



TESE DE DOUTORAMENTO

Beneficios de la Hormona de
Crecimiento (GH) para el
Tratamiento de la Isquemia de
Miembros Inferiores: del
Laboratorio al Escenario Clínico

Diego Jesús Caicedo Valdés

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN ENDOCRINOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA
ANO 2020

Declaración do autor/a da tese

D./Dna. Diego Caicedo Valdés

Título da tese: Beneficios de la Hormona de Crecimiento (GH) para el Tratamiento de la Isquemia de miembros Inferiores: del Laboratorio al Escenario Clínico

Presento a miña tese, seguindo o procedimento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo
- 2) De ser o caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo
- 3) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para obtención doutros títulos.

E comproméutome a presentar o Compromiso Documental de Supervisión no caso de que o orixinal non estea na Escola.

En Santiago de Compostela, 08 de Outubro de 2020



AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE

BENEFICIOS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) PARA EL TRATAMIENTO DE LA ISQUEMIA DE MIEMBROS INFERIORES: DEL LABORATORIO AL ESCENARIO CLÍNICO

D. Víctor Manuel Arce Vázquez

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D. **Diego Jesús Caicedo Valdés**, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

De acordo co artigo 41 do Regulamento de Estudos de Doutoramento, declara tamén que a presente tese de doutoramento é idónea para ser defendida en base á modalidade de COMPENDIO DE PUBLICACIÓNS, nos que a participación do/a doutorando/a foi decisiva para a súa elaboración.

A utilización destes artigos nesta memoria, está en coñecemento dos coautores, tanto doutores como non doutores. Ademais, estes últimos teñen coñecemento de que ningún dos traballos aquí reunidos poderá ser presentado en ningunha outra tese de doutoramento.

Santiago de Compostela, 08 de Outubro de 2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer al Doctor Víctor M. Arce Vázquez, director y tutor de esta tesis, su estímulo constante desde el momento en que le propuse la realización de la misma. Su disponibilidad, su interés en el tema y sus conocimientos y propuestas, así como su rigor, han guiado este trabajo hasta el final.

A mi anterior tutor, el Doctor Manuel Martínez Pérez, agradezco su estímulo positivo para, no sólo la realización de este trabajo, sino para seguir avivando el interés científico más allá de la cirugía en sí misma. Su deseo de profundizar en la medicina vascular como complemento perfecto para el cirujano vascular ha guiado siempre mis pasos.

A mi gran mentor y amigo, el Doctor Jesús Devesa Múgica, con quien comencé este camino. Su gran conocimiento sobre el mundo de la GH y su enorme experiencia han sido siempre de vital importancia. Con él empezó todo y es, en parte, responsable de los cientos de horas de trabajo y estudio sobre las acciones de la GH a nivel cardiovascular. Su curiosidad para explorar campos desconocidos de la GH, incluso para él, nos ha conducido a un profundo conocimiento del tema que aquí se aborda.

A todas las personas que han colaborado en cada uno de los trabajos aquí presentados, especialmente a Santiago Pérez Cachafeiro, Pablo Devesa Peleteiro, Clara Álvarez Villamarín, Shiara Pérez, y Oscar Díaz, que con su buen hacer me han posibilitado dar realidad y credibilidad a los resultados aquí presentados. A todos los coautores por su apoyo y esfuerzo.

Gracias a toda mi familia, especialmente a mi mujer e hija. Su comprensión durante los momentos más intensos de este trabajo, y su desgaste para facilitarme el tiempo necesario para llevarlo a cabo, junto con su estímulo constante, han resultado imprescindibles en esta tarea.

Los trabajos que componen esta tesis han sido posibles gracias a la financiación aportada por dos becas. Por un lado, una beca FIS del Instituto de Salud Carlos III en colaboración con fondos FEDER (beca PI 13-00790), gracias a la cual se financió el ensayo clínico fase III que aquí presentamos; por otro lado, una beca investigación aportada por la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular (SEACV), que ha financiado la parte de los estudios experimentales.

Por último, agradecer a la Sociedad Gallega de Angiología y Cirugía Vascular (SGACV) los premios recibidos al mejor artículo escrito por un miembro de dicha sociedad durante los años 2017 y 2018, los cuales también han posibilitado continuar dicha labor de publicación.



