

# Trasplante de células mononucleares progenitoras derivadas de médula ósea por vía endovenosa retrógrada distal para inducir angiogénesis en miembros inferiores con isquemia

*Progenitor mononuclear cell transplantation derived from bone marrow through distal retrograde endovenous route in order to induce angiogenesis in the lower members with ischemia*

Dr. Luis Padilla Sánchez, Dr. Juan Rodríguez-Trejo, Dr. Ignacio Escotto Sánchez, Dr. José De Diego Flores Chapa, Dr. Neftalí Rodríguez Ramírez, Dr. Edgar Krötzsch Gómez, Dr. Fernando Villegas Álvarez, Dr. Takeshi Landero Yoshioka, Biol. Pilar Hazel Carranza Castro, Dr. Jonathan Goldberg Gutfrajnd, Dr. Mauricio Di Silvio López

## Resumen

**Objetivo:** Probar que el trasplante de células mononucleares progenitoras autólogas derivadas de la médula ósea (CMP) vía vena femoral distal en la extremidad isquémica de la rata, genera mayor angiogénesis y vasculogénesis que el trasplante intramuscular.

**Sede:** Centro Médico Nacional 20 de Noviembre (tercer nivel de atención).

**Diseño:** Estudio experimental, prospectivo, comparativo y aleatorio.

**Análisis estadístico:** Prueba de Kruskal-Wallis.

**Material y métodos:** 30 ratas Sprague-Dawley se dividieron en tres grupos. A todos los animales se les practicó un modelo de isquemia. A los grupos No. 2 y No. 3 se les aplicó el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) 5 µg por kg intramuscular por cinco días, seguido de aspiración de 3 ml de sangre vía punción de vena cava, obteniendo las CMP con la técnica de gradiente de ficoll.

**Grupo No. 1 –** 10 ratas que recibieron solución salina vía intramuscular. **Grupo No. 2 -** 10 ratas que

## Abstract

**Objective:** To prove that autologous progenitor (stem) mononuclear cell transplantation derived from the bone marrow (PMC) through the distal femoral route in the ischemic extremity of rats generates higher angiogenesis and vasculogenesis than intramuscular transplantation.

**Place:** “20 de Noviembre” National Medical Center (third-level attention hospital).

**Design:** This was a prospective, comparative and randomized study.

**Statistical analysis:** Kruskal-Wallis test.

**Material and methods:** Thirty Sprague-Dawley rats were divided into three groups. Every animal was practiced an ischemia model. Groups N° 2 and N° 3 were applied the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) at a dose of 5 µg per intramuscular kg during five days, followed by the aspiration of 3 ml of blood via cava vein puncture. The PMCs were obtained through the Ficoll gradient.

**Group N° 1 –** Ten rats that received saline solution through intramuscular route. **Group N° 2 –** Ten rats

---

Servicios de Cirugía Experimental y Unidad de Microcirugía, Angiología, Cirugía Vascular y Endovascular, Hematología y Laboratorio de Tejido Conectivo y Trasplante Celular del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE y Departamento de Cirugía. Unidad de Microcirugía. Facultad de Medicina UNAM.

Recibido para publicación: 10 septiembre 2009

Aceptado para publicación: 2 octubre 2009

Trabajo con Apoyo Financiero del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social del CONACYT: Clave del Proyecto: Salud 2004-COI-152

Correspondencia: Dr. Luis Padilla Sánchez. Millet Núm. 83 – 206 Col. Extremadura Insurgentes, México, D.F., 03740  
E-mail: lpadilla@issste.gob.mx  
padilu@servidor.unam.mx

recibieron trasplante de  $3.4 \times 10^5 \pm 1.1$  CMP por vía intramuscular. Grupo No. 3 – 8 ratas que recibieron trasplante de  $3.4 \times 10^5 \pm 1.1$  CMP por vía intravenosa distal. A 30 días del trasplante se practicaron angiografías utilizando una matriz milimétrica para cuantificar las intersecciones de los vasos de neoformación y determinar el “índice angiográfico”. **Resultados:** En el grupo No. 1 obtuvimos un promedio de 17 intersecciones, en el grupo No. 2 de 21.5 y en el grupo No. 3 de 57 (Est. H = 17.58079 p = 0.0002)

**Conclusión:** El trasplante de CMP por vía venosa distal en la extremidad isquémica de la rata, genera mayor angiogénesis y vasculogénesis que la vía intramuscular.

