

Efectos de la prostaglandina E₁ en la formación de los capilares sanguíneos en músculo esquelético de ratas: análisis ultraestructural

Dorival Moreschi Jr., Djalma José Fagundes, Luzmarina Hernandes y Edna Freymuller Haapalainen, Paraná, Brasil

El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar los aspectos ultraestructurales en la formación de capilares sanguíneos en el músculo esquelético de las extremidades posteriores de ratas sometidas a isquemia y a la acción de la prostaglandina E₁ (PGE₁) administrada por vía intramuscular o intravenosa. Se usaron 12 ratas Wistar-UEM, distribuidas aleatoriamente en tres grupos de cuatro animales cada uno, redistribuidos a su vez en dos subgrupos, observados a los 7 y 14 días del modo siguiente: el grupo sólo sometido a isquemia se consideró el control (I), grupo con isquemia e inyección intramuscular de PGE₁ (IM) y grupo con isquemia e inyección intravenosa de PGE₁ (IV). Los resultados se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). El análisis MET reveló pruebas de formación de nuevos capilares. Este análisis nos permitió identificar estructuras morfológicas y fenómenos en la neoformación vascular que podrían haber tenido lugar a través de la angiogénesis y/o vasculogénesis.

INTRODUCCIÓN

La *angiogénesis* es un término que expresa los pasos a través de los que se desarrollarán nuevos vasos sanguíneos a partir de una estructura endotelial preexistente, por ejemplo, la formación de vasos en individuos adultos como respuesta a las demandas de los tejidos¹⁻⁴.

El objetivo primario del tratamiento angiogénico es favorecer la inducción y formación de nuevos vasos para suprimir la isquemia de los tejidos^{5,6}. En su inducción y/o mantenimiento se han usado

diversas sustancias: por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), y factor de crecimiento hepatocítico (HGF). La limitación en el uso de estos fármacos se asocia con la tendencia del estímulo angiogénico artificial a desvanecerse a menos que se establezca el proceso de remodelado y su maduración^{7,8}.

Entre las substancias que estimulan la angiogénesis, destaca la prostaglandina E₁ (PGE₁) una molécula de elevada actividad biológica que ya se utiliza con uso clínico para el tratamiento de la isquemia crónica de extremidades, como vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria^{7,9-11}. Además, la PGE₁ actúa en la activación de la fibrinólisis, modulación de la proliferación celular, actividad hemorreológica en el hematíe, inhibición y activación de neutrófilos y mejora de la distribución de oxígeno y glucosa en los tejidos¹¹⁻¹⁵.

Además de estos efectos, se dispone de pruebas de que la PGE₁ estimula la angiogénesis en situaciones

DOI of original article: 10.1016/j.avsg.2007.07.035.

Maringá State University, Maringá, Paraná, Brasil.

Correspondencia: Dorival Moreschi, Jr., MD, Rua Felipe Camarão 71, 87010-330 Maringá, Paraná, Brasil. Correo electrónico: dorival@moreschi.med.br

Ann Vasc Surg 2008; 22: 121-127
DOI: 10.1016/j.avsp.2008.04.013

© Annals of Vascular Surgery Inc.
Publicado en la red: enero 12, 2008

de isquemia miocárdica^{11,16,17}. Sin embargo, en isquemia periférica aguda o crónica, no se han publicado estudios experimentales o clínicos que hayan usado esta molécula con dicho objetivo.

Por esta razón, el objetivo del presente trabajo experimental consistió en estudiar los aspectos ultraestructurales en la formación de los capilares sanguíneos en músculo esquelético de pata trasera de ratas sometidas a isquemia y a la acción de PGE₁ administrada por vía intramuscular o intravenosa.

MÉTODOS

El protocolo experimental fue aprobado por el comité de investigación con animales de experimentación de la Maringa State University (UEM, Paraná, Brasil).

Todos los procedimientos siguieron estrictamente las regulaciones existentes sobre experimentación en animales.

Todos los procedimientos quirúrgicos y obtención de muestras se efectuaron con anestesia general administrando ketamina (60 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg) por vía intramuscular.