A mis padres, Diego y Carmen
A mi esposa Mirian y a mi hija Jara

ÍNDICE

Abreviaturas	8
Introducción	11
1 Retrato anátomo-funcional de los vasos sanguíneos	12
1.1 Las arterias no son simples tubos de conducción	12
1.1.1 Capa íntima	12
1.1.2 Capa Media	14
1.1.3 Capa Adventicia	15
1.2 La función hace al vaso	16
1.2.1 Células endoteliales y regulación de flujo	16
1.2.1.1 Regulación mediante vasodilatación: Óxido Nítrico	16
1.2.1.2 Regulación mediante vasoconstricción: endotelinas	18
1.2.1.3 Heterogeneidad de células endoteliales	19
1.2.2 Sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS/NOS3)	20
1.2.1.1 Caveolas y eNOS	21
1.3 El tridente de la Neovascularización: Angiogénesis, Arteriogénesis y Vasculogénesis	23
1.3.1 Anclajes célula endotelial-Membrana Extracelular	24
1.3.2 Contactos célula endotelial-célula endotelial	25
1.3.3 Papel de la esfingosina-1-fosfato (S1P)	25
1.4 El incomprendido balance redox en la homeostasis y en la enfermedad vascular	25
1.5 Neovascularización en un territorio hostil: la Enfermedad Arterial Periférica (EAP)	30
1.5.1 Mecanismos básicos de la angiogénesis: Sprouting, Intususpección y señalización Notch	30
1.5.1.1 Sprouting angiogenesis o angiogénesis por brote	32
1.5.1.2 Angiogénesis intususceptiva	33
1.5.1.3 Luminogénesis	34
1.5.1.4 Regulación de la angiogénesis: vía de señalización Notch	35
1.5.2 Mecanismos básicos de la Arteriogénesis	36
1.5.3 Vasculogénesis: el desarrollo embriológico debería servirnos de inspiración	38
1.5.4 Implicaciones para la fisiopatología y tratamiento de la isquemia de extremidades inferiores	42
2 GH y sistema cardiovascular	43
2.1 Las hormonas también cuentan en el sistema vascular. Hormonas proangiogénicas	43
2.2 Regulación dinámica hormonal de la angiogénesis fisiológica	44
2.3 La GH podría y debería jugar un papel crucial en la vasculogénesis	46
2.4 Instantánea físico-química de la GH	48

2.4.1 Biosíntesis de la GH	48
2.4.2 Secreción y tipos	49
2.4.2.1 Patrones de secreción de la GH	50
2.4.3 El bueno, el feo y el malo: el receptor de GH (GHR)	52
2.4.4 Secretagogos y otros factores que influyen en la secrección de GH	54
2.4.5 Administración de GH y sus efectos secundarios	55
3 Conclusiones sobre Neovascularización y GH	56
4 El déficit de GH del adulto nos puso en la pista	56
5 Desandar el camino para encontrar la solución: justificación de estudios con GH en isquemia de miembros inferiores	58
Objetivos	60
Metodología y aspectos éticos	62
Artículos del compendio	69
Estudio 1. Beneficios moleculares de la GH aplicada a pacientes con Isquemia Crítica de Miembros Inferiores: balance redox (NOX4), angiogénesis (VEGFR2/KDR/Flk-1) e inflamación (TNF- α)	70
Estudio 2. Efecto de la GH sobre la perfusión de flujo medido por fotopleetismografía (PPG) en un modelo murino de isquemia de miembros inferiores. Análisis de distintos modelos de isquemia periférica animal	96
Estudio 3. Revisión sistemática sobre las acciones de la GH en el sistema cardiovascular. Datos moleculares preliminares del estudio GHAS	103
Estudio 4. Revisión sobre el beneficio de la GH en la Enfermedad Arterial Periférica (EAP) para la cicatrización de heridas y la arteriogénesis	111
Discusión General	122
Conclusiones	132
Bibliografía	134
Anexos: Artículos, Material suplementario y Justificantes	172