**Palabras clave:** Trasplante de células madre, angiogénesis, vasculogénesis, isquemia.

Cir Gen 2009;31:213-218

## Introducción

El 30% de los pacientes con isquemia de miembros inferiores, no son candidatos a revascularización con derivaciones arteriales y/o procedimientos endovasculares y la evolución natural de la enfermedad es hacia la progresión, con dolor en reposo, úlceras, gangrena, sepsis y amputación.<sup>1</sup>

En un artículo de revisión sobre la terapéutica médica en la claudicación intermitente, Rowlands<sup>2</sup> menciona la importancia de la aplicación de estrategias novedosas para aumentar la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis – vasculogénesis) en pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores.

Desde 1979, nuestro grupo se interesó por estudiar experimentalmente microprótesis vasculares de origen biológico o sintético de 1 y 2 mm de diámetro, utilizando como modelo la sustitución de segmentos de aorta y vena cava en la rata. La justificación de la línea de investigación la fundamentamos en la necesidad de contar con este material para resolver casos de microcirugía clínica en ausencia de venas autólogas necesarias para restablecer la circulación arterial y venosa de colgajos libres, reimplantes y trasplantes de tejidos.<sup>3-8</sup> Durante el desarrollo del trabajo experimental en el que utilizamos microprótesis de origen fibrocolágeno,<sup>8</sup> llamó nuestra atención la red vascular externa de neoformación durante la preparación y disección del tubo de silastic en el tejido celular subcutáneo de la rata, por lo que iniciamos una revisión bibliográfica sobre el fenómeno de angiogénesis “in vitro” e “in vivo” y encontramos que Symes,<sup>9</sup> Baffour<sup>10</sup> e Isner,<sup>11</sup> demostraron que aplicando citocinas como el factor de crecimiento fibroblástico beta (bFGF) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) por vía intramuscular en conejos con isquemia experimental en miembros inferiores, se logra la proliferación de vasos de neoformación (angiogénesis).

that received a transplantation of  $3.4 \times 10^5 \pm 1.1$  PMCs by intramuscular route.

Group N° 3 – Eight rats that received a transplantation of  $3.4 \times 10^5 \pm 1.1$  PMCs by distal endovenous route. At 30 after the transplantation, it was practiced angiographies using a millimetric matrix in order to quantify the intersections of the neoformation vessels and determine the “angiographic index”.

**Results:** In group N° 1, we obtained an average of 17 intersections; in group N° 2, 21.5 intersections; and in group N° 3, 57 intersections (Stat. H = 17.58079 p = 0.0002)

**Conclusion:** Progenitor mononuclear cell (PMC) transplantation through endovenous route in the ischemic extremity of rats generates higher angiogenesis and vasculogenesis than by intramuscular route.

**Key words:** Stem cell transplantation, angiogenesis, vasculogenesis, ischemia.

Cir Gen 2009;31:213-218

En 1994 Jackson<sup>12</sup> reporta que agregando heparina y colágeno tipo I a un cultivo de células endoteliales, éstas se reproducen y forman tubos capilares “in vitro”. En nuestro laboratorio imitamos la técnica de Jackson pero a nivel de músculo isquémico en miembros inferiores de la rata, formando un túnel muscular fibrocolágeno receptor de células endoteliales y heparina; logrando angiogénesis significativa.<sup>13</sup>

Se ha demostrado en experimentos “in vitro” e “in vivo” que la “célula endotelial progenitora” (CEP) induce angiogénesis y vasculogénesis, presentando en su superficie celular los antígenos CD34+, CD31+, CD133+ y Flk-1 procediendo de los angioblastos y éstos de los hemangioblastos de la médula ósea y que para la formación eficiente de una red de nuevos vasos sanguíneos se requiere de la “colaboración” de las células hematopoyéticas progenitoras (CHP) que también proceden de los hemangioblastos<sup>14</sup> (**Figura 1**).