Se asignó aleatoriamente a ratas macho Wistar ($n = 12$), de 280-300 g de peso, a uno de tres grupos, igualmente distribuidos en dos subgrupos, observados hasta el día postoperatorio (PO) 7 o 14, respectivamente: grupo I ($n = 4$), ratas sometidas a isquemia (I), I-7 ($n = 2$) y I-14 ($n = 2$); grupo II ($n = 4$), animales sometidos a isquemia y a inyección intramuscular de PGE₁ (IM), IM-7 ($n = 2$), e IM-14 ($n = 2$); y grupo III ($n = 4$), en los, tras el período de isquemia, se administró PGE₁ intravenosa (IV), IV-7 ($n = 2$), e IV-14 ($n = 2$).

El modelo isquémico de extremidad posterior de rata^{13,18-22}, se llevó a cabo mediante la disección y excisión de la arteria femoral desde su origen proximal en la arteria ilíaca externa hasta su porción distal en su bifurcación en las arterias safena y poplítea. Se disecó la arteria ilíaca externa y se interrumpió con una ligadura de algodón 4-0. Por lo tanto, el flujo sanguíneo hasta la pata dependía de los vasos colaterales desde la arteria ilíaca interna.

Después de este procedimiento y antes suturar la piel, usando jeringas de 1 ml y agujas de calibre 30G1/2, se inyectó cuidadosamente PGE₁ (Prostavasin®; Biosintética, São Paulo, Brasil) en una dosis de 5 µg/kg (un frasco, 20 µg diluidos en 5 ml de suero fisiológico) del modo siguiente: en el grupo II, se aplicó por vía intramuscular en puntos equidistantes directamente en el músculo vasto

medial y recto interno de la pata trasera; en el grupo III, la PGE₁ se inyectó por vía intravenosa a través de la vena dorsal del pene.

Durante el seguimiento de 7-14 días, los animales se examinaron a diario en relación con los aspectos siguientes: 1) herida quirúrgica, presencia de hematoma, dehiscencia o infección; 2) presencia de necrosis cutánea en la extremidad posterior, necrosis o gangrena de los dedos; 3) en el aspecto funcional de la pata, presencia de claudicación – “marcha arrastrando la extremidad” – o parálisis.

En los días de observación 7 y 14, se disecó y aisló el área de donde se había extirpado la arteria femoral y se obtuvo una muestra de tejido muscular para análisis microscópico electrónico. Después de procesar el material, se observaron y fotografiaron cortes ultrafinos en un microscopio electrónico de transmisión (MET) JEOL 1200 EXII (80 KV; JEOL, Peabody, MA).

RESULTADOS

En la evaluación macroscópica de las extremidades posteriores operadas, se observó una dehiscencia parcial de la herida tan sólo en tres de 60 animales. En este modelo, no se verificaron pruebas inmediatas de isquemia, como cianosis o hipotermia distal de la extremidad. No se observó ningún caso de claudicación con “marcha de arrastre” ni de necrosis de y tampoco se produjo ninguna muerte entre los animales estudiados.

No observamos alteraciones morfológicas de las células endoteliales de los animales del grupo I (sin administración de PG₁), incluso en PO 7 o 14 (fig. 1).

En los grupos II (IM) y III (IV), que recibieron la inyección de PGE₁, sólo identificamos alteraciones morfológicas en PO 14.

En las figuras 2 a 4, se muestran las pruebas de formación de capilares a partir de un conjunto de células endoteliales que iniciaron la formación de la luz capilar debido al espacio existente entre ellas. También fue frecuente la aparición de filopodios en la cara luminal de los capilares de los animales de estos subgrupos (fig. 5 y 6).

En esta investigación, se observó otro dato sugestivo de angiogénesis: la aparición de brotes (*sprouting*) laterales debido a la desorganización de la membrana basal (fig. 6) y la división luminal debida a los procesos densos (puentes), que se extienden a través de la luz para unirse con la membrana de la cara opuesta, creando capilares de doble luz a través de un proceso de división longitudinal (fig. 7).

