultados negativos de los ensayos controlados con placebo publicados recientemente justifican una investigación adicional. En la presente revisión se abordan los conocimientos actuales sobre los mecanismos de proliferación vascular en el adulto, en particular el papel de los factores angiogénicos, sistema inmunitario y médula ósea, junto con los modos de estimulación terapéutica y los resultados de ensayos clínicos recientes. Hasta la fecha, se han descrito tres conceptos de proliferación vascular: angiogénesis, vasculogénesis y arteriogénesis (crecimiento de arterias colaterales), que representan diferentes aspectos de un proceso integrado. La estimulación de la arteriogénesis parece clínicamente más congruente y se ha ensayado recientemente usando trasplante de médula ósea autógena con algunos resultados beneficiosos, aunque el mecanismo de acción no está completamente esclarecido. La mejor comprensión de los complejos mecanismos moleculares y celulares de la proliferación vascular podría dar lugar al establecimiento de aplicaciones clínicas significativas.

INTRODUCCIÓN

La arteriopatía obstructiva periférica (AOP), causada principalmente por la aterosclerosis, es un importante problema conocido por afectar al 10-15% de la población adulta de edad avanzada. Al principio, puede estar presente sin síntomas, pero con una progresión adicional puede dar lugar a un cuadro

de claudicación intermitente. La enfermedad avanzada se caracteriza por dolor en reposo y ulceración o gangrena de los tejidos isquémicos, agrupados con el término de isquemia crítica de la extremidad¹. Frecuentemente, la AOP no se limita a la extremidad inferior, por lo que provoca además una mayor mortalidad debida a acontecimientos vasculares cerebrales o infarto de miocardio². En caso de progresión con oclusiones vasculares en múltiples niveles y, en particular, en vasos crurales con mala salida y flujo limitado, las opciones para realizar intervenciones vasculares específicas, como la angioplastia transluminal percutánea, la implantación de un *stent*, o la cirugía de derivación, disminuyen. Al cabo de un año, la amputación digital, del pie o de la extremidad isquémicos, es la única opción debido a la respuesta insuficiente a los tratamientos en el 50% de los pacientes con isquemia crítica de la extremidad³. La mayoría de los pacientes amputados presentan en el estudio angiográfico una red arterial colateral inadecuada. En este contexto, la

DOI of original article: 10.1016/j.avsg.2008.02.017.

¹Department of Surgery, Leiden University Medical Center, Leiden, Países Bajos.

²Gaubius Laboratory, Nederlandse Organisatie voor toegepast-natuurwetenschappelijkonderzoek, Leiden, Países Bajos.

³Department of Physiology, Institute for Cardiovascular Research, Vrije Universiteit, Medical Center, Ámsterdam, Países Bajos.

Correspondencia: Vincent van Weel, MC Haaglanden, Westeinde, Lijnbaan 32, PO Box 432, 2501 CK The Hague, Países Bajos. Correo electrónico: vincentvanweel@hotmail.com

Ann Vasc Surg 2008; 22: 582-597

DOI: 10.1016/j.avsp.2008.09.013

© *Annals of Vascular Surgery Inc.*

Publicado en la red: 27 de mayo de 2008

búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para las necesidades no satisfechas de estos pacientes “sin opciones” ha impulsado la revascularización biológica. Se han puesto en marcha ensayos clínicos para el estudio del tratamiento con factores de crecimiento angiogénico en pacientes con AOP y coronariopatía. El objetivo de esta revisión está centrado principalmente en los mecanismos de adaptación vascular a la isquemia de la extremidad y su estimulación como tratamiento de la AOP.

MECANISMOS BÁSICOS DE LA PROLIFERACIÓN VASCULAR

Tres Principios: Angiogénesis, Vasculogénesis, y Arteriogénesis

La neovascularización desempeña un importante papel en la salud y en la enfermedad. En fisiología, desempeña un papel en la embriogénesis y el desarrollo, el sistema reproductor femenino y la cicatrización de las heridas. Por otra parte, la neovascularización también participa en el desarrollo de una gran variedad de enfermedades. Desde hace mucho tiempo se ha reconocido que la proliferación excesiva de los vasos es un importante factor de contribución en la patogenia de cáncer, la aterosclerosis, la retinopatía diabética, la psoriasis y la artrosis. Por el contrario, la proliferación insuficiente de los vasos se asocia a trastornos isquémicos cardíacos, de miembros inferiores y cerebrales; neurodegeneración; preeclampsia; y osteoporosis⁴. Recientemente, se han hecho importantes progresos en la comprensión de los mecanismos fundamentales de la formación vascular tanto en el adulto como en la embriogénesis. Hasta el momento, se han descrito tres conceptos de neovascularización⁵ (angiogénesis, vasculogénesis y arteriogénesis), que representan diferentes aspectos de un mismo proceso (fig. 1).

La *angiogénesis* se relaciona con la proliferación de nuevas estructuras de tipo capilar a partir de la vascularización existente⁴ y está regulada por factores proangiogénicos y antiangiogénicos^{6,7}. La hipoxia es un estímulo potente, que induce factores proangiogénicos, como el factor A de crecimiento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF-A), mediante la activación del factor inducible por la hipoxia 1α (*hypoxia-inducible factor 1\alpha*, HIF-1 α). Durante la formación de nuevos microvasos, se pueden distinguir una serie de acontecimientos secuenciales, que consisten en la degradación de la membrana basal vascular y la matriz intersticial por las células endoteliales, la migración de dichas células, la proliferación endotelial y la formación de

nuevos vasos capilares y una nueva membrana basal⁸. Estos vasos recién formados son estabilizados posteriormente por los pericitos o células musculares lisas (*smooth muscle cell*, CML) circundantes.

La *vasculogénesis* fue definida originalmente por Risau y Flamme⁹ como la formación de un plexo capilar a partir de las islas de sangre y en la actualidad se usa habitualmente para la intususcepción de células progenitoras derivadas de la médula ósea en el área vascular en expansión⁴. Estas células se trataron principalmente como células progenitoras endoteliales¹⁰ (*endothelial progenitor cells*, EPC) y se han identificado en sangre periférica^{11,12}. Además, se ha demostrado que contribuyen a la neovascularización en el adulto^{13,14}. Hasta el momento, sigue por dilucidar cómo estas células derivadas de la médula ósea (*bone marrow-derived cells*, CMO) contribuyen exactamente a la neovascularización. Rara vez se ha descrito una incorporación sustancial de las EPC a la pared del vaso^{15,16} y, con frecuencia, su contribución sólo fue menor¹⁷⁻²⁰ dando lugar a una función paracrina de las células mediante la secreción de factores angiogénicos como acción más probable^{21,22}. Se ha documentado también que las CMO progenitoras no endoteliales contribuyen de forma paracrina a la angiogénesis/vasculogénesis inducida por la isquemia²³.

La *arteriogénesis de adaptación*, o simplemente “arteriogénesis”, fue descrita por Wolfgang Schaper et al como el desarrollo de arterias colaterales adultas a partir de una red de arteriolas preexistente²⁴. Mediante la arteriogénesis, se desarrolla una derivación natural alrededor de una arteria principal ocluida. Esta proliferación arterial colateral se produce sobre todo proximalmente a los tejidos isquémicos, donde tiene lugar la angiogénesis y vasculogénesis (fig. 1). Comparada con estos procesos, la arteriogénesis es estimulada sobre todo por la inflamación y no parece estar determinada por la hipoxia. En estudios experimentales efectuados en conejos^{25,26}, la proliferación colateral angiográfica no se asoció con la producción de productos intermedios metabólicos indicativos de isquemia o con la expresión de genes inducibles por la hipoxia, como VEGF o HIF-1. Además, el curso cronológico de la proliferación capilar y la proliferación de colaterales fue diferente: los capilares se formaron 5 días después de la extracción de la arteria femoral, y esto se asoció a un aumento de la liberación de lactato en plasma y de la expresión de VEGF en el músculo aductor, mientras que la proliferación de colaterales tuvo lugar a los 10 días, en ausencia de los signos de isquemia mencionados previamente. Por otra parte, se dispone de pruebas de que la arteriogénesis está

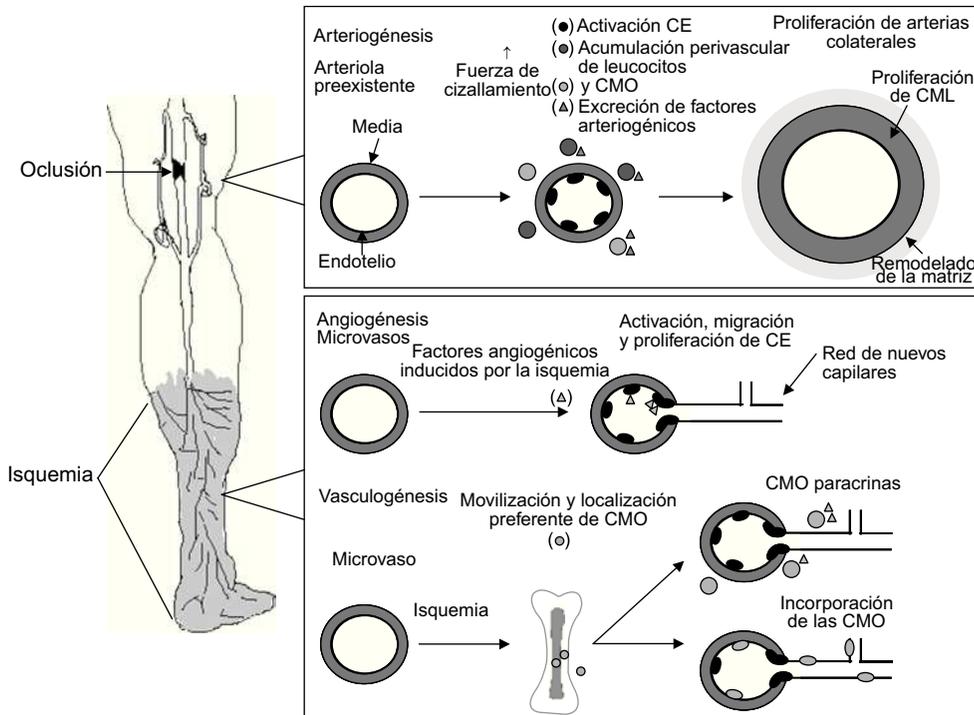


Fig. 1. Representación esquemática de la arteriogénesis, angiogénesis y vasculogénesis. EC: célula endotelial; SMC: célula muscular lisa; BMC: célula de la médula ósea.