Utilizando un modelo de isquemia muscular en ratas, nuestro grupo demostró que puede inducirse angiogénesis efectiva al trasplantar CMP derivadas de la médula ósea en túneles fibrocolágenos, utilizados como “andamiaje” para facilitar la sobrevida, la diferenciación y la interacción de factores de crecimiento, citocinas y células involucradas en el proceso de isquemia, reperfusión y cicatrización.<sup>15</sup> En otro de nuestros estudios experimentales, en perros con modelo de isquemia muscular en la extremidad inferior, corroboramos que movilizando las CMP a la sangre periférica aplicando G-CSF y transplantándolas en túneles fibrocolágenos incrementamos significativamente la angiogénesis en comparación al trasplante celular sin G-CSF.<sup>16</sup>

Con los antecedentes experimentales en animales, obtuvimos la autorización de los Comités de Investigación y Ética del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” para iniciar un estudio experimental en seres humanos.

Practicamos el trasplante celular en ocho extremidades inferiores con isquemia crítica de ocho pacientes a través de túneles musculares fibrocolágenos; obteniendo las CMP de la sangre periférica por citaféresis después de haberlas movilizado de la médula ósea con G-CSF.

El resultado inicial fue de mejoría clínica significativa en cinco extremidades y mala evolución en tres que mejoraron su perfusión vascular proximal, pero desarrollaron necrosis de ortejos. Interpretamos que en estos tres pacientes el trasplante no logró que las células llegaran a los vasos capilares digitales. Revisando la bibliografía encontramos dos trabajos clave para desarrollar nuestra nueva hipótesis experimental que son:

Gross<sup>17</sup> emboliza islotes pancreáticos por vía venosa portal en los sinusoides hepáticos, logrando producción de insulina y control de la diabetes mellitus y Bartsch<sup>18</sup> inyecta células mononucleares en el músculo y por vía intra-arterial femoral en pacientes con isquemia de miembros inferiores, logrando buenos resultados. Tomando las ideas de Gross y Bartsch, diseñamos una técnica de trasplante celular que permite llegar a los vasos capilares digitales a través de la vena safena distal en el pie y evitar la gangrena de ortejos. Antes de aplicar clínicamente el procedimiento desarrollamos un estudio experimental en ratas.

Como experimento preliminar previo al trasplante celular, practicamos la disección de la vena femoral común, profunda y superficial. A través de un catéter colocado en la vena femoral superficial, respetando la femoral profun-

da, perfundimos 1 ml de tinta china para demostrar la tinción de vasos capilares intramusculares (**Figura 2**).

### Material y métodos

Se realizó un estudio experimental, prospectivo, comparativo y aleatorio utilizando 30 ratas Sprague-Dawley, machos de peso estimado de 250-300 gramos. (Harlan México, S. A. de C. V.) manejadas de acuerdo a las guías del Comité de Investigación y Ética del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" y de la Ley General de Salud Mexicana, referente a los estudios experimentales con animales.

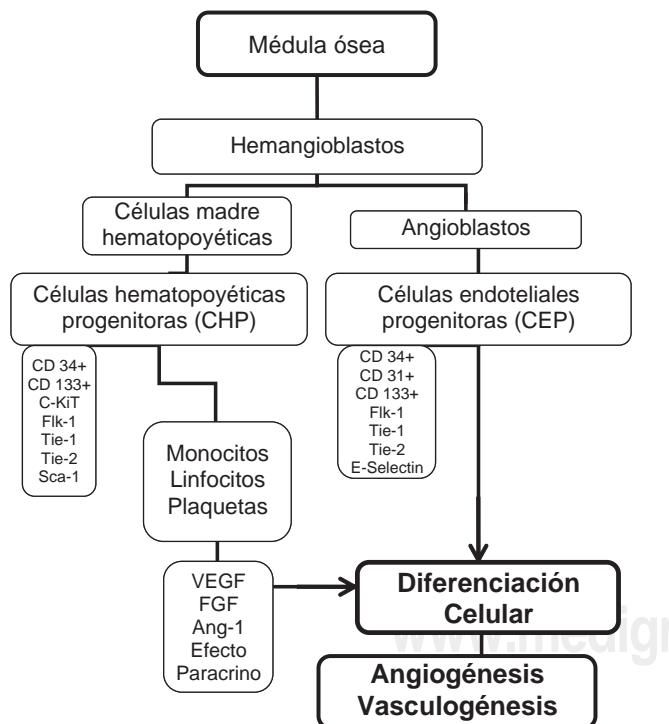
Como experimento preliminar previo al trasplante celular, practicamos la disección de la vena femoral común, profunda y superficial. A través de un catéter colocado en la vena femoral superficial, respetando la femoral profunda, perfundimos 1 ml de tinta china para demostrar la tinción de vasos capilares intramusculares (**Figura 2**).