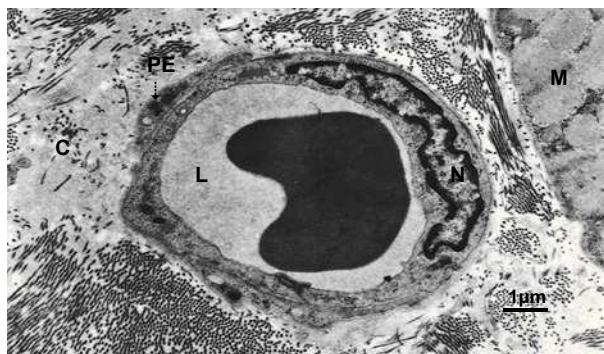


Fig. 1. Electromicrografía del músculo esquelético de una rata del subgrupo isquémico examinado en el día 14. Se observa un capilar con un hematíe (*H*) en su luz capilar (*L*), con el núcleo denso de la célula endotelial (*N*) y un pericito (*PE*) en su borde superior. *C*: fibras de colágeno; *M*: células musculares.

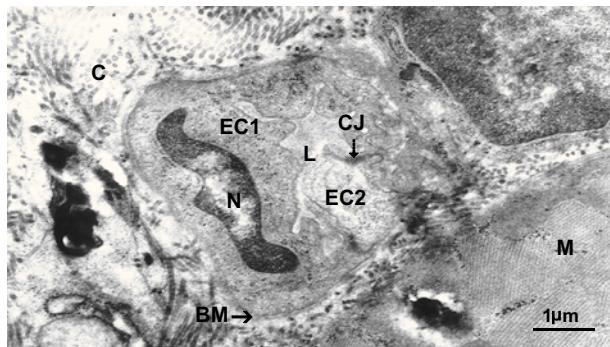


Fig. 2. Electromicrografía de músculo esquelético de una rata del subgrupo IV tratada con PGE_1 examinado en el día 14. Se observa un capilar sanguíneo en formación a partir de dos células endoteliales (*EC1* y *S2*), con un núcleo denso (*N*) sólo en una de ellas y un espacio abierto entre ambas para formar la luz capilar (*L*). *C*: fibras de colágeno; *M*: células musculares; *MB*: membrana basal; *UC*: unión celular.

DISCUSIÓN

Una característica importante de un fármaco que se utilice en la angiogénesis terapéutica es su capacidad para estimularla, manteniendo una acción a largo plazo²³. Además, necesita dirigirse específicamente a los tejidos isquémicos y no dar lugar a efectos adversos ni a una angiogénesis patológica²⁴. También son importantes otras características, como la de que alcance una elevada concentración local, que presente un tiempo de exposición suficiente, de re-aplicación simple, administración por vía oral o parenteral, y bajo coste^{23,25}.

La vía de administración es un punto decisivo porque el fármaco ha de alcanzar una concentración que permita la exposición suficiente

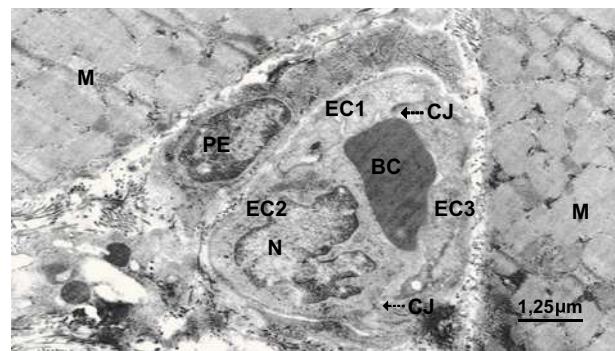


Fig. 3. Electromicrografía del músculo esquelético de una rata del subgrupo IM tratada con PGE_1 examinado en el día 14. Se observa un capilar sanguíneo formado por tres células endoteliales (*EC1*, *S2* y *S3*); están unidas por la unión celular (*UC*), con un núcleo denso (*N*) sólo en una de ellas. *H*: hematíe; *M*: membrana muscular; *PE*: pericito.