desencadenada por el aumento de la fuerza de cizallamiento a través de arteriolas preexistentes específicas, mediante las que se activa la pared del vaso. Esto provoca la regulación al alza de las moléculas de adhesión de los leucocitos, como la molécula 1 de adhesión intercelular²⁷ (*intercellular adhesion molecule*, ICAM-1), seguido de la adhesión y transmigración de los leucocitos. Estos leucocitos pueden secretar factores adicionales, que dan lugar a la proliferación de arterias colaterales con engrosamiento de la media y aumento del contenido de CML de la pared vascular²⁸. Además, la degradación del tejido conectivo que rodea las arterias colaterales mediado, por ejemplo, por las metaloproteinasas facilita su remodelado^{29,30}.

Probablemente, los tres conceptos de formación vascular descritos previamente desempeñan un papel en la neovascularización del adulto y suelen producirse simultáneamente a diferentes niveles. No obstante, se debe tener en cuenta que en la distinción entre angiogénesis, vasculogénesis y arteriogénesis se presentan aspectos que las confunden. Comparten mecanismos comunes, como la invasión de las células inflamatorias y la expresión de factores de crecimiento y citocinas. En el adulto, la *vasculogénesis* es simplemente un término para la angiogénesis relacionada con la intususcepción de las células progenitoras en las nuevas estructuras

vascular y a su alrededor. Además, la arteriogénesis no sólo puede estar desencadenada por factores arteriogénicos inducidos por la fuerza de cizallamiento sino también por factores angiogénicos circulantes producidos en los tejidos isquémicos a distancia. Al contrario de la extremidad, la obstrucción arterial en el corazón se sitúa cerca de las regiones isquémicas en la inmensa mayoría de los casos. En consecuencia, la arteriogénesis y la angiogénesis que se desarrollan en el corazón tienen lugar en estrecha proximidad la una de la otra, posiblemente influyéndose entre sí mediante la expresión de factores de crecimiento.

Factores de crecimiento angiogénicos y arteriogénicos: estimulación satisfactoria de la neovascularización en modelos animales

Se ha demostrado que numerosos factores de crecimiento vascular, pero también citocinas y quimocinas inflamatorias, favorecen la angiogénesis, vasculogénesis y/o arteriogénesis en cultivos celulares o en modelos animales. La angiogénesis y vasculogénesis suelen ser estimuladas por la inducción de factores angiogénicos, en particular por la activación de HIF-1 α . Éste es un factor de transcripción que regula al alza una serie de genes proangiogénicos,

como el VEGF, el receptor 2 de VEGF, el factor derivado de células del estroma 1 (stromal cell-derived factor 1) y su receptor el CXCR4, la angiopoyetina 2 y la eritropoyetina (Epo), dando lugar a una respuesta angiogénica coordinada. Se ha demostrado que numerosos factores de crecimiento desempeñan un papel en la angiogénesis, vasculogénesis y arteriogénesis *in vivo* (tabla I). Además, la mayor parte de estos agentes favorecen eficazmente la proliferación vascular en modelos animales de extremidad isquémica. No obstante, los resultados en estudios controlados con placebo realizados hasta el momento han sido menos beneficiosos. Esto puede explicarse por el hecho de que los modelos animales actuales adolecen de limitaciones considerables: en primer lugar, se usan animales "sanos" en los que las oclusiones de la arteria femoral representan un proceso isquémico agudo, mientras que los pacientes con arteriopatía experimentan diversas alteraciones metabólicas que desembocan en un proceso isquémico crónico. Por otra parte, se han documentado diferencias en los patrones de expresión de VEGF endógeno en el músculo isquémico de modelos animales en conejos después de oclusión de la arteria femoral al compararlos con el material obtenido en muestras procedentes de amputación humana⁶⁵. Otra limitación es que los resultados de los modelos de extremidad isquémica dependen en buena parte de la técnica quirúrgica aplicada. Numerosos grupos de investigación han usado un modelo de extirpación completa de la arteria femoral y de sus ramas colaterales, que se ha traducido en una isquemia profunda y en la formación principalmente de capilares. Otros grupos han aplicado una oclusión segmentaria de la arteria femoral proximal, más apropiada para el estudio de la proliferación de arterias colaterales. La diversidad de técnicas quirúrgicas junto con la gran variedad de criterios de valoración aplicados (puntuación clínica, determinación del flujo sanguíneo mediante láser Doppler, microesferas, sondas de flujo o angiografía por resonancia magnética [en los estudios necrópsicos], tomografía computarizada [TC], e histología) justifican una interpretación cuidadosa de los resultados derivados de estos modelos⁶⁶.

Los factores de crecimiento vascular pueden contribuir de diferentes modos a la formación de nuevos vasos en función de los tipos de célula en la que se expresan sus receptores. El VEGF es el factor proangiogénico más importante y más extensamente estudiado.

Los embriones múridos homocigotos e incluso heterocigotos con déficit de VEGF muestran un fenotipo letal debido a una formación de vasos sanguíneos anómalos⁶⁷. Se han identificado dianas

moleculares para la familia de genes VEGF: los receptores 1 y 2 del VEGF (VEGFR1 y VEGFR2) para el VEGF-A, el VEGFR1 para el VEGF-B y el factor de crecimiento placentario (*placental growth factor*, PlGF), el VEGFR2 y el VEGFR3 para el VEGF-C y el VEGF-D^{68,69}. Estos últimos contribuyen a la linfangiogénesis a través del VEGFR3^{68,69}. Una gran variedad de células, como las endoteliales, las células progenitoras hematopoyéticas y los monocitos, responden al VEGF-A a través del VEGFR1 o del VEGFR2. Esto indica que el VEGF-A (indicado en adelante como VEGF) desempeña un papel en la angiogénesis, vasculogénesis y arteriogénesis. Actualmente, la proteína 1 quimioatrayente de macrófagos (*macrophage chemoattractant protein 1*, MCP-1) y el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) centran la investigación sobre la arteriogénesis. La MCP-1 activa el receptor 2 de la quimocinas C-C (*C-C chemokine receptor-2*, CCR-2) en los monocitos, ejerciendo por tanto su efecto sobre la formación de colaterales⁷⁰. El receptor GM-CSF se expresa en diversos tipos celulares, como en las células hematopoyéticas, los monocitos, las células endoteliales y los cardiomiocitos.

Papel de los componentes celulares: células vasculares, células inflamatorias y células progenitoras

Las células endoteliales son los vectores de la angiogénesis. Son activadas por factores de crecimiento vascular, como el VEGF. Por sí mismas, las células endoteliales (humanas) en cultivo son capaces de formar vasos similares a los capilares en matrices tridimensionales en presencia de VEGF⁷¹. De forma parecida, la sobreexpresión de VEGF en los tejidos provoca una proliferación inicialmente rápida de vasos endoteliales inmaduros²³. No obstante, estos nuevos microvasos carecen de una capa de células murales estabilizadoras alrededor de su endotelio, que debe estabilizarse por los pericitos. La formación de esta neovascularización inmadura y con extravasaciones *in vivo* puede ser una importante limitación de la angiogénesis terapéutica utilizando un factor de crecimiento individual selectivo de la célula endotelial, según lo propuesto para la genoterapia con VEGF^{42,72} (inicialmente denominado "factor de permeabilidad vascular"). Esto sugiere la importante contribución de factores de crecimiento adicionales, como el factor 2 de crecimiento fibroblástico (*fibroblast growth factor 2*, FGF-2), del que se ha demostrado que actúa a nivel de la proliferación de las CML. Además, se ha documentado que una diversidad de tipos de células

Tabla I. Efecto de algunos importantes factores del crecimiento sobre la angiogénesis, vasculogénesis y arteriogénesis *in vivo*