ABREVIATURAS

- **ARNe**, ARN extracelular
- **Ang II**, Angiotensina II
- **Apo**, Apolipoproteína
- **Ang-1/Ang-2**, Angiopoyetinas 1 y 2
- **Akt**, Proteína quinasa tipo B
- **BMMNCs**, Células mononucleares de la médula ósea
- **Bcl-2**, Proteína 2 derivada del protooncogén del linfoma de células B
- **CEs**, Células endoteliales
- **CMLs**, Células de músculo liso vascular
- **CD31 (PECAM-1)**, Moléculas de adhesión endotelio-plaqueta
- **CAMs**, Moléculas de adhesión celular
- **CuZnSOD**, Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc
- **eNOS (NOS3)**, Sintasa de óxido nítrico endotelial
- **EDHF**, Factor de hiperpolarización derivado del endotelio
- **ET-1**, Endotelina 1
- **EGF**, Factor de crecimiento epidérmico
- **ECA**, Enzima convertidora de angiotensina
- **Era (NR3A1)**, Receptor para estrógenos α
- **EDG**, Superfamilia de receptores acoplados a la Proteína G
- **ERK**, Quinasa regulada por señal extracelular
- **EPCs**, Células progenitoras endoteliales
- **EAP**, Enfermedad arterial periférica
- **EPO**, Eritropoyetina
- **EGR-1 (ZNF268 o NGFI-A)**, Proteína de respuesta de crecimiento temprano 1
- **FGF-2 (bFGF)**, Factor fibroblástico tipo 2 o básico
- **FSS**, Fluid shear stress
- **GH**, Hormona de crecimiento
- **GHR**, Receptor para hormona de crecimiento
- **GHAS**, Growth Hormone Angiogenic Study
- **GHD**, Deficiente producción de GH
- **GM-CSF**, Factor estimulante de colonias granulocíticas-monocíticas
- **GHRH**, Hormona liberadora de la hormona de crecimiento
- **GDF-15**, Factor de diferenciación del crecimiento 15
- **GHBP**, Proteína transportadora de la hormona de crecimiento
- **hGH-V**, Variante de la hormona de crecimiento humana
- **HUVECs**, Células endoteliales procedentes de vena umbilical humana
- **HIF-1 α** , Factor inducido por hipoxia 1 α
- **HDL**, Lipoproteínas de alta intensidad
- **IGF-I**, Factor de crecimiento parecido a insulina 1
- **iNOS**, Sintasa de NO inducible
- **ICAM-1**, Molécula de adhesión intercelular 1
- **IGFBP3**, Proteína transportadora del IGF-I
- **ITB**, Índice tobillo-brazo
- **IL**, Interleuquina

- **JAG-1**, Ligando Jagged 1 de la vía de señalización Notch
- **JAK**, Quinasa Janus
- **KDa**, Kilodaltons
- **KKS**, Sistema caliceína-quinina
- **LDL**, Lipoproteínas de baja densidad
- **LPO**, Lipopolisacárido
- **MB**, Membrana basal
- **MEC**, Matriz extracelular (MEC)
- **MMP**, Metaloproteinasas de la matriz
- **MnSOD**, Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
- **MAPK**, Proteína quinasa activada por mitógeno
- **MCP-1**, Proteína quimiotáctica de los monocitos 1
- **MSCs**, Células madre mesenquimales
- **MDK**, Proteína midkine
- **NO**, Óxido nítrico
- **NADPH ox (NOX)**, Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
- **Nrf2**, Factor eritoides nuclear
- **NOS**, Sintasa de óxido nítrico
- **NF-κB**, Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
- **Notch-DLL4**, Señalización celular asociada a muesca y a ligando Delta-like 4
- **oxLDL**, Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
- **O₂⁻**, Ión superóxido
- **PG**, Proteoglicanos
- **PGI₂**, Prostaciclina o Prostaglandina I₂
- **PDGF**, Factor de crecimiento derivado de plaquetas
- **PKC**, Proteína quinasa C
- **PI3-K**, Fosfatidil-inositol 3-quinasa
- **PRL**, Prolactina
- **PL**, Lactógeno Placentario
- **PCR**, Proteína C reactiva
- **PET-FDG**, Tomografía por emisión de positrones con Fluordesoxiglucosa
- **PPG**, Fotopletismografía
- **ROS**, Especies reactivas de oxígeno
- **RNS**, Especies Reactivas de nitrógeno
- **RAS**, Sistema Renina-Angiotensina
- **rhGH**, GH humana recombinante
- **R-Ras**, Señalización intracelular
- **SSF**, Shear stress forces
- **SR**, Receptor scavenger
- **SS**, Estrés de cizallamiento o Shear stress
- **SDF-1 (CXCL12)**, Factor derivado de la célula estromal 1
- **siARN**, ARN interferente de pequeño tamaño
- **TGF-β**, Factor de crecimiento transformante β
- **TNF-α**, Factor de necrosis tumoral alpha
- **SRIF**, Somatostatina o factor inhibidor de la liberación de somatotropina