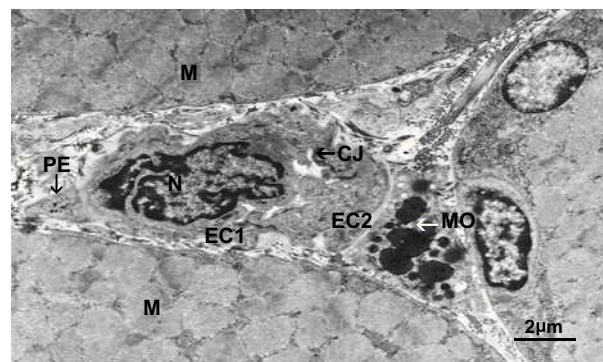


Fig. 4. Electromicrografía del músculo esquelético de una rata del subgrupo IM tratada con PGE_1 examinado en el día 14. Se observa un capilar sanguíneo en formación a partir de dos células endoteliales (*EC1* y *S2*), con un núcleo denso (*N*) sólo en una de ellas. *M*: membrana muscular; *MO*: células mononucleares en proceso de vacuolización; *P*: pericito; *UC*, unión celular.

de los tejidos para su acción. Aunque presenta las limitaciones de la disponibilidad del fármaco en un lugar isquémico, debido a la circulación sanguínea insuficiente en esta área, las vías sistémicas, intramuscular (IM), intravenosa (IV) e intraarterial, son las más usadas en los estudios tanto experimentales como clínicos. Ambas se asocian a ventajas y efectos adversos^{26,27}.

La angiogénesis es modulada por factores de crecimiento localizados en las células endoteliales y en la matriz extracelular^{28,29}. El VEGF²⁹ se asocia con el inicio del proceso de neoformación vascular y se considera un control fiable de ésta. En los tejidos cardíacos isquémicos, la administración exógena de PGE_1 puede estimular

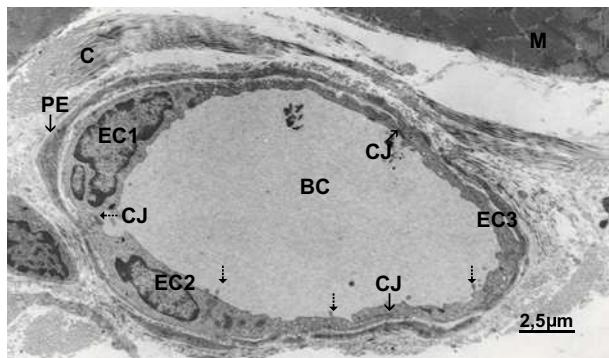


Fig. 5. Electromicrografía del músculo esquelético de una rata del subgrupo IV tratada con PGE₁ examinado en el día 14. Se observa un capilar sanguíneo formado por tres células endoteliales (EC1, S2 y S3); la unión celular (UC) asegura la cohesión entre ellas; se observan pequeños filopodios (flechas) en la superficie luminal. Cerca del capilar están presentes un pericito (PE) y diversas partes de otros. C: fibra de colágeno; H: hematíe; M: membrana muscular.

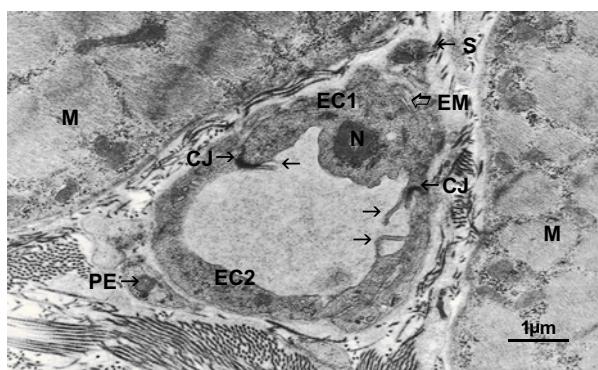


Fig. 6. Electromicrografía del músculo esquelético de una rata del subgrupo IM tratada con PGE₁ examinado en el día 14. Se observa un capilar sanguíneo en formación a partir de dos células endoteliales (EC1 y S2), con un núcleo denso (N) sólo en una de ellas, probablemente al término del proceso de mitosis, y diversos filopodios (flechas) en la superficie luminal. Probablemente es un brote (V) del capilar con la membrana basal difusa en el borde superior. M: membrana muscular; ME: matriz extracelular; PE: pericito; UC: unión celular.

la angiogénesis evaluada a través de la expresión de VEGF^{11,16}. La PGE₁ no estimula directamente el crecimiento endotelial. Su efecto angiogénico parece estar mediado por la acción paracrína de los factores angiogénicos liberados por otras células³⁰, por ejemplo mediante la estimulación de macrófagos para que secreten factores de crecimiento, tal como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y la adenosina, entre otros^{31,32}.