Factor de crecimiento	Angiogénesis/ vasculogénesis	Modelo	Bibliografía	Arteriogénesis	Modelo	Bibliografía
VEGF-A	++	Extremidad isquémica en conejos, múridos	31, 32	+	Extremidad isquémica conejo	33
VEGF-B	+/-	Implantes matrigel, piel en múridos, extremidad isquémica en conejos	34, 35	¿?		
VEGF-C	+ linfangiogénesis +	Extremidad isquémica en conejos	36	+	Extremidad isquémica en conejos	36
VEGF-D	++ linfangiogénesis ++	Extremidad isquémica en conejos	35	++	Extremidad isquémica en conejos	35
PlGF	+	Extremidad isquémica en conejos, múridos	33, 37	++	Extremidad isquémica en conejos, múridos	33, 37
SDF-1	++	Extremidad isquémica en múridos	38	+	Extremidad isquémica en ratas	39
FGF-2	++	Extremidad isquémica en múridos, conejos	40, 41	++	Extremidad isquémica en múridos, conejos	40, 41
Angiopoyetina-1	++	Extremidad isquémica en conejos	42	++	Extremidad isquémica en conejos	42
Angiopoyetina-2	-	Extremidad isquémica en conejos, múridos	42, 43	-	Extremidad isquémica en conejos, múridos	42, 43
HGF	++	Extremidad isquémica en ratas, conejos	44	++	Extremidad isquémica en ratas, conejos	44
IGF	++	Extremidad isquémica en múridos	45	¿?		
Calicreína tisular	++	Extremidad isquémica en múridos	46	¿?		
Eritropoyetina	++	Extremidad isquémica en múridos	47	+/?	Extremidad isquémica en múridos	48
HIF-1 α (gen interruptor)	++	Extremidad isquémica en conejos	49	+/0	Extremidad isquémica en conejos	25, 49
EGR-1 (gen interruptor)	++	Implantes matrigel, tumor en ratones, córnea en ratas	50	++	Extremidad isquémica en múridos	51
PR39 (gen interruptor)	++	Miocardio en múridos	52	++	Miocardio en cerdos, extremidad isquémica en múridos	53, 54
GM-CSF	-	Melanoma en múridos	55	++	Extremidad isquémica en conejos	56
TNF- α	++	Córnea en ratas, membrana corioalantoidea en pollos	57	++	Extremidad isquémica en múridos	58
TGF- β	+/-	Estudios de desarrollo en ratones	59	++	Extremidad isquémica en conejos	60
MCP-1	++	Membrana corioalantoidea en pollos	61	++	Extremidad isquémica en conejos	62
CD44	++	Matrigel, tumor, herida en múridos	63	++	Extremidad isquémica en múridos	64

++: estimulador potente; +: estimulador ligero; 0: sin efecto; -: inhibidor; ¿?: efecto desconocido; EGR: proteína de respuesta a la proliferación inicial; FGF: factor de crecimiento fibroblástico; GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos; HGF: factor de crecimiento del hepatocito; HIF-1 α : factor 1 α inducible por la hipoxia; IGF: factor de crecimiento similar a la insulina; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos; PlGF: factor de crecimiento placentario; SDF-1: factor 1 derivado de células estromales; TGF- β : factor de crecimiento transformante β ; TNF- α : factor de necrosis tumoral α ; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

inflamatorias desempeña un papel en la angiogénesis, por ejemplo, en el desarrollo del cáncer. Por ejemplo, se ha demostrado que los monocitos, los linfocitos T, las células agresoras naturales, los neutrófilos, los mastocitos y las células dendríticas producen factores angiogénicos⁴.

Es difícil determinar si las células progenitoras (endoteliales) participan en la vasculogénesis y qué tipos de células lo hacen. Esto se debe a la ausencia significativa de marcadores celulares apropiados para identificar estas células. Se ha propuesto que en la neovascularización en el adulto participan tanto las células progenitoras endoteliales, seleccionadas con los marcadores CD34⁷³ o CD133⁷⁴, como las células progenitoras no endoteliales, seleccionadas con marcadores CXCR4 en combinación con VEGFR1²³. Son necesarias nuevas investigaciones para optimizar la especificidad de los marcadores celulares con el objetivo de definir el papel de las células progenitoras en la neovascularización.

Se ha demostrado que en la arteriogénesis participa una gran variedad de células, incluidas las endoteliales, las CML, los fibroblastos, los monocitos, los linfocitos, los mastocitos, las plaquetas y las CMO⁷⁵. En el crecimiento real de colaterales predomina la proliferación de CML, fibroblastos adventicios y células endoteliales. La arteriogénesis se inicia por la activación de las células endoteliales, seguido de la acumulación perivascular de diversos tipos de leucocitos y CMO, que dirigen la proliferación de colaterales produciendo citocinas, factores de crecimiento y proteasas. En diversos estudios se ha demostrado un papel decisivo de los monocitos en la arteriogénesis⁷⁶⁻⁷⁸. Sólo recientemente se ha demostrado que también participan los linfocitos, como los linfocitos T CD4^{79,80}, los linfocitos T CD8⁸¹ y las células agresoras naturales⁸⁰.

Recientemente, las células precursoras madre se han convertido en el centro de interés para la estimulación de la arteriogénesis. Las células precursoras madre pueden obtenerse de diferentes fuentes: entre ellas, la médula ósea, la sangre periférica y el cordón umbilical. Las células precursoras madre tienen una capacidad clonogénica y de autorrenovación, y pueden diferenciarse en múltiples líneas celulares, un fenómeno conocido como *plasticidad*. Además de la línea celular eritrocitaria, la médula ósea contiene una serie de células precursoras relativamente indeterminadas y mononucleares parecidas a los linfocitos (fig. 2). Las células precursoras hematopoyéticas representan una subpoblación de estas células indeterminadas mononucleares. Debido a la cantidad de datos *in vitro* sobre la plasticidad de las diversas poblaciones de CMO, resulta tentador sugerir que el tratamiento

basado en células estimula la neovascularización por la incorporación directa de las células derivadas de la médula ósea en la pared del vaso^{11,82}. Sin embargo, se dispone de datos contradictorios sobre esta transdiferenciación de CMO/EPC en nuevas células endoteliales. Otros han puesto en duda esta teoría con pruebas convincentes de que las CMO apenas se incorporan o no se incorporan en absoluto y que la proliferación vascular es favorecida por un efecto paracrino de estas células. Las poblaciones de CMO contienen un número muy reducido de células precursoras, < 0,01% del total de células. Puesto que muchas subpoblaciones de CMO son el origen de factores de crecimiento, citocinas y quimocinas, una hipótesis complementaria es que la acción de las células es más un papel de soporte^{20,83,84}. En los estudios preclínicos el aumento de la arteriogénesis mediante la administración de CMO fue satisfactorio^{82,85-87}, y los resultados iniciales a partir de los ensayos clínicos son fascinantes. Además, la implantación de células mononucleares de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cells*, PCMO) y plaquetas mediante inyección en el área isquémica de ratas también indujo la formación de vasos colaterales a través del suministro de factores angiogénicos y citocinas⁸⁸.

ESTIMULACIÓN TERAPÉUTICA DE LA PROLIFERACIÓN VASCULAR

Concepto

En el objetivo de restablecer un flujo sanguíneo suficiente en la extremidad isquémica crónica, es más esencial la formación de vasos colaterales maduros que la proliferación de capilares. En este sentido, unos pocos vasos de gran calibre (arterias colaterales) son mucho más ventajosos desde un punto de vista hemodinámico que muchos capilares pequeños de alta resistencia, ya que el flujo a través de un vaso depende principalmente del radio, de acuerdo con la relación bien conocida a través de la ley de Poiseuille⁸⁹. De acuerdo con este modelo matemático, la resistencia al flujo, R (mm Hg/[mlmin]), a lo largo de cada vía paralela colateral separada, se estima, en condiciones de flujo tubular laminar: $R = 0,5 \mu ;L/d^4$, donde μ es la viscosidad de la sangre (0,03 g/[cm s]), L es la longitud estimada (mm), y d es el diámetro (mm). Por lo tanto, la estimulación terapéutica de la proliferación vascular debe dirigirse principalmente a los vasos colaterales de gran calibre. Sin embargo, para mejorar el estado de oxigenación de los tejidos isquémicos, es decisiva la estimulación de colaterales arteriogénicas y

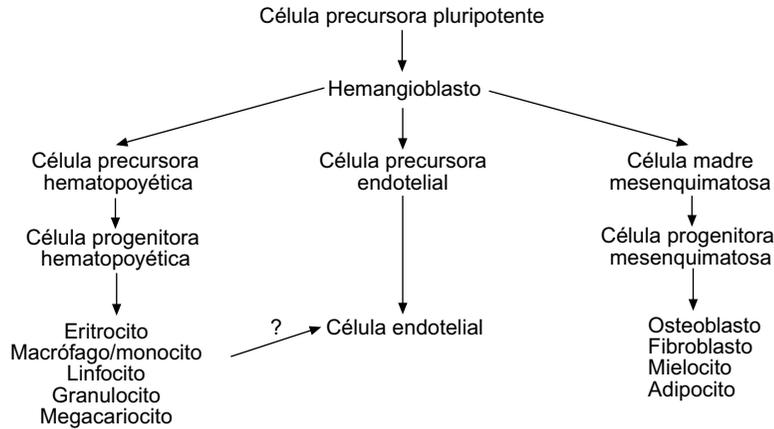


Fig. 2. Subpoblaciones de células mono-nucleares de la médula ósea y su diferenciación.

capilares angiogénicos para un flujo aferente y un intercambio de gases suficiente, respectivamente.

Se considera que el estímulo provocado por el aumento de la fuerza de cizallamiento es responsable de la proliferación de arterias colaterales, ya que la disminución súbita de la presión sanguínea periférica después de una oclusión arterial aumenta la velocidad del flujo a través de las arteriolas colaterales preexistentes que interconectan los territorios preoclusión, de alta presión, con las regiones postoclusión, de presión baja. La *fuerza de cizallamiento* se define como la fuerza tangencial por unidad de superficie aplicada por el flujo sanguíneo en el endotelio. Numerosos estudios han implicado previamente el aumento de la fuerza de cizallamiento como una fuerza modeladora arterial⁹⁰⁻⁹². En la circulación arterial, los niveles de la fuerza de cizallamiento se mantienen activamente a medida que los tejidos vasculares responden a los cambios de la fuerza de cizallamiento con ajustes rápidos del tono vascular y con un remodelado estructural crónico, lo que da lugar a variaciones en el diámetro del vaso. Sólo recientemente se han acumulado pruebas de que, en realidad, el aumento de la fuerza de cizallamiento desempeña un papel en la inducción de la arteriogenesis⁹³. Pipp et al⁹³ demostraron, claramente, que un cambio primario en la fuerza de cizallamiento es la fuerza mecánica predominante en la proliferación de arterias colaterales en un modelo de derivación endoluminal arteriovenosa en cerdos y conejos.