### Grupos experimentales

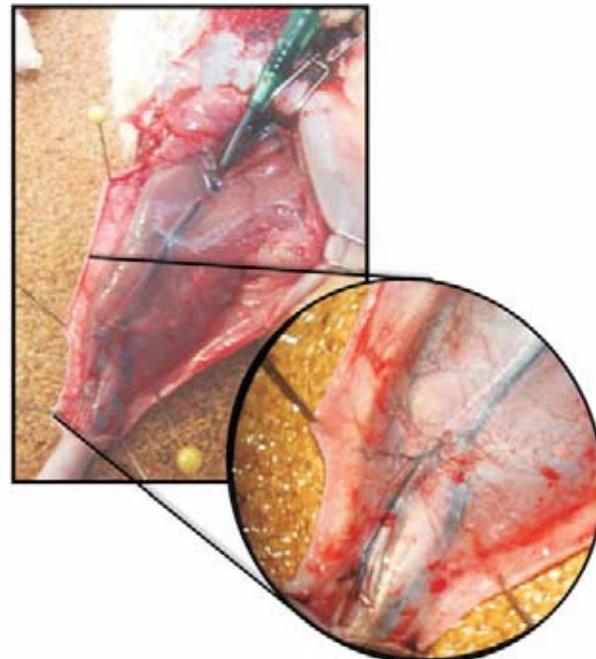
Grupo No. 1 Compuesto por 10 ratas con modelo de isquemia de la extremidad inferior que recibieron solución salina por vía intramuscular (músculo gracilis).

Grupo No. 2 Compuesto por 10 ratas con modelo de isquemia de la extremidad inferior que recibieron trasplante de  $3.4 \times 10^5$  de CMP por vía intramuscular (músculo gracilis).

Grupo No. 3 Compuesto por 8 ratas con modelo de isquemia de la extremidad inferior que recibieron tras-



**Fig. 1.** Esquema que demuestra la colaboración entre las células endoteliales progenitoras (CEP) y las citocinas que producen los monocitos, linfocitos y plaquetas para inducir angiogénesis y vasculogénesis.



**Fig. 2.** Perfusión de tinta china a través de la vena femoral superficial en la rata.

plante de  $3.4 \times 10^5$  de CMP por vía intravenosa distal (vena femoral superficial).

#### Técnica quirúrgica

El objetivo del modelo quirúrgico fue el de crear experimentalmente isquemia subaguda de la extremidad inferior derecha de las ratas en dos tiempos operatorios.

Posterior a laparotomía media ligamos la arteria ilíaca externa derecha con seda 7-0 preservando la arteria ilíaca interna. El segundo tiempo lo llevamos a cabo siete días después, ligando la arteria femoral profunda y excisión completa de la arteria femoral superficial.

Al día siguiente del segundo procedimiento quirúrgico en los grupos No. 2 y No. 3, iniciamos la aplicación de G-CSF a una dosis de 5 µg por kg de peso por vía intramuscular durante 5 días.

Veintiún días después del primer procedimiento quirúrgico realizamos la punción de la vena cava inferior a través de minilaparotomía utilizando un catéter de 22GA previamente heparinizado, obteniendo 3 ml de sangre de donde aislamos las CMP, mediante técnica por gradiante de ficoll.

#### Técnica por gradiente de Ficoll y trasplante celular

En un tubo cónico de 15 ml, se adicionaron 6 ml de Histoque a los 3 ml de sangre centrifugando a 400 xg por 30 min., se retiró el sobrenadante, obteniendo un halo de células mononucleares las cuales fueron colocadas en otro tubo cónico nuevo agregándole 5 ml de PBS (buffer de fosfato) realizando una segunda centrifugación a 250 xg por 10 min. Nuevamente retiramos el sobrenadante, agregando 5 ml más de PBS al botón de células llevando a cabo un tercer lavado. Se decanta el sobrenadante y con pipeta extraemos el líquido restante. Finalmente resuspendemos el botón de células ajustando a 5 µl más 95 µl de PBS dando 100 µl de CMP para el trasplante celular. Se tomaron 20 µl de CMP y 20 µl de azul trípano para realizar el conteo y viabilidad celular depositándolas en el hematocitómetro (cámara de Neubauer).