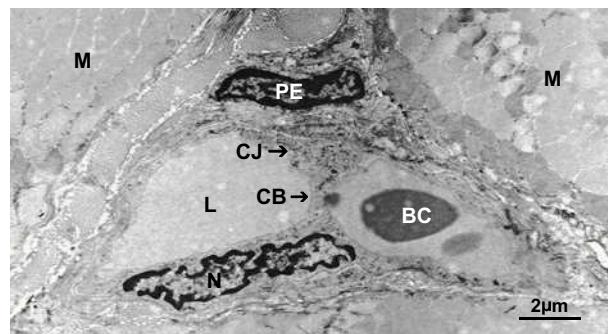


Fig. 7. Electromicrografía del músculo esquelético de una rata del subgrupo IM tratada con PGE₁ examinado en el día 14. Se observa un capilar sanguíneo formado por una célula endotelial (EC1), con un núcleo denso (N), y una luz (L), dividida en dos partes por un puente citoplásmico (CP) de células endoteliales. C: célula muscular; H: hematíe; PE: pericito; UC: unión celular.

La MET fue el método de evaluación que mejor permitió la identificación de algunas estructuras y fenómenos a los que se hace referencia en los estudios biomédicos publicados como "características angiogénicas"³³⁻³⁵. Existen trabajos de investigación documentan las alteraciones morfológicas asociadas a la angiogénesis, tales como la degradación de la membrana basal, proliferación de células endoteliales, brotes laterales, formación de filopodios, o aparición de puentes citoplásmicos dentro de los capilares, así como vacuolización de las células endoteliales^{36,37}.

Otro trabajo de investigación sobre la angiogénesis describe la aparición ultraestructural de una desorganización parcial de la membrana basal capilar seguido de migración de las células endoteliales durante este proceso³⁶. Ésta parece ser la primera prueba de formación de capilares sanguíneos y permite que las células endoteliales migren externamente para formar brotes. A medida que se desarrolla este proceso, es probable que los brotes recién formados se unan a los vasos preexistentes creando anastomosis y una red compleja³⁶. Durante este proceso, aparecen espacios entre las células endoteliales, lo que permite que los hematíes alcancen el espacio intersticial³⁷. Consideramos que los brotes laterales de nuevos vasos, a partir de los preexistentes, se producen debido a la división de las células endoteliales^{36,38}. Los brotes laterales fueron evidentes en el día 14 de seguimiento en animales que recibieron el fármaco por vía intramuscular (fig. 5), observando una desorganización de la matriz celular y proliferación de las células endoteliales.

En este trabajo de investigación, células similares a los macrófagos (fig. 4) se presentan en diversas formas que con frecuencia contienen grandes vacuolas con material electrodenso en su interior. Este hecho fue sugestivo de neoformación vascular, una vez se consideró que la participación de los macrófagos en la inducción de la angiogénesis es importante en la producción de factores humorales que serían responsables del crecimiento de nuevos vasos debido a la degeneración de la matriz celular^{38,39,40} y la estimulación de otras células, como las endoteliales y los fibroblastos, además de otros factores angiogénicos⁴⁰. Los macrófagos siguen siendo responsables de la migración y mitosis de las células endoteliales⁴¹.

En presencia de un estímulo angiogénico en la cara luminal, se genera una respuesta endotelial a través de la producción e invasión de los filopodios que cruzan la luz preexistente para unirse a la pared opuesta de la célula endotelial, por lo que crean una segunda luz vascular⁴². En el día 14 de seguimiento, fue frecuente la presencia de filopodios en animales que recibieron el fármaco tanto IM como IV (figs. 4 y 5). Puesto que este hallazgo no se verificó en el grupo de control, se podría concluir que el fármaco es responsable del efecto estimulante de la angiogénesis.