- **STAT5**, Transductor de señales y activador transcripcional
- **SOCS**, Supresores inducibles de señales de citoquinas
- **SPECT-MIBI**, Tomografía computarizada por emisión de fotones simples con metoxi-isobutil-isonitrilo
- **SP**, Sustancia P
- **SPECT-TTF**, Tomografía computarizada por emisión de fotones simples con Tetrofosmin
- **VCAM-1**, Molécula de adhesión celular vascular 1
- **VEGF (VEGF-A)**, Factor de crecimiento vascular-endotelial
- **VEGF-R2 (KDR/Flk-1)**, Receptor 2 del VEGF-A
- **VEGF-R1 (Flt-1)**, Receptor 1 del VEGF-A
- **VE-cadherina**, Cadherina endotelial vascular
- **VES (Egfl7)**, Estatina vascular endotelial
- **XO**, Xantina oxidasa





INTRODUCCIÓN

1. RETRATO ANÁTOMO-FUNCIONAL DE LOS VASOS SANGUÍNEOS

1.1 LAS ARTERIAS NO SON SIMPLES TUBOS DE CONDUCCIÓN

Los cirujanos vasculares deben enfrentarse diariamente a un gran abanico de lesiones arteriales de diversa localización que tienen un nexo común en la mayoría de los casos: su origen aterosclerótico. La aterosclerosis tiene lugar dentro de la pared arterial y está relacionada con un proceso inflamatorio progresivo que conviene conocer perfectamente. Para ello, es necesaria una adecuada descripción de la estructura y función de una arteria periférica normal. Los detalles histológicos y fisiológicos de las arterias pueden ser consultados en multitud de libros y publicaciones. Nuestro objetivo aquí es señalar los elementos más relevantes que nos permitan entender las investigaciones que más adelante se expondrán.

Las arterias están formadas por tres capas con identidad morfológica y funcional: íntima, media y adventicia.

1.1.1 Capa Íntima.- Es un conjunto de estructuras entre las que se encuentran: el endotelio, la membrana basal, el espacio subendotelial y la lámina elástica interna (1).

El endotelio vascular es la estructura más interna que recubre las paredes interiores de las arterias, capilares y venas. Las células endoteliales (CEs) se anclan en una lámina basal de 80 nm de espesor o membrana basal (MB), compuesta de microfibrillas de colágeno tipo IV y glucoproteínas. La lámina elástica interna, por su parte, está compuesta por una capa fenestrada de tejido elástico. Entre ambas, quedaría el espacio subendotelial (1,2).

Desde su primera descripción en 1865 hasta principios de los 70, el endotelio fue considerado como una mera barrera que separaba las células sanguíneas del tejido circundante. Hoy sabemos que no es así.

Las CEs se encuentran yuxtapuestas, formando una superficie en mosaico, de tal forma que su eje mayor está orientado en el sentido del flujo sanguíneo. Esta orientación la determina la acción de las fuerzas de cizallamiento o shear stress forces (SSF), fuerza ejercida por la sangre contra la superficie de la pared vascular. Dicha superficie está recubierta por una fina capa de glucosaminoglicanos, con carga negativa, que forman el glicocáliz, cuyo papel fundamental es proteger de la trombogénesis. La composición y espesor del glicocáliz fluctúan con los cambios en las SSF (3). Existen otros factores que regulan la expresión de dicha estructura, como el pH local. Los glucosaminoglicanos más frecuentes son el heparán sulfato (50-90%), el ácido hialurónico y el condroitín-, dermatán- y keratán sulfatos (4). La carga negativa del glicocáliz repele moléculas cargadas negativamente, así como leucocitos, hematíes y plaquetas (5). A través del dominio intracelular de sus proteínas puede actuar también como un mecanotransductor, permitiendo a la CE recibir las señales de estrés mecánico (6,7).