Formas de distribución: tratamiento con proteínas o genoterapia

La estimulación de la neovascularización se puede conseguir mediante el empleo de factores de crecimiento o la introducción de los genes que codifican estas proteínas. El uso de proteínas está restringido significativamente por su limitada semivida tisular,

que puede requerir un preparado de liberación mantenida o la administración repetida. Además, en general, las proteínas requieren una administración sistémica con un número potencialmente mayor de efectos adversos en comparación con la administración local. No obstante, las proteínas están más próximas al uso clínico que la genoterapia⁹⁴. Éste es un instrumento terapéutico prometedor en las enfermedades cardiovasculares que puede resolver la inestabilidad inherente de las proteínas angiogénicas facilitando la producción local y sostenida de estos factores angiogénicos. El uso de vectores virales que transportan genes angiogénicos, como adenovirus, virus asociados a los adenovirus o retrovirus, tiene la ventaja de una elevada eficiencia de transfección de los tejidos diana. Sin embargo, los virus desencadenan complicaciones, tales como diversas respuestas inmunológicas o, en el caso de los retrovirus, posibles mutagénesis insercionales. Los vectores no víricos (plásmidos) entrañan muchos menos riesgos y son de menor coste, pueden producirse con facilidad en grandes cantidades y se caracterizan por una mayor capacidad de transporte de material genético. Debido al menor número de problemas relacionados con la salud, los plásmidos están más cerca del uso clínico que los vectores víricos. Sin embargo, en general, son menos eficientes en la distribución del ADN y en el inicio de la expresión génica y la duración de la expresión transgénica es relativamente breve comparado con los vectores víricos. Por lo tanto, los plásmidos pueden administrarse repetidamente⁹⁵, o se pueden realizar procedimientos complementarios para mejorar su eficiencia de transfección. Esto último se consigue, por ejemplo, desarrollando complejos de liposomas catiónicos⁹⁶ o polímeros inteligentes⁹⁷ como vectores que permiten la captación celular eficiente y el escape endosómico. Otros métodos incipientes para mejorar la transferencia génica no vírica son la destrucción de microburbujas mediada

por ultrasonidos⁹⁸ o electroporación. Éste es un método físico para administrar genes, fármacos u otras moléculas a muchos tipos diferentes de tejidos (p. ej., músculo esquelético, hígado, pulmón y vasos sanguíneos) mediante pulsos eléctricos que dan lugar a la electroporación de la célula y la electroforesis del ADN^{99,100}. Recientemente, hemos demostrado que la transferencia génica por electroporación de un plásmido de ADN da lugar a una eficacia de la transfección y duración de la expresión transgénica similar o incluso mayor comparado con vectores adenovíricos¹⁰¹.

Aunque el objetivo principal es conseguir una elevada eficacia de transfección, se requiere precaución, ya que la expresión excesivamente elevada de factores angiogénicos podría producir efectos nocivos, como se ha demostrado para el vector vírico Sendai recombinante que sobreexpresa VEGF, dando lugar a una pérdida acelerada de la extremidad tras su administración a ratones⁴⁰. Además, todavía no se ha determinado la estrategia de administración óptima de los vectores o proteínas angiogénicos. Se dispone de múltiples vías de administración, como la sistémica (intravenosa, intraarterial), intramuscular, intravascular, perivascular, intrapericárdica y subcutánea, cuya eficacia y superioridad clínicas no están todavía demostradas⁹⁴. Por último, en su mayor parte se desconoce la dosis óptima, lo que debe investigarse adicionalmente.

ENSAYOS CLÍNICOS QUE HAN UTILIZADO FACTORES DE CRECIMIENTO ANGIOGÉNICOS

Las implicaciones terapéuticas de los factores de crecimiento angiogénico fueron identificadas por la investigación pionera de Judah Folkman¹⁰² en el campo de la biología tumoral y por Jeffrey Isner en el de la regeneración cardiovascular. Los efectos beneficiosos posteriores de estos factores de crecimiento en modelos de isquemia en animales dieron lugar a grandes expectativas en el tratamiento de la AOP. La autorización para efectuar ensayos clínicos administrando factores angiogénicos, incluso mediante genoterapia, se obtuvo con relativa facilidad porque los pacientes con isquemia avanzada no tenían otras opciones terapéuticas. Los primeros resultados obtenidos a partir de ensayos a pequeña escala de fase I/II en seres humanos, utilizando factores de crecimiento angiogénico, principalmente VEGF-A¹⁰³⁻¹⁰⁹, pero también factor de crecimiento de los hepatocitos¹¹⁰, fueron prometedores. Se obtuvieron resultados beneficiosos

similares a partir de ensayos iniciales en pacientes con coronariopatía utilizando VEGF-A¹¹¹⁻¹¹⁴, VEGF-C¹¹⁵ o FGF¹¹⁶⁻¹¹⁹. Sin embargo, de los ensayos a mayor escala aleatorizados, controlados con placebo, sobre angiogénesis terapéutica que se han publicado¹²⁰⁻¹²⁴, todos excepto uno, que utilizó la proteína FGF-2 recombinante¹²⁴, depararon resultados negativos. Además, los ensayos aleatorizados a pequeña escala que investigaron una estrategia más arteriogénica utilizando la proteína GM-CSF mostraron resultados negativos en pacientes con claudicación intermitente¹²⁵ pero resultados prometedores para el tratamiento de la coronariopatía¹²⁶. Por desgracia, los resultados en buena parte decepcionantes de los ensayos clínicos a mayor escala han templado las expectativas sobre la angiogénesis terapéutica. En comparación, recientemente, en un ensayo aleatorizado, doble ciego, demostramos, por primera vez, que la transferencia del gen VEGF podría mejorar significativamente la curación de las úlceras y la hemodinamia comparado con placebo en pacientes diabéticos con isquemia crítica de la extremidad¹²⁷. Es de esperar que estos últimos resultados reaviven el interés en el tratamiento de la arteriopatía periférica con estrategias de transferencia de genes angiogénicos, en particular utilizando como vector un plásmido de ADN "desnudo". Para una revisión de los ensayos clínicos sobre angiogénesis en pacientes con arteriopatía periférica desde 1998 hasta la actualidad, véase la tabla II. Se han sugerido numerosas razones para explicar los resultados negativos de estos ensayos sobre angiogénesis clínica, como el uso de un factor individual, la dosis, la duración de la expresión, la vía de administración, las múltiples variantes de empalme, la selección de pacientes, los criterios de valoración preseleccionados, la heterogeneidad de los pacientes, los inhibidores de la angiogénesis y un potente efecto placebo¹³⁰. Además, en el músculo con isquemia crónica en el que se ha agotado la angiogénesis endógena, pueden obstaculizarse las respuestas biológicas al tratamiento con factores de crecimiento. Recientemente, hemos observado en muestras de músculo de extremidades amputadas que, en la isquemia crónica en comparación con la aguda, los tejidos hipóxicos no pueden expresar suficiente HIF-1 α y VEGF y SDF-1 anterógrado¹³¹.

Ensayos clínicos que han utilizado tratamiento basado en células

Cuando se sugirió que la administración de células precursoras derivadas de la médula ósea, o las progenitoras endoteliales, podría mejorar el restablecimiento del flujo sanguíneo en diversos modelos

Tabla II. Ensayos clínicos para la estimulación de la neovascularización en pacientes con arteriopatía periférica

Bibliografía	Fase	Pacientes	N.º	Factor	Vía	Beneficios	Parámetro (s) que mejora
Factores angiogénicos							
103	I	Isquemia crítica extremidad	9	Plásmido VEGF ₁₆₅	Intramuscular	Sí	Índice tobillo-brazo, angiografía, flujo, curación úlcera, salvamento extremidad
104	I	Tromboangeítis obliterante (enfermedad de Buerger)	6	Plásmido VEGF ₁₆₅	Intramuscular	Sí	Índice tobillo-brazo, angiografía, flujo, curación úlcera, dolor en reposo nocturno
105	I	Isquemia crítica extremidad	28	Plásmido VEGF ₁₆₅	Balón recubierto de hidrogel	Sí	Angiografía
106	I	Claudicación intermitente o dolor en reposo	6	Adenovirus VEGF ₁₂₁	Intramuscular	Sí	Reserva flujo extremidad inferior, tiempo máximo de deambulación
107	II	Estenosis apropiada para ATP, sin diabetes mellitus	54	Plásmido VEGF ₁₆₅ + adenovirus	Intraarterial	Sí	Angiografía
124	II	Claudicación intermitente	190	Proteína bFGF	Intraarterial	Sí	Tiempo máximo de deambulación
108	I	Isquemia crítica extremidad	21	Plásmido VEGF ₁₆₅	Intramuscular	Sí	Índice tobillo-brazo, flujo, curación úlcera, dolor en reposo
122	II	Claudicación intermitente, estratificados por estado diabetes	105	Adenovirus VEGF ₁₂₁	Intramuscular	No	Ninguno (la variable primaria fue el tiempo máximo de deambulación)
128	I/II	Isquemia crítica extremidad, derivados para amputación	23	Fibrina +/- plásmido VEGF ₁₆₅	Intramuscular	Sí	Índice tobillo-brazo, presión transcutánea de oxígeno, claudicación intermitente, dolor en reposo, salvamento extremidad
110	I	Isquemia crítica extremidad, incluida tromboangeítis obliterante (enfermedad de Buerger)	6	Plásmido HGF	Intramuscular	Sí	Escala de dolor, índice tobillo-brazo, curación úlcera
109	I	Isquemia crítica extremidad, incluida tromboangeítis obliterante (enfermedad de Buerger)	9	Plásmido VEGF ₁₆₅	Intramuscular	Sí	Dolor isquémico, curación úlcera, índice tobillo-brazo, angiografía
127	II	Isquemia crítica extremidad y diabetes mellitus	54	Plásmido VEGF ₁₆₅	Intramuscular	Sí	Índice tobillo-brazo, curación úlcera
Factores arteriogénicos							
125	II	Claudicación intermitente	40	Proteína GM-CSF	Subcutánea	No	No (la variable primaria fue el cambio en el tiempo de deambulación)
129	I/II	Isquemia crítica extremidad	13	Adenovirus FGF-4	Intramuscular	Desconocidos	No se extrajeron conclusiones sobre la eficacia debido a la reducida cohorte de pacientes