El “puente” citoplásмico caracteriza la angiogénesis a través de una intususcepción que, a diferencia de los brotes de angiogénesis, es un concepto relativamente nuevo en biología vascular. Describe la formación de una zona de contacto entre las células endoteliales de las caras opuestas, o puente transcapilar. En esta estructura endotelial se observan pericitos, lo que sugiere que probablemente estas células contráctiles se relacionan con el inicio del proceso de intususcepción^{38,43}. Además de un soporte estructural, estos pericitos, próximos a los capilares, participarían en la secreción de componentes de la matriz extracelular⁴². También se ha sugerido la posibilidad de que los pericitos faciliten los movimientos migratorios que se producen durante la neoformación capilar⁴⁴. El análisis del material permitió la identificación de un puente citoplásмico característico de este proceso de intususcepción (fig. 7) y la presencia de pericitos alrededor de los capilares que manifestaron una actividad proliferativa (figs. 3, 4, 6 y 7).

Otro mecanismo descrito en los estudios publicados^{45,46} es la formación de capilares a través de la vasculogénesis a partir de células desconocidas presentes en la circulación sanguínea. Estas células progenitoras circulantes podrían ser células endoteliales, células madre

hematopoyéticas o células madre del tejido conjuntivo⁴⁵.

Aunque no se ha caracterizado la presencia de estas células progenitoras, fue posible identificar la vasculogénesis como fenómeno global en el material estudiado (figs. 2-4). Esto podría verificarse por la presencia de conjuntos de células endoteliales insertadas entre los capilares de la región del tejido conjuntivo y entre las células musculares, favoreciendo la abertura de un espacio entre estas células e iniciando la formación de la luz capilar. Estos conjuntos de células son similares a los islotes sanguíneos que aparecen en el saco vitelino⁴⁷ y también se identifican en el interior del retículo estrellado próximo al estrato intermedio⁴⁸. La presencia de grupos de células en esta región sugiere que, además del proceso de angiogénesis, también tiene lugar un proceso de vasculogénesis⁴². Al igual que los ya observados en otros tejidos estos agregados de células serían responsables de la formación de nuevos vasos a partir de células progenitoras endoteliales o angioblastos.

Estos hallazgos sugieren la presencia de una angio y vasculogénesis en el tejido estudiado, que se atribuyen a la PGE₁, con independencia de la vía de administración.

Durante una década se ha estudiado la angiogénesis terapéutica aplicada a la arteriopatía periférica y ofrece un enorme potencial en un futuro inmediato. Los estudios experimentales han demostrado una mejora del flujo sanguíneo; sin embargo, a pesar de describir cierto grado de eficacia, los primeros estudios clínicos efectuados en seres humanos todavía están lejos de poder extraer conclusiones definitivas^{6,26,49}. La dosis de factor de crecimiento, duración de su acción, vía de administración, los diversos lugares donde los fármacos pueden actuar, la selección y heterogeneidad de pacientes, los inhibidores endógenos de la angiogénesis y el potente efecto placebo son factores limitantes²³⁻²⁵. El uso continuo de algunos fármacos (aspirina, isosorbida, nitratos, espironolactona, furosemida, captopril, bumetamida, lovastatina e inhibidores de la ciclooxygenasa y claritromicina), al igual que la edad avanzada, dislipemia, tabaquismo y diabetes también pueden afectar a los resultados de los estudios clínicos, una vez que estos preparados actúen como inhibidores de la angiogénesis⁵⁰.

No se ha alcanzado un consenso sobre el factor angiogénico ideal, o si sería necesario el uso de una combinación de factores de crecimiento para potenciar y mantener la angiogénesis⁵¹. El aspecto más importante en el ciclo vital de estos vasos

sanguíneos y la clave para el desarrollo de tratamientos que estimulen e inhiban la angiogénesis pueden ser los procesos celulares y moleculares básicos sobre la maduración de los vasos sanguíneos^{8,52}. Los rápidos avances en este campo y en los sistemas de liberación de fármacos harán que la angiogénesis terapéutica sea de elección como tratamiento de referencia para las enfermedades isquémicas^{53,54}.