El grupo No. 2 recibió el trasplante celular por vía intramuscular (músculo gracilis) y en el grupo No. 3, se llevó a cabo a través de la vena femoral superficial por debajo de la vena femoral profunda, forzando el sentido de la circulación con la presión de la jeringa, ligando y seccionando el vaso. La cantidad de células transplantadas en cada rata fue de  $3.4 \times 10^5 \pm 1.1$  en un volumen total de 80 µl (345,377 células promedio).

A los 30 días del trasplante celular llevamos a cabo en cada rata un estudio angiográfico, canulando la aorta abdominal con catéter hasta la bifurcación de las arterias ilíacas. Administrando 3 ml de medio de contraste (Optiray-30, Mallinckrodt, Québec, Canadá) obteniendo imágenes de ambas extremidades.

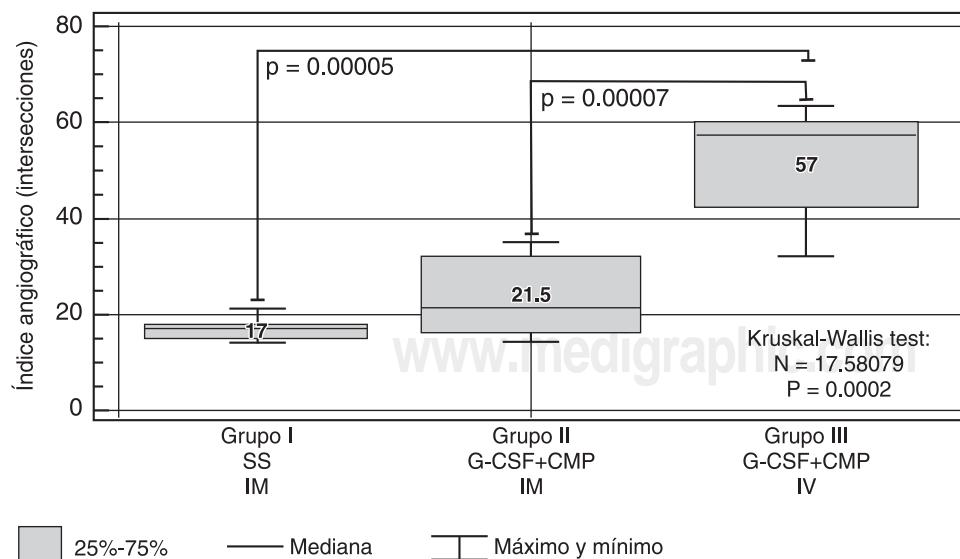
A partir de una copia "calca" en un acetato de cada arteriografía cuantificamos el número de intersecciones de los vasos sanguíneos (índice angiográfico), empleando una matriz milimétrica en un área de 5 x 5 cm en donde los valores son adquiridos sumando los puntos de intersección de la neovasculatura.

Análisis estadístico: debido a que los datos obtenidos reflejan una distribución no paramétrica las comparaciones del índice angiográfico entre los grupos según el número de intersecciones se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis considerando diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$ .

#### Resultados

En el grupo No. 1 de solución salina se obtuvo un promedio de 17 intersecciones en las 10 ratas evaluadas. En el grupo No. 2 de trasplante celular por vía intramuscular un promedio de 21.5 en 10 ratas y en el grupo No. 3 de trasplante celular por vía intravenosa distal, un promedio de 57 intersecciones en 8 ratas (**Figura 3**). El análisis estadístico de Kruskal-Wallis indicó:  $H = 17.58079$ , lo que implica una significación estadística de  $p = 0.0002$ .

En la **figura 4** se observan imágenes angiográficas de los tres grupos experimentales y que sirvieron para



**Fig. 3.** Índice angiográfico (intersecciones). Diferencias entre los grupos; (SS) Solución salina, (G-CSF) Factor estimulante de colonias de granulocitos, (CMP) Células mononucleares progenitoras (IM) Intramuscular, (IV) Intravenoso.

calcular el número de intersecciones y determinar el índice angiográfico.