ATP: angioplastia transluminal percutánea; FGF: factor de crecimiento fibroblástico; GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos; HGF: factor de crecimiento del hepatocito; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

isquémicos, empezó a evolucionar una estrategia terapéutica basada en células. A pesar de la ausencia de conocimientos sobre los complejos aspectos del origen y destino de las células, se ha prestado atención a demostrar los beneficios clínicos del tratamiento basado en células. Tateishi-Yuyama et al publicaron su investigación pionera en 2002 mostrando resultados beneficiosos con el trasplante autógeno de CMO en pacientes con isquemia de la extremidad¹³². La médula ósea y la sangre periférica proporcionan células precursoras de origen autógeno. Los problemas prácticos, como el rechazo inmunológico y la posible formación de un teratoma, al igual que los problemas éticos, han dificultado la utilización de células madre embrionarias en un ámbito clínico. La mayor parte de los ensayos clínicos utilizaron la fracción de células precursoras pluripotentes mononucleares de la médula ósea. Por otra parte, las células precursoras de sangre periférica se administran después de la movilización de estas células de la médula ósea mediante la aplicación de G-CSF. Otros investigadores han administrado más específicamente CPE.

Hasta la fecha el perfil de seguridad ha sido aceptable aunque, recientemente, se han puesto en duda los resultados a largo plazo¹³³. Por desgracia, estos estudios no son fáciles de interpretar. Resulta especialmente difícil extraer conclusiones firmes acerca de la eficacia del tratamiento ya que la mayor parte de los estudios carecen de grupos control, e incluyen diversas modalidades de tratamiento, criterios de valoración, y criterios de inclusión/exclusión. Además, se ha hecho hincapié en demostrar el restablecimiento de los parámetros clínicos más que la evaluación de la formación de nuevos vasos.

Prácticamente todos los estudios utilizan parámetros indirectos, como la curación de las úlceras, la tasa de salvamento de la extremidad, la distancia deambulada libre de dolor, el índice tobillo-brazo, las determinaciones transcutáneas de oxígeno y las puntuaciones del dolor, para evaluar los resultados. Aunque el efecto clínico es de importancia primordial, los parámetros objetivos para la evaluación de la proliferación vascular parecen esenciales, considerando los mecanismos sugeridos. Pocos estudios incluyen angiografía de sustracción digital, cuya evaluación se basa en una comparación visual cualitativa. Esta limitación de los criterios de valoración actuales también es válida para los ensayos sobre factores de crecimiento angiogénico. En la tabla III se proporciona una revisión de los estudios clínicos publicados en inglés sobre tratamiento basado en células con más de cinco pacientes.

Por lo que respecta al procedimiento de obtención de las células, hay una dicotomía entre

los orígenes de las células. Inicialmente las células precursoras se obtenían de la cresta ilíaca; más recientemente también se han administrado PCMO tras la movilización de G-CSF. Puesto que no se puede extraer una conclusión firme sobre la eficacia del tratamiento basado en células, sólo podemos especular acerca de las diferencias entre las CMO y las PCMC. La obtención de una muestra de la cresta ilíaca requiere anestesia general o epidural. Por lo demás, se ha suscitado cierta preocupación de que el tratamiento con G-CSF pueda relacionarse con una tasa inesperadamente alta de reestenosis intrastent después de la infusión intracoronaria de PCMO movilizadas¹⁴⁹.

En resumen, el tratamiento basado en células parece una estrategia alentadora para pacientes con arteriopatía periférica grave que no son candidatos a un tratamiento convencional. Sin embargo, los estudios clínicos efectuados hasta la fecha no se han diseñado primariamente para evaluar las variables clínicas o no cuentan con la potencia suficiente para hacerlo. Además, los aspectos de la tolerabilidad a largo plazo también deben ser evaluados.

LIMITACIONES DE LA ANGIO/ ARTERIOGÉNESIS TERAPÉUTICA

Se han documentado algunos efectos adversos de la angiogénesis terapéutica, como el agravamiento de la reestenosis cuando se utilizan células precursoras madre de sangre periférica en pacientes con infarto de miocardio¹⁴⁹ o la provocación de microinfartos descrita con el empleo de células del estroma mesenquimatoso en un modelo animal en perros¹⁵⁰. En relación con estos hallazgos, Epstein et al han propuesto el llamado fenómeno de Janus entre la arteriogénesis y la aterosclerosis¹⁵¹, lo que significa que los factores proarteriogénicos, como el MCP-1, pueden contribuir también a la progresión de la placa y a la formación de la neointima, según lo descrito^{152,153}. Además, se dispone de pruebas de que el desarrollo de las placas ateroscleróticas se asocia a la proliferación de los vasos vasculares¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ y, por lo tanto, puede acelerarse utilizando factores angiogénicos. No obstante, los efectos de los factores angiogénicos exógenos, como el VEGF, sobre la reestenosis y la aterosclerosis todavía son motivo de controversia, variando desde los beneficiosos¹⁵⁷ hasta los adversos¹⁵⁸. Otras limitaciones de la revascularización terapéutica pueden incluir la proliferación inapropiada de los vasos sanguíneos en lugares no deseados¹⁵⁹, lo que teóricamente podría provocar una mayor incidencia de retinopatía diabética o de cáncer. En esta línea, la inhibición de

Tabla III. Revisión de ensayos clínicos sobre tratamiento con células en pacientes con arteriopatía periférica

Bibliografía	Fase	Pacientes	N.º	Factor	Vía	Beneficios	Parámetro(s) que mejora
Con grupo de control							
132	I/II	Isquemia crítica extremidad	45	CMO	IM	Sí	Índice tobillo-brazo, presión transcutánea de O ₂ , tiempo de deambulación libre de dolor, angiografía (en 27 de 45 pacientes)
134	I/II	Isquemia crítica extremidad	14 + 14	G-CSF PCMO movilizadas	IM	Sí	Curación úlcera, salvamento extremidad, índice tobillo-brazo, flujo láser Doppler, angiografía
135	I/II	Isquemia crítica extremidad	14 + 15	CMO	IM	No	Sin mejora de índice tobillo-brazo, presión transcutánea de O ₂ , angiografía; ligera mejora curación úlcera, salvamento extremidad
136	I/II	Claudicación intermitente	13 + 12	CMO	Combinada IM + IA	Sí	Índice tobillo-brazo, tiempo de deambulación libre de dolor, saturación de O ₂ capilar-venosa, pletismografía venosa
Sin grupo de control							
137	I/II	Isquemia crítica extremidad y claudicación intermitente	8	CMO	IM	Variables	Dolor en reposo, curación úlcera, temperatura cutánea, índice tobillo-brazo, angiografía
138	I/II	Isquemia crítica extremidad	7	CMO	IM	Sí	Índice tobillo-brazo, presión transcutánea de O ₂ , tiempo de deambulación libre de dolor
133	I/II	Isquemia crítica extremidad	12	CMO	IM	Sí	Índice tobillo-brazo, tiempo de deambulación libre de dolor, escala análogos visuales, gammagrafía perfusión ^{99m} Tc-TF
139	I/II	Isquemia crítica extremidad y claudicación intermitente	8	CMO	IM	Variables	Índice tobillo-brazo, presión transcutánea de O ₂
140	I/II	Isquemia crítica extremidad	7	G-CSF PCMO movilizadas	IA	Sí	Índice tobillo-brazo, presión transcutánea de O ₂ , distancia deambulada libre de dolor, puntuación dolor
141	I/II	Isquemia crítica extremidad y claudicación intermitente	152	G-CSF PCMO movilizadas	IM	Variables	Curación úlcera, salvamento extremidad, índice tobillo-brazo, presión transcutánea de O ₂
142	I/II	Isquemia crítica extremidad y claudicación intermitente	29	G-CSF PCMO movilizadas	IM	Variables	Curación úlcera, salvamento extremidad, puntuación dolor, índice tobillo-brazo, distancia deambulada

(Continued)