Por consiguiente, el modelo de isquemia de extremidad posterior de rata podría permitir que se emprendieran otras investigaciones sobre angiogénesis. La identificación con MET de las estructuras morfológicas y fenómenos aquí descritos, así como los hallazgos de otros estudios publicados con anterioridad, son congruentes con la hipótesis expuesta en este trabajo experimental.

BIBLIOGRAFÍA

1. Donnelly R, Yeung JMC. Therapeutic angiogenesis: a step forward in intermittent claudication. *Lancet* 2002;359: 2048-2050.
2. Becker C, Lacchini S, Muotri AR, et al. Skeletal muscle cells expressing VEGF induce capillary formation and reduce cardiac injury in rats. *Int J Cardiol* 2006;113(3):348-354.
3. Kenpinas WD. O desenvolvimento do sistema vascular. In: Maffei Doenças Vasculares Periféricas. 2nd ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2002. pp 3-17.
4. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-1186.
5. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999;103:1231-1236.
6. Di Stefano R, Limbruno U, Barone D, Balbarini A. Angiogenesi terapeutica nell'ischemia critica degli arti inferiori. Revisione della litteratura e prospettive della ricerca sulle cellule staminali. *Ital Heart J Suppl* 2004;5:1-13.
7. Clover AJP, McCarthy MJ. Developing strategies for therapeutic angiogenesis: vascular endothelial growth factor alone may not be the answer. *Br J Plast Surg* 2003;56:31-34.
8. Darland DC, D'Amore PA. Blood vessel maturation: vascular development comes of age. *J Clin Invest* 1999;103:157-158.
9. Chae JK, Kim I, Lim ST, et al. Coadministration of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2573-2578.
10. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis *J Biol Chem* 1992;267: 1031-1034.
11. Mehrabi MR, Ekmekcioglu C, Stanek B, et al. Angiogenesis stimulation in explanted hearts from patients pre-treated with intravenous prostaglandin E₁. *J Heart Lung Transplant* 2001;20:465-473.
12. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995;333:1757-1763.
13. Murohara T, Asahara T, Silver M, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 1998;101:2567-2578.
14. Awda JA, Soteriou MC, Drougas JG, Stokes KA, Roberts LJ, II, Pinson CW. Plasma prostaglandin E₁ concentrations and hemodynamics during intravenous infusions of prostaglandin E₁ in humans and swine. *Transplantation* 1996;61:1624-1629.
15. Pacher R, Stanek B, Hülsmann M, Sinzinger H. Effect of prostaglandin E₁ infusion in severe chronic heart failure. *Prostaglandins* 1997;53:221-235.
16. Mehrabi MR, Serbecic N, Tamaddon F, et al. Clinical benefit of prostaglandin E₁-treatment of patients with ischemic heart disease: stimulation of therapeutic angiogenesis in vital and infarcted myocardium. *Biomed Pharmacother* 2003;57:173-178.
17. Mehrabi MR, Serbecic N, Tamaddon F, et al. Clinical and experimental evidence of prostaglandin E₁-induced angiogenesis in the myocardium of patients with ischemic heart disease. *Cardiovasc Res* 2002;56(2):214-224.
18. Hayashi S, Morishita R, Nakamura S, et al. Potential role of hepatocyte growth factor, a novel angiogenic growth factor, in peripheral disease. *Circulation* 1999;100(Suppl. II). II-301-II-308.
19. Rakue H, Nakajima H, Katoh T, et al. Low-dose basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor for angiogenesis in canine acute hindlimb insufficiency. *Jpn Circ J* 1998;62:933-939.
20. Carmeliet P, Moons L, Collen D. Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis. *Cardiovasc Res* 1988;39:8-33.
21. Suzuki M, Iso-o N, Takeshita S, et al. Facilitated angiogenesis induced by heme oxygenase-1 gene transfer in a rat model of hindlimb ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;302:138-143.
22. 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.
23. Henry T. Therapeutic angiogenesis. *Br Med J* 1999;318: 1536-1539.
24. Willians RS, Annex BH. Plasticity of myocytes and capillaries. *Circ Res* 2004;94:7-8.
25. Simons M. Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation* 2005;111:1556-1566.
26. Barandon L, Leroux L, Dufourcq P, et al. Gene therapy for chronic peripheral arterial disease: what role for the vascular surgeon? *Ann Vasc Surg* 2004;18:758-765.
27. Al-Khalidi A, Al-Sabit H, Galipeau J, Lachapelle K. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg* 2003;75:204-209.
28. Rosengart TK, Bundenbender KT, Duenas M, Mack CA, Zhang QX, Isom OW. Therapeutic angiogenesis: a comparative study of the angiogenic potential of acidic fibroblast growth factor and heparin. *J Vasc Surg* 1977;26: 302-312.
29. Ito WD, Arras M, Scholz D, Winckler B, Htun P, Schaper W. Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1997;273:H1255-H1265.
30. Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E₂ and E₁ in osteoblasts. *J Clin Invest* 1994;93:2490-2496.
31. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-447.
32. Smid M, Husek P. Vasoconstrictor reaction to prostaglandins E1 and E2 in isolated rat hindlimb mediated through serotonin release. *Eur J Pharmacol* 1993;230:69-76.