Las CEs son capaces de modificar su dimensión mediante mecanismos de contracción o relajación. Determinadas sustancias químicas (catecolaminas, histamina, serotonina, angiotensina II (Ang II), potasio) pueden estimular estos estados físicos, aumentando o disminuyendo los espacios intercelulares y modificando de este modo la permeabilidad endotelial, que va a variar en función de la localización del endotelio (8,9).

El endotelio no es sólo una mera barrera entre la sangre y tejidos, sino que es un verdadero órgano con función autocrina, paracrina y endocrina, aunque también puede

reaccionar a señales de diversa naturaleza, como fuerzas físicas, sustancias químicas o mediadores inmunológicos. Para que estas señales sean eficaces, deben ser reconocidas por receptores específicos endoteliales, traducidas en mensajeros intracelulares y transmitidas en forma de mediadores que, una vez liberados, pueden tener acción local o a distancia. Así, por ejemplo, la CE es capaz de producir sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras o relajantes que, junto con la influencia de los estímulos nerviosos simpáticos, coordinan un sistema equilibrado de control del tono vascular.

Las CEs poseen, además, una capacidad de regeneración que permite una renovación completa del endotelio cada 2-3 años, a través de un mecanismo de descamación no denudante (10,11). Este ritmo de regeneración puede ser acelerado en zonas de gran tensión hemodinámica, donde se producen SSF elevadas.

Son tantas y tan diversas las funciones del endotelio vascular que es considerado una importante glándula de secreción interna del organismo. Entre estas funciones destaca la producción de la propia matriz extracelular, o de factores antitrombóticos y procoagulantes estableciendo un equilibrio entre ambos, mediadores inflamatorios, factores vasomotores y factores de crecimiento, destacando la producción de óxido nítrico (NO), del factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF), o de la propia hormona de crecimiento (GH) así como de su mediador, el factor de crecimiento parecido a insulina o IGF-I (1,12). Como veremos, el hecho de que el endotelio tenga receptores para GH y la produzca con acción auto y paracrina va a tener una gran trascendencia para apoyar los estudios que presentamos en este trabajo. Todos los factores producidos por el endotelio van a trabajar en equilibrio para mantener unas determinadas condiciones de estabilidad conocidas como homeostasis vascular. La disfunción endotelial, que representa la pérdida de la homeostasis vascular, es, por otro lado, la manifestación más temprana del daño vascular y la base de enfermedades como la aterosclerosis (13).

El endotelio es responsable de regular el crecimiento del tejido conjuntivo de alrededor. En su estado basal no activado, previene la proliferación del músculo liso por la secreción, entre otros, de NO o del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), así como por la expresión en su superficie de moléculas afines al heparán. Sin embargo, tras la activación del endotelio, bien por tóxicos o bien por microambientes que favorecen un desbalance del estado de reducción-oxidación o redox, se produce la liberación de factores que ocasionarán la alteración de la pared vascular por proliferación incontrolada del músculo liso o el desarrollo de la placa de ateroma. Entre estos factores con carácter mitogénico se encuentran: el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el IGF-I y el factor fibroblástico básico (bFGF o FGF-2) (14). Lógicamente, esto no quiere decir que estos factores sean negativos para el vaso siempre, ya que constantemente se están produciendo factores de acción antagónica para mantener el equilibrio.

Por último, el espacio subendotelial es particularmente relevante ya que representa el lugar donde las partículas aterogénicas son retenidas y donde se produce la reacción inflamatoria que lleva a la formación de placa de ateroma (15). Su mayor componente son los proteoglicanos (PG) que forman una matriz extracelular (MEC) en forma de red tridimensional de gran importancia para la migración celular dentro de la pared arterial. Además, algunos de estos PG interactúan con la apolipoproteína B-100 que se asocia a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que forman gran parte de la placa aterosclerótica (16).

1.1.2 Capa media.- Compreendida entre las láminas elásticas interna y externa, contiene células de músculo liso (CMLs) y varios componentes extracelulares: fibras de elastina y colágeno principalmente (1,17). Las fibras de elastina componen la lámina elástica externa, la cual tiene una disposición helicoidal.