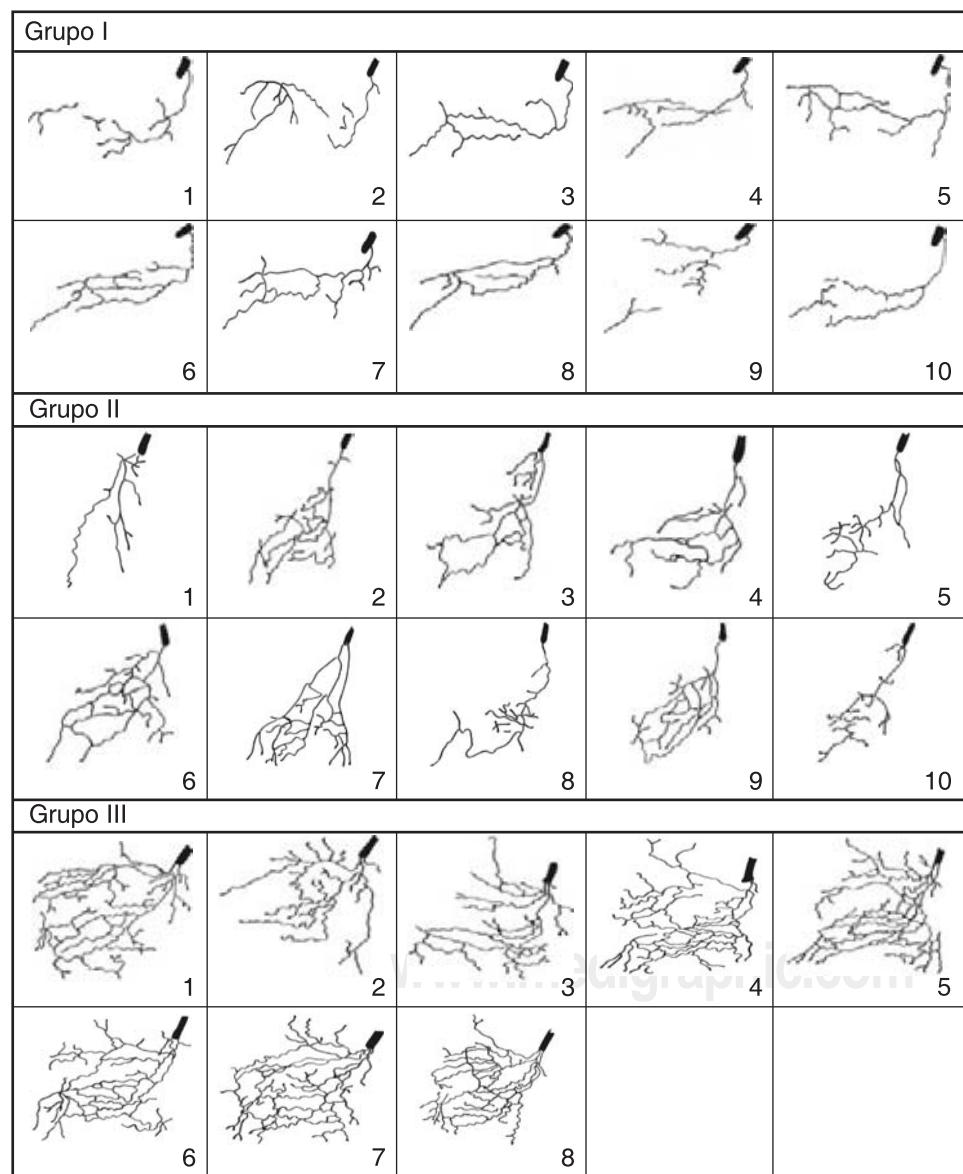
Los resultados de este estudio demuestran la mayor inducción de angiogénesis con el procedimiento de trasplante celular por vía endovenosa distal, lo que confirmaría la hipótesis de que la vía endovenosa por la safena distal en el pie de pacientes con isquemia crítica puede ser la técnica que lleve las CMP a los vasos capilares digitales y con esto mejorar la siembra celular, desarrollando angiogénesis y vasculogénesis terapéutica.