Tabla III. Continued

Bibliografía	Fase	Pacientes	N.º	Factor	Vía	Beneficios	Parámetro(s) que mejora
143	I/II	Isquemia crítica extremidad y claudicación intermitente	8	CMO	Combinada IM + IA	Sí	Índice tobillo-brazo, distancia deambulada libre de dolor, saturación de O ₂ capilar-venosa
144	I/II	Isquemia crítica extremidad	26	CMO	IM	Sí	Curación úlcera, índice tobillo-brazo, escala análogos visuales, tiempo máximo deambulación, calidad de vida, angiografía
145	I/II	Isquemia crítica extremidad	8	CMO	IM	VARIABLES	Curación úlcera, índice tobillo-brazo, escala análogos visuales, angiografía
146	II	Isquemia crítica extremidad y claudicación intermitente	92	G-CSF PCMO movilizadas	IM	VARIABLES	Salvamento extremidad, termografía, pletismografía, angiografía TC
147	I/II	Isquemia crítica extremidad	7	CMO (6)PCMO (1)	IM	VARIABLES	Índice tobillo-brazo, presión transcutánea de O ₂ , escala análogos visuales
148	I/II	Isquemia crítica extremidad	14	CMO	IM	Sí	Curación úlcera, puntuación dolor

CMO: células precursoras médula ósea; G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos; IA: intraarterial; IM: intramuscular; PCMO: células mononucleares en sangre periférica; TC: tomografía computarizada.

la angiogénesis se ha convertido en un importante tratamiento adyuvante de las neoplasias^{160,161}. No obstante, los autores no tienen conocimiento de que se haya descrito ningún caso de cáncer de nuevo inicio o de progresión del cáncer después de tratamiento angiogénico en los pacientes tratados hasta el momento. En la experiencia de los autores, además, no hay pruebas de una mayor incidencia de cáncer después del tratamiento con plásmido de VEGF¹²⁷. Una vía de administración local y la especificidad de las proteínas o de los genes angiogénicos para el tejido diana podrían resolver estas preocupaciones.

DISCUSIÓN

A partir de lo mencionado previamente, puede concluirse que la neovascularización en el adulto es un fenómeno muy complejo que incluye una gran variedad de componentes celulares, los cuales excretan una miríada de factores de crecimiento vascular, citocinas y quimocinas. Todos los componentes celulares están organizados estrictamente en relación con la cronología de la participación, la localización y los patrones de expresión. En este proceso es preciso dilucidar muchos pasos. No es ninguna coincidencia que, paralelamente a la investigación básica en curso, haya entrado en juego el trasplante de CMO autógenas puesto que la médula ósea parece consistir potencialmente en casi todos los tipos de células implicadas. No obstante, los resultados de los ensayos clínicos sobre trasplante de células de médula ósea son heterogéneos. Es probable que los mayores conocimientos sobre qué subtipos de CMO participan en la neovascularización y cómo participan, al igual que el aislamiento de estas células antes de la administración, mejoren la eficacia de este tratamiento en el futuro. Por ejemplo, una subpoblación significativa de la médula ósea está constituida por células inflamatorias. Recientemente, otros investigadores, y nosotros mismos, hemos revelado, además, que los linfocitos, en particular las células T colaboradoras CD4^{+79,80}, las células T CD8⁺⁸¹, y las células agresoras naturales⁸⁰, desempeñan un papel modulador en la arteriogénesis. La administración de subgrupos definidos de linfocitos o su activación/inhibición específica con ligandos de los receptores activadores o inhibidores, respectivamente, podría ser beneficiosa para la estimulación de la arteriogénesis en el futuro. Además, también es prometedora la administración de factores para la movilización de CMO circulantes, como el VEGF o el

GM-CSF, o de factores que retienen las CMO en los tejidos isquémicos, como SDF-1¹⁶².

Como se ha mencionado previamente, la mayor parte de los ensayos controlados con placebo que usaron factores angiogénicos depararon resultados negativos. Una explicación evidente podría ser que la administración de un factor individual no es suficiente para poner en marcha el complejo proceso de la neovascularización. Por esta razón, se deberían diseñar futuros ensayos para usar una combinación de factores de crecimiento, preferentemente combinando factores angiogénicos y arteriogénicos, o incluyendo "genes interruptor", como el HIF-1alfa, que activen una expresión coordinada de muchos otros factores angiogénicos. Otra explicación de los resultados no satisfactorios de los ensayos podría ser que la selección de pacientes esté limitada por condicionantes éticos, en particular en los ensayos sobre genoterapia. En muchos ensayos, sólo se seleccionaron los pacientes que no eran candidatos a procedimientos vasculares de elección, por ejemplo, debido a una enfermedad avanzada. Es de esperar que, con el desarrollo de vectores que entrañen menos riesgos, se incluya a pacientes en estadios iniciales de la enfermedad, con resultados más beneficiosos. En nuestra opinión, la electroporación tiene el mayor potencial en la administración de genes empaquetados en estos vectores con menores riesgos debido a la expresión génica elevada y prolongada. Además, los pacientes con arteriopatía isquémica terminal pueden ser menos sensibles a los tratamientos angiogénicos debido a la pared patológica del vaso con disfunción endotelial y receptores defectuosos concomitantes, por ejemplo, receptores VEGF, ICAM-1 o molécula de adhesión celular vascular. Otros problemas pueden ser la disfunción de las células implicadas en la neovascularización, como la disminución de la migración de los monocitos estimulada por VEGF en diabéticos¹⁶³, la disminución de la proliferación y de la motilidad de la célula endotelial por la alteración del metabolismo lipídico^{164,165} y la disminución de la capacidad de neovascularización de las células mononucleares de la médula ósea¹⁶⁶ o de los linfocitos. La investigación futura debe prestar atención a la mejora de nuestros conocimientos sobre estos problemas, a fin de aumentar la sensibilidad a los factores de crecimiento endógenos o exógenos.

Otros problemas que merecen una investigación adicional son, en primer lugar, que los factores arteriogénicos pueden acelerar también la aterosclerosis (el fenómeno de Janus). Los factores arteriogénicos óptimos, que no son aterogénicos, pueden identificarse mediante estudios de expresión diferencial que comparen los modelos de arteriogenesis y de

aterosclerosis. En segundo lugar, los perfiles genéticos de los pacientes que determinan si la neovascularización en el tejido isquémico es eficiente o defectuosa podrían ser estudiados para identificar nuevas dianas terapéuticas y abrir posibilidades de prevención de la enfermedad. Para ello, podrían ser útiles los modelos en animales, por ejemplo, comparando cepas con diferente capacidad de formación de vasos^{80,167}. En este sentido, las diferencias en las redes colaterales preexistentes pueden estar determinadas genéticamente, lo que podría explicar la razón de que un paciente forme una red suficiente de colaterales o responda bien a un tratamiento arteriogénico y otro paciente no. Es interesante destacar que, recientemente, se ha propuesto que los leucocitos desempeñan un papel en el remodelado vascular de la retina durante el desarrollo¹⁶⁸, aunque todavía no se ha determinado el papel del sistema inmunitario en el desarrollo embrionario de una red de colaterales. En tercer lugar, el estudio de la expresión diferencial de los genes angiogénicos entre los tejidos con isquemia aguda y crónica podría predecir nuevos factores de crecimiento candidatos.

Por último, el diseño de vasos sanguíneos fabricados por ingeniería genética tisular podría ser la solución para pacientes con arteriopatía isquémica; sin embargo, la consecución de un vaso sanguíneo artificial, no trombogénico, inmunocompatible, resistente y con una respuesta biológica adecuada no parece vislumbrarse todavía en un futuro próximo¹⁶⁹.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rutherford RB, Baker JD, Ernst C, et al. Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: revised version. *J Vasc Surg* 1997;26:517-538.
2. Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group. Final report on the aspirin component of the ongoing Physicians' Health Study. *N Engl J Med* 1989; 321:129-135.
3. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, et al. Inter-Society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007;33(Suppl. 1):S1-S75.
4. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003;9:653-660.
5. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-395.
6. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-364.
7. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003;3:401-410.
8. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes Memorial Award lecture. *Cancer Res* 1986;46:467-473.
9. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:73-91.

10. Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 2005;106:1525-1531.
11. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-967.
12. Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998;92:362-367.
13. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221-228.
14. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003;9:702-712.
15. Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 2003;300:1155-1159.
16. Hattori K, Dias S, Heissig B, et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2001;193:1005-1014.
17. Peters BA, Diaz LA, Polyak K, et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med* 2005;11:261-262.
18. Rajantie I, Ilmonen M, Alminaita A, Ozerdem U, Alitalo K, Salven P. Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* 2004;104:2084-2086.
19. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002;297:2256-2259.
20. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, et al. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res* 2004;94:230-238.
21. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Epstein SE. Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences. *Circ Res* 2004;95:354-363.
22. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004;95:343-353.
23. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006;124:175-189.
24. van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hofer I, Voskuil M, Schaper W. Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res* 2001;49:543-553.
25. Deindl E, Buschmann I, Hofer IE, et al. Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res* 2001;89:779-786.
26. Hershey JC, Baskin EP, Glass JD, et al. Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis. *Cardiovasc Res* 2001;49:618-625.
27. Hofer IE, van Royen N, Rectenwald JE, et al. Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1-mediated mechanisms. *Circ Res* 2004;94:1179-1185.
28. Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1143-1151.
29. Tronc F, Mallat Z, Lehoux S, Wassef M, Esposito B, Tedgui A. Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: interaction with NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E120-E126.
30. Lee JG, Dahi S, Mahimkar R, et al. Intronic regulation of matrix metalloproteinase-2 revealed by in vivo transcriptional analysis in ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:16345-16350.
31. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hindlimb model. *J Clin Invest* 1994;93:662-670.
32. van Weel V, Deckers MM, Grimbergen JM, et al. Vascular endothelial growth factor overexpression in ischemic skeletal muscle enhances myoglobin expression in vivo. *Circ Res* 2004;95:58-66.
33. Pipp F, Heil M, Issbrucker K, et al. VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res* 2003;92:378-385.
34. Mould AW, Greco SA, Cahill MM, et al. Transgenic overexpression of vascular endothelial growth factor-B isoforms by endothelial cells potentiates postnatal vessel growth in vivo and in vitro. *Circ Res* 2005;97:e60-e70.
35. Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, et al. VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res* 2003;92:1098-1106.
36. Witzenbichler B, Asahara T, Murohara T, et al. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol* 1998;153:381-394.
37. Luttun A, Tjwa M, Moons L, et al. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002;8:831-840.
38. Hiasa K, Ishibashi M, Ohtani K, et al. Gene transfer of stromal cell-derived factor-1alpha enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization. *Circulation* 2004;109:2454-2461.
39. Carr AN, Howard BW, Yang HT, et al. Efficacy of systemic administration of SDF-1 in a model of vascular insufficiency: support for an endothelium-dependent mechanism. *Cardiovasc Res* 2006;69:925-935.
40. Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, et al. Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. *Circ Res* 2002;90:966-973.
41. Asahara T, Bauters C, Zheng LP, et al. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 1995;92:II365-II371.
42. Shyu KG, Manor O, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM. Direct intramuscular injection of plasmid DNA encoding angiopoietin-1 but not angiopoietin-2 augments revascularization in the rabbit ischemic hindlimb. *Circulation* 1998;98:2081-2087.
43. Reiss Y, Droste J, Heil M, et al. Angiopoietin-2 impairs revascularization after limb ischemia. *Circ Res* 2007;101:88-96.
44. Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, et al. Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. *Gene Ther* 2001;8:181-189.
45. Rabinovsky ED, Draghia-Akli R. Insulin-like growth factor I plasmid therapy promotes in vivo angiogenesis. *Mol Ther* 2004;9:46-55.