33. Kofidis T, Nolte D, Simon AR, et al. Restoration of blood flow and evaluation of corresponding angiogenic events by scanning electron microscopy after a single dose of VEGF in a model of peripheral vascular disease. *Angiogenesis* 2002;5: 87-92.
34. Downs KM. Florence Sabin and the mechanism of blood vessel lumenization during vasculogenesis. *Microcirculation* 2003;10:5-25.
35. Egginton S, Gerritsen M. Lumen formation in vivo versus in vitro observation. *Microcirculation* 2003;10:45-61.
36. Zhou AL, Egginton S, Hudlická O. Capillary growth in overloaded hypertrophic adult rat skeletal muscle: an ultrastructural study. *Anat Rec* 1998;252:49-63.
37. Baratella L, Arana-Chavez VE, Katchburian E. Macrophages and apoptosis in the stellate reticulum of the rat enamel organ. *J Anat* 2000;197:303-306.
38. Hirschberg RM, Sachtleben M, Plendl J. Electron microscopy of cultured angiogenic endothelial cells. *Microsc Res Tech* 2005;67:248-259.
39. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Valladares F, Varela H, Perez M. Intense vascular sprouting from rat femoral vein induced by prostaglandins E₁ and E₂. *Anat Rec* 1994;238:68-76.
40. Lingen MW. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:67-71.
41. Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 1994; 55:410-422.
42. Egginton S, Gerritsen M. Lumen formation in vivo versus in vitro observation. *Microcirculation* 2003;10:45-61.
43. Burri HP, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis—the alternative to capillary sprouting. *Mol Aspects Med* 2002;23: S1-S27.
44. Thomas EW. Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res. Rev* 1999;31:42-57.
45. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Roncali L, Dammaco F. Postnatal vasculogenesis. *Mech Dev* 2001;100:157-163.
46. Drake CJ. Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003;69:73-82.
47. Risau W. Differentiation of endothelium. *FASEB J* 1995;9: 926-933.
48. Manzke E. Aspectos estruturais da neoformação vascular do órgão do esmalte de molares de ratos [Tese-Mestrado]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 2004.
49. Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, et al. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study). *Lancet* 2002;359:2053-2058.
50. Abo-Auda W, Benza RL. Therapeutic angiogenesis: review of current concepts and future directions. *J Heart Lung Transpl* 2003;22:370-382.
51. Palmer-Kazen U, Wariaro D, Luo F, Wahlberg E. Vascular endothelial cell growth factor and fibroblast growth factor 2 expression in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg* 2004;39:621-628.
52. Yancopoulos GD, Davis S, Galé NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407:242-248.
53. Ferreira AC. Therapeutic angiogenesis. The present and the future. *Arq Bras Cardiol* 2002;78:145-147.
54. Tang GL, Chang DS, Sarkar R, Wang R, Mesina LM. The effect of gradual or acute arterial occlusion on skeletal muscle blood flow, arteriogenesis, and inflammation in rat hindlimb ischemia. *J Vasc Surg* 2005;41:312-320.