## Discusión

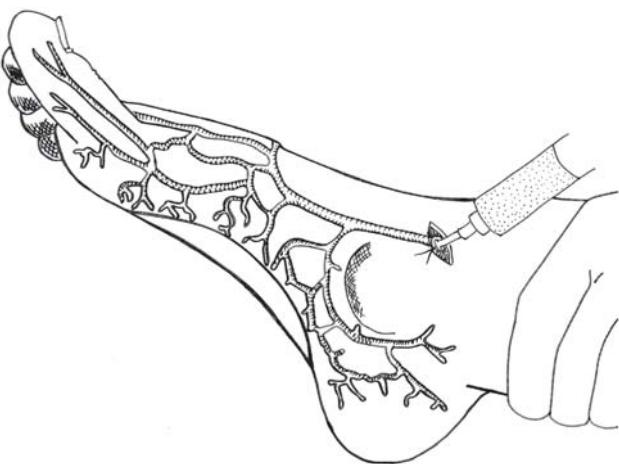
En este estudio experimental en ratas, quedó demostrado que el trasplante de CMP por vía endovenosa retrógrada distal mejora significativamente la isquemia de la extremidad inferior, obteniendo 57 intersecciones

en promedio (índice angiográfico), contra 21.5 de intersecciones con el trasplante intramuscular ( $p = 0.0002$ ).

Parece que las CMP se adhieren al endotelio del segmento capilar más pequeño y sobreviven, logrando su reproducción, especializándose en células endoteliales y generando angiogénesis y vasculogénesis. Cuando Gross<sup>17</sup> emboliza las células pancreáticas a través de la vena porta, éstas se adhieren al endotelio de los sinusoides hepáticos produciendo insulina, pero tienen el inconveniente biológico de no tener reproducción celular como en el caso de las CMP. La ventaja de reproducción y especialización celular la observamos desde nuestros estudios previos en ratas<sup>15</sup> y en perros<sup>16</sup> en donde utilizamos túneles fibrocolágenos como "andamiaje" para facilitar la sobrevida y diferenciación celular. El crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (neo-vascularización) es un proceso que ocurre por la vía de dos mecanismos: El



**Fig. 4. Modelos vasculares obtenidos de las angiografías. Se utilizó un área de 5 x 5 cm en papel milimétrico para calcular el número de intersecciones que son expresadas en el índice angiográfico. Grupo I: solución salina (aplicación intramuscular). Grupo II: células mononucleares progenitoras (aplicación intramuscular). Grupo III: células mononucleares progenitoras (aplicación intravenosa).**



**Fig. 5. Técnica de trasplante de células mononucleares progenitoras (CMP) a través de la vena safena distal en el pie de forma retrógrada (compresión manual de la circulación de retorno venoso).**

brote de células endoteliales residentes pre-existentes (angiogénesis) o al reclutamiento de células endoteliales progenitoras derivadas de la médula ósea (vasculogénesis).

Tepper<sup>19</sup> demuestra que como estímulo el tejido isquémico libera factores de crecimiento (citocinas) que son responsables de la movilización de las células endoteliales progenitoras derivadas de la médula ósea y que pueden diferenciarse “in situ” en redes de vasos capilares funcionales cuando el conglomerado de CMP se alinea siguiendo la dirección del gradiente isquémico formando cordones vasculares que se reconectan (vasculogénesis).

Las CMP son “células madre” adultas que se caracterizan por “no saber” en qué se especializarán y reciben instrucciones de las células que las rodean y por eso es posible inyectarlas, esperando que se conviertan en el tejido apropiado (diferenciación celular).

Apoyados por la experiencia en animales de laboratorio iniciamos el trasplante de CMP en extremidades de pacientes con isquemia de miembros inferiores, obteniendo las células por citoférésis posterior a movilización con G-CSF; los resultados de este nuevo estudio serán motivo de otra comunicación.

Por tanto, los resultados del presente estudio experimental concluyen que el trasplante de CMP por vía venosa distal en la extremidad isquémica de la rata genera mayor angiogénesis y vasculogénesis que la vía intramuscular.