46. Emanuelli C, Minasi A, Zacheo A, et al. Local delivery of human tissue kallikrein gene accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation* 2001;103:125-132.
47. Ozawa T, Toba K, Kato K, et al. Erythroid cells play essential roles in angiogenesis by bone marrow cell implantation. *J Mol Cell Cardiol* 2006;40:629-638.
48. Scholz D, Schaper W. Enhanced arteriogenesis in mice overexpressing erythropoietin. *Cell Tissue Res* 2006;324:395-401.
49. Vincent KA, Shyu KG, Luo Y, et al. Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1 α /VP16 hybrid transcription factor. *Circulation* 2000;102:2255-2261.
50. Khachigian LM. Early growth response-1 in cardiovascular pathobiology. *Circ Res* 2006;98:186-191.
51. Sarateanu CS, Retuerto MA, Beckmann JT, et al. An Egr-1 master switch for arteriogenesis: studies in Egr-1 homozygous negative and wild-type animals. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;131:138-145.
52. Li J, Post M, Volk R, et al. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med* 2000;6:49-55.
53. Post MJ, Sato K, Murakami M, et al. Adenoviral PR39 improves blood flow and myocardial function in a pig model of chronic myocardial ischemia by enhancing collateral formation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290:R494-R500.
54. Tirziu D, Moodie KL, Zhuang ZW, et al. Delayed arteriogenesis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 2005;112:2501-2509.
55. Dong Z, Yoneda J, Kumar R, Fidler IJ. Angiostatin-mediated suppression of cancer metastases by primary neoplasms engineered to produce granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1998;188:755-763.
56. Buschmann IR, Hofer IE, van Royen N, et al. GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis* 2001;159:343-356.
57. Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor- α . *Nature* 1987;329:630-632.
58. Hofer IE, van Royen N, Rectenwald JE, et al. Direct evidence for tumor necrosis factor- α signaling in arteriogenesis. *Circulation* 2002;105:1639-1641.
59. Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G. Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- β receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13:301-307.
60. van Royen N, Hofer I, Buschmann I, et al. Exogenous application of transforming growth factor β 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation. *FASEB J* 2002;16:432-434.
61. Hong KH, Ryu J, Han KH. Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood* 2005;105:1405-1407.
62. Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res* 1997;80:829-837.
63. Cao G, Savani RC, Fehrenbach M, et al. Involvement of endothelial CD44 during in vivo angiogenesis. *Am J Pathol* 2006;169:325-336.
64. van Royen N, Voskuil M, Hofer I, et al. CD44 regulates arteriogenesis in mice and is differentially expressed in patients with poor and good collateralization. *Circulation* 2004;109:1647-1652.
65. Rissanen TT, Vajanto I, Hiltunen MO, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR/Flk-1) in ischemic skeletal muscle and its regeneration. *Am J Pathol* 2002;160:1393-1403.
66. Madeddu P, Emanuelli C, Spillmann F, et al. Murine models of myocardial and limb ischemia: diagnostic end-points and relevance to clinical problems. *Vascul Pharmacol* 2006;45:281-301.
67. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380:435-439.
68. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-676.
69. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003;9:936-943.
70. Heil M, Ziegelhoeffer T, Wagner S, et al. Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2. *Circ Res* 2004;94:671-677.
71. Koolwijk P, van Erck MG, de Vree WJ, et al. Cooperative effect of TNF α , bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity. *J Cell Biol* 1996;132:1177-1188.
72. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, et al. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 2000;6:460-463.
73. Schatteman GC, Hanlon HD, Jiao C, Dodds SG, Christy BA. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest* 2000;106:571-578.
74. Yang C, Zhang ZH, Li ZJ, Yang RC, Qian GQ, Han ZC. Enhancement of neovascularization with cord blood CD133⁺ cell-derived endothelial progenitor cell transplantation. *Thromb Haemost* 2004;91:1202-1212.
75. Heil M, Schaper W. Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circ Res* 2004;95:449-458.
76. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 1998;101:40-50.
77. Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res* 1997;80:829-837.
78. Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, et al. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H2411-H2419.
79. Stabile E, Burnett MS, Watkins C, et al. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation* 2003;108:205-210.
80. van Weel V, Toes RE, Seghers L, et al. Natural killer cells and CD4⁺ T-cells modulate collateral artery development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2310.
81. Stabile E, Kinnaird T, la Sala A, et al. CD8⁺ T lymphocytes regulate the arteriogenic response to ischemia by infiltrating the site of collateral vessel development and recruiting CD4⁺ mononuclear cells through the expression of interleukin-16. *Circulation* 2006;113:118-124.
82. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 2001;103:897-903.

83. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004;94:678-685.
84. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39:733-742.
85. Ikenaga S, Hamano K, Nishida M, et al. Autologous bone marrow implantation induced angiogenesis and improved deteriorated exercise capacity in a rat ischemic hindlimb model. *J Surg Res* 2001;96:277-283.
86. Li TS, Hamano K, Suzuki K, Ito H, Zempo N, Matsuzaki M. Improved angiogenic potency by implantation of ex vivo hypoxia prestimulated bone marrow cells in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H468-H473.
87. Silva GV, Litovsky S, Assad JA, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 2005;111:150-156.
88. Iba O, Matsubara H, Nozawa Y, et al. Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation* 2002;106:2019-2025.
89. Schlichting H. *Boundary Layer Theory*. New York: McGraw-Hill, 1960.
90. Zarins CK, Zatina MA, Giddens DP, Ku DN, Glagov S. Shear stress regulation of artery lumen diameter in experimental atherosclerosis. *J Vasc Surg* 1987;5:413-420.
91. Kamiya A, Togawa T. Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1980;239:H14-H21.
92. Unthank JL, Fath SW, Burkhardt HM, Miller SC, Dalsing MC. Wall remodeling during luminal expansion of mesenteric arterial collaterals in the rat. *Circ Res* 1996;79:1015-1023.
93. Pipp F, Boehm S, Cai WJ, et al. Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hindlimb. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1664-1668.
94. Simons M, Bonow RO, Chronos NA, et al. Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: an expert panel summary. *Circulation* 2000;102:E73-E86.
95. Young JL, Dean DA. Nonviral gene transfer strategies for the vasculature. *Microcirculation* 2002;9:35-49.
96. Mahato RI, Rolland A, Tomlinson E. Cationic lipid-based gene delivery systems: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res* 1997;14:853-859.
97. Dincer S, Turk M, Piskin E. Intelligent polymers as nonviral vectors. *Gene Ther* 2005;12(Suppl. 1):S139-S145.
98. Tsutsui JM, Xie F, Porter RT. The use of microbubbles to target drug delivery. *Cardiovasc Ultrasound* 2004;2:23.
99. Andre F, Mir LM. DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Ther* 2004;(Suppl. 1):S33-S42.
100. McMahon JM, Wells DJ. Electroporation for gene transfer to skeletal muscles: current status. *BioDrugs* 2004;18:155-165.
101. Eefting D, Grimbergen JM, de Vries MR, et al. Prolonged in vivo gene silencing by electroporation-mediated plasmid delivery of small interfering RNA. *Hum Gene Ther* 2007;18:861-869.
102. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-1186.
103. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998;97:1114-1123.
104. Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, et al. Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J Vasc Surg* 1998;28:964-973.
105. Isner JM. Arterial gene transfer of naked DNA for therapeutic angiogenesis: early clinical results. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;30:185-197.
106. Rajagopalan S, Shah M, Luciano A, Crystal R, Nabel EG. Adenovirus-mediated gene transfer of VEGF(121) improves lower-extremity endothelial function and flow reserve. *Circulation* 2001;104:753-755.
107. Makinen K, Manninen H, Hedman M, et al. Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol Ther* 2002;6:127-133.
108. Shyu KG, Chang H, Wang BW, Kuan P. Intramuscular vascular endothelial growth factor gene therapy in patients with chronic critical leg ischemia. *Am J Med* 2003;114:85-92.
109. Kim HJ, Jang SY, Park JJ, et al. Vascular endothelial growth factor-induced angiogenic gene therapy in patients with peripheral artery disease. *Exp Mol Med* 2004;36:336-344.
110. Morishita R, Aoki M, Hashiya N, et al. Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease. *Hypertension* 2004;44:203-209.
111. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischemic limb. *Lancet* 1996;348:370-374.
112. Losordo DW, Vale PR, Symes JF, et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998;98:2800-2804.
113. Hendel RC, Henry TD, Rocha-Singh K, et al. Effect of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor on myocardial perfusion: evidence for a dose-dependent effect. *Circulation* 2000;101:118-121.
114. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, et al. Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF(165) gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2000;102:965-974.
115. Fortuin FD, Vale P, Losordo DW, 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;92:436-439.
116. Sellke FW, Laham RJ, Edelman ER, Pearlman JD, Simons M. Therapeutic angiogenesis with basic fibroblast growth factor: technique and early results. *Ann Thorac Surg* 1998;65:1540-1544.
117. Laham RJ, Sellke FW, Edelman ER, et al. Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery: results of a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation* 1999;100:1865-1871.
118. Udelson JE, Dilsizian V, Laham RJ, et al. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 improves stress and rest myocardial perfusion abnormalities in patients with severe symptomatic chronic coronary artery disease. *Circulation* 2000;102:1605-1610.