### Agradecimiento

Agradecemos la colaboración en la elaboración de este trabajo a:

Q.F.B. Carmen Magdalena Peña. Apoyo en el laboratorio de cultivo celular ISSSTE-UNAM

Q.F.B. Graciela Villeda. Apoyo en el laboratorio de cultivo celular ISSSTE-UNAM

MAT. Jorge Galicia. Apoyo en el análisis estadístico.

C. María Elena Aguilar. Apoyo en la redacción y revisión del documento.

### Referencias

- Dormandy JA, Rutherford RB. Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. Trans Atlantic Inter-Society Consensus (TASC). *J Vasc Surg* 2000; 31: S1-S278.
- Rowlands TE, Donnelly R. Medical therapy for intermittent claudication. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007; 34: 314-21.
- Padilla-Sánchez L, Valle-González A, Sánchez-Cisneros R. Grafts of bovine arteries pre-treated with proteolytic enzymes into rats. *Arch Inst Cardiol Mex* 1983; 53: 91-8.
- Padilla L, Sastre N, Chousleb A, Di Silvio M, Contreras M, Manzano B, et al. Polytetrafluoroethylene microprostheses in the venous system of the rat. *J Reconstr Microsurg* 1987; 3: 159-63.
- Padilla L, Valle A, Carrillo H, Di Silvio M, Contreras M, Viniegra F, et al. Polytetrafluoroethylene microprostheses in the arterial system of the rat. *J Reconstr Microsurg* 1987; 4: 33-7.
- Padilla SL, Chousleb KA, Di Silvio LM, Shultze RA, Ornelas L, Rocha HG. Injertos vasculares biológicos para microcirugía. *Rev Fac Med (Mex)* 1990; 33: 11-18.
- Padilla SL, Chousleb KA, Di Silvio LM, Vázquez CJ, Chávez V, Rodríguez TJ. Microprótesis de politetrafluoroetileno de pared delgada. *Rev Méx Angiol* 1991; 19: 14-19.
- Padilla SL, Carrillo-Soto IA, García GMV, Valdés GR. Angiogénesis inducida por túneles fibrocolágenos. *Cir Gen* 1996; 18: 123-8.
- Pu LQ, Sniderman AD, Brassard R, Lachapelle KJ, Graham AM, Lisbona R, et al. Enhanced revascularization of the ischemic limb by angiogenic therapy. *Circulation* 1993; 88: 208-15.
- Baffour R, Berman J, Garb JL, Rhee SW, Kaufman J, Friedmann P. Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by *in vivo* administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose-response effect of basic fibroblast growth factor. *J Vasc Surg* 1992; 16: 181-91.
- Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, et al. Site-specific therapeutic angiogenesis after systemic administration of vascular endothelial growth factor. *J Vasc Surg* 1995; 21: 314-24.
- Jackson CJ, Giles I, Knop A, Nethery A, Schrieber L. Sulfated polysaccharides are required for collagen-induced vascular tube formation. *Exp Cell Res* 1994; 215: 294-302.
- Padilla SL, Figueroa BS, Carrillo SI, King AC, Schalch LP, Mollinedo RH. Angiogénesis inducida por colágena polivinilpirrolidona y heparina en el músculo isquémico. *Cir Gen* 1999; 67: 59-65.
- Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003; 9: 702-12.
- Padilla L, Krötzsch E, Schalch P, Figueroa S, Miranda A, Rojas E, et al. Administration of bone marrow cells into surgically induced fibrocollagenous tunnels induces angiogenesis in ischemic rat hindlimb model. *Microsurgery* 2003; 23: 568-74.
- Padilla L, Krötzsch E, De La Garza AS, Figueroa S, Rodriguez-Trejo J, Avila G, et al. Bone marrow mononuclear cells stimulate angiogenesis when transplanted into surgically induced fibrocollagenous tunnels: results from a canine ischemic hindlimb model. *Microsurgery* 2007; 27: 91-7.
- Goss JA, Soltes G, Goodpastor SE, Barth M, Lam R, Brunacci FC, et al. Pancreatic islet transplantation: the radiographic approach. *Transplantation* 2003; 76: 199-203.
- Bartsch T, Brehm M, Zeus T, Kögl 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: 891-9.
- Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, Ceradini DJ, Callaghan MJ, Kleinman ME, et al. Adult vasculogenesis occurs through *in situ* recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood* 2005; 105: 1068-77.