119. Laham RJ, Chronos NA, Pike M, et al. Intracoronary basic fibroblast growth factor (FGF-2) in patients with severe ischemic heart disease: results of a phase I open-label dose escalation study. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:2132-2139.
120. Grines CL, Watkins MW, Mahmarian JJ, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of Ad5FGF-4 gene therapy and its effect on myocardial perfusion in patients with stable angina. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1339-1347.
121. Henry TD, Annex BH, McKendall GR, et al. The VIVA trial: Vascular Endothelial Growth Factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 2003;107:1359-1365.
122. Rajagopalan S, Mohler ER, III, Lederman RJ, et al. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* 2003;108:1933-1938.
123. Simons M, Annex BH, Laham RJ, et al. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* 2002;105:788-793.
124. Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, et al. Therapeutic Angiogenesis with Recombinant Fibroblast Growth Factor-2 for Intermittent Claudication (the TRAF-FIC study): a randomized trial. *Lancet* 2002;359:2053-2058.
125. van Royen N, Schirmer SH, Atasever B, et al. START trial: a pilot study on STimulation of ARTeriogenesis using subcutaneous application of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as a new treatment for peripheral vascular disease. *Circulation* 2005;112:1040-1046.
126. Seiler C, Pohl T, Wustmann K, et al. Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation* 2001;104:2012-2017.
127. Kusumanto YH, van WV, Mulder NH, et al. Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial. *Hum Gene Ther* 2006;17:683-691.
128. Kipshidze N, Kipiani K, Beridze N, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by utilization of fibrin meshwork. Pilot randomized controlled study. *Int Angiol* 2003;22:349-355.
129. Matyas L, Schulte KL, Dormandy JA, et al. Arteriogenic gene therapy in patients with unreconstructable critical limb ischemia: a randomized, placebo-controlled clinical trial of adenovirus 5-delivered fibroblast growth factor-4. *Hum Gene Ther* 2005;16:1202-1211.
130. Simons M, Ware JA. Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:863-871.
131. van Weel V, Seghers L, de Vries MR, et al. Expression of vascular endothelial growth factor, stromal cell-derived factor-1, and CXCR4 in human limb muscle with acute and chronic ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1426-1432.
132. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet* 2002;360:427-435.
133. Miyamoto M, Yasutake M, Takano H, et al. Therapeutic angiogenesis by autologous bone marrow cell implantation for refractory chronic peripheral arterial disease using assessment of neovascularization by 99mTc-tetrofosmin (TF) perfusion scintigraphy. *Cell Transplant* 2004;13:429-437.
134. Huang P, Li S, Han M, Xiao Z, Yang R, Han ZC. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:2155-2160.
135. Barc P, Skora J, Pupka A, Turkiewicz D, Dorobisz AT, Garcarek J. Bone-marrow cells in therapy of critical limb ischemia of lower extremities—own experience. *Acta Angiol* 2006;12:155-166.
136. Bartsch T, Brehm M, Zeus T, Kogler G, Wernet P, Strauer BE. Transplantation of autologous mononuclear bone marrow stem cells in patients with peripheral arterial disease (the TAM-PAD study). *Clin Res Cardiol* 2007;96:891-899.
137. Esato K, Hamano K, Li TS, et al. Neovascularization induced by autologous bone marrow cell implantation in peripheral arterial disease. *Cell Transplant* 2002;11:747-752.
138. Higashi Y, Kimura M, Hara K, et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation* 2004;109:1215-1218.
139. Saigawa T, Kato K, Ozawa T, et al. Clinical application of bone marrow implantation in patients with arteriosclerosis obliterans, and the association between efficacy and the number of implanted bone marrow cells. *Circ J* 2004;68:1189-1193.
140. Lenk K, Adams V, Lurz P, et al. Therapeutic potential of blood-derived progenitor cells in patients with peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischemia. *Eur Heart J* 2005;26:1903-1909.
141. Yang X, Wu Y, Wang H, Xu Y, Xu B, Lu X. Transplantation of mobilized peripheral blood mononuclear cells for peripheral arterial occlusive disease of the lower extremity. *J Geriatr Cardiol* 2006;3:181-183.
142. Tateno K, Minamino T, Toko H, et al. Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization. *Circ Res* 2006;98:1194-1202.
143. Bartsch T, Brehm M, Zeus T, Strauer BE. Autologous mononuclear stem cell transplantation in patients with peripheral occlusive arterial disease. *J Cardiovasc Nurs* 2006;21:430-432.
144. Durdu S, Akar AR, Arat M, Sancak T, Eren NT, Ozyurda U. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation for patients with Rutherford grade II–III thromboangiitis obliterans. *J Vasc Surg* 2006;44:732-739.
145. Miyamoto K, Nishigami K, Nagaya N, et al. Unblinded pilot study of autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with thromboangiitis obliterans. *Circulation* 2006;114:2679-2684.
146. Kawamura A, Horie T, Tsuda I, et al. Clinical study of therapeutic angiogenesis by autologous peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation in 92 patients with critically ischemic limbs. *J Artif Organs* 2006;9:226-233.
147. Kajiguchi M, Kondo T, Izawa H, et al. Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Circ J* 2007;71:196-201.
148. Saito Y, Sasaki K, Katsuda Y, et al. Effect of autologous bone-marrow cell transplantation on ischemic ulcer in patients with Buerger's disease. *Circ J* 2007;71:1187-1192.

149. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomized clinical trial. *Lancet* 2004;363:751-756.
150. Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet* 2004;363:783-784.
151. Epstein SE, Stabile E, Kinnaird T, Lee CW, Clavijo L, Burnett MS. Janus phenomenon: the interrelated tradeoffs inherent in therapies designed to enhance collateral formation and those designed to inhibit atherogenesis. *Circulation* 2004;109:2826-2831.
152. van Royen N, Hoefler I, Bottlinger M, et al. Local monocyte chemoattractant protein-1 therapy increases collateral artery formation in apolipoprotein E-deficient mice but induces systemic monocytic CD11b expression, neointimal formation, and plaque progression. *Circ Res* 2003;92:218-225.
153. Schepers A, Eefting D, Bonta PI, et al. Anti-MCP-1 gene therapy inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and attenuates vein graft thickening both in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2063-2069.
154. Barger AC, Beeuwkes R, III, Lainey LL, Silverman KJ. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *N Engl J Med* 1984;310:175-177.
155. Kwon HM, Sangiorgi G, Ritman EL, et al. Enhanced coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1998;101:1551-1556.
156. Williams JK, Armstrong ML, Heistad DD. Vasa vasorum in atherosclerotic coronary arteries: responses to vasoactive stimuli and regression of atherosclerosis. *Circ Res* 1988;62:515-523.
157. Luo Z, Asahara T, Tsurumi Y, Isner JM, Symes JF. Reduction of vein graft intimal hyperplasia and preservation of endothelium-dependent relaxation by topical vascular endothelial growth factor. *J Vasc Surg* 1998;27:167-173.
158. Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med* 2001;7:425-429.
159. Ware JA, Simons M. Angiogenesis in ischemic heart disease. *Nat Med* 1997;3:158-164.
160. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 1992;3:65-71.
161. Ferrara N. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology* 2005;69(Suppl. 3):11-16.
162. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004;10:858-864.
163. Waltenberger J, Lange J, Kranz A. Vascular endothelial growth factor-A-induced chemotaxis of monocytes is attenuated in patients with diabetes mellitus: a potential predictor for the individual capacity to develop collaterals. *Circulation* 2000;102:185-190.
164. Chen CH, Jiang W, Via DP, et al. Oxidized low-density lipoproteins inhibit endothelial cell proliferation by suppressing basic fibroblast growth factor expression. *Circulation* 2000;101:171-177.
165. Murugesan G, Fox PL. Role of lysophosphatidylcholine in the inhibition of endothelial cell motility by oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1996;97:2736-2744.
166. Heeschen C, Lehmann R, Honold J, et al. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation* 2004;109:1615-1622.
167. Helisch A, Wagner S, Khan N, et al. Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:520-526.
168. Ishida S, Yamashiro K, Usui T, et al. Leukocytes mediate retinal vascular remodeling during development and vaso-obliteration in disease. *Nat Med* 2003;9:781-788.
169. Berglund JD, Galis ZS. Designer blood vessels and therapeutic revascularization. *Br J Pharmacol* 2003;140:627-636.