Hay que señalar que las CMLs derivan de distintos orígenes embriológicos, de tal forma que aquellas que pertenecen a las arterias de la cabeza y cuello y parte de la aorta torácica derivan de la cresta neural, mientras que aquellas pertenecientes al resto de arterias parecen derivar del mesodermo local, reclutadas por los angioblastos. Estas dos líneas de CMLs tienen diferencias en cuanto a su citoesqueleto (18).

Desde un punto de vista estructural, las CMLs más externas adoptan una configuración cilíndrica o fusiforme, estando orientadas oblicuamente en relación con el eje del vaso. Por otro lado, las más cercanas a la luz del vaso adoptan una configuración longitudinal.

Existen dos fenotipos básicos de CMLs, uno contráctil y otro secretor, siendo el primero el que predomina en condiciones normales. El estado de contracción/relajación depende de diversas sustancias químicas. Mientras que en la infancia existen muy pocas CMLs, con la edad su concentración aumenta, especialmente en las áreas propicias a la aterosclerosis (19). Las CMLs de tipo secretor se diferencian de las anteriores porque están más cerca de la íntima, tienen un índice alto de proliferación y muestran una gran capacidad secretora de matriz, proteasas y citoquinas inflamatorias (20,21). Cualquiera de los dos fenotipos puede transformarse en el otro ante determinadas circunstancias (22).

Que existen diversos tipos de CMLs es un hecho que conocemos de estudios experimentales, aunque luego en humanos no esté tan claro. Por ejemplo, pueden tener distintos receptores adrenérgicos alfa o beta, lo cual determina distintas respuestas a la adrenalina. Así es, las CMLs coronarias y esplánicas muestran diferentes respuestas a la estimulación con adrenalina (17).

Se ha propuesto un fenotipo más de CMLs vasculares que aparece sobre todo ante un daño vascular como una angioplastia. Es el llamado pup-intimal (PI) o fenotipo de células cachorro, capaz de crecer en agar. Este fenotipo expresa mayor cantidad de ARNm de PDGF- β que de PDGF- α , que es lo contrario de lo habitual, donde hay abundante PDGF- α y de su receptor y poco o nada de PDGF- β (23). Este fenotipo parece existir como un residuo de la época fetal y parece activarse exclusivamente ante daños al vaso para formar neointima. Estas células han sido identificadas en cultivos, pero no *in situ* en la pared arterial. El cultivo de neointima humana no produce consistentemente este fenotipo de CML, por lo que sólo parece estar presente en el momento del daño (17).

Las CMLs contribuyen definitivamente al engrosamiento de la pared arterial ante distintos estímulos, entre ellos las sustancias aterogénicas y estímulos físicos como la presión arterial. Tras el daño endotelial, se produciría una alteración de las CMLs de tal forma que predominaría el fenotipo secretor, con un aumento de la producción de diversos factores de crecimiento y citoquinas, siendo parte de la base de la aterosclerosis y de la hiperplasia neointimal que se produce tras una cirugía de by-pass o angioplastia arterial.

También se ha identificado lo que parece un fenotipo anormal de CML caracterizada por su resistencia relativa al crecimiento inducido por heparina. Este fenotipo parece estar muy relacionado con la restenosis que aparece tras el uso de injertos de vena humana para by-pass. Dicho tipo de CML tiene una morfología diferente a las CMLs PI (24).

Sin embargo, todos estos tipos de CMLs han sido descritos en su mayoría en cultivos celulares tras un daño vascular, no apreciándose tan bien cuando se trata de cultivos de vasos intactos.

La función primaria de las CMLs es la estructural y contráctil, siendo esenciales en la regulación de tono vascular. Parece existir una tendencia a la vasoconstricción por defecto en los vasos, lo que implica la producción continua de NO desde el endotelio (17).

Las CMLs ayudan a constituir un reservorio elástico de energía que aparece tras la onda de pulso generada con cada sístole ventricular, y que actúa como bomba para mantener la perfusión durante la diástole a nivel de las arterias elásticas, o facilitando el drenaje venoso en las venas de conductancia.

Aunque los mecanismos de la hipertensión arterial no están completamente aclarados y son complejos, hay de cierto una cosa, que muchos de los pacientes hipertensos desarrollarán hipertrofia del ventrículo izquierdo y un engrosamiento de la pared aórtica que viene motivado, como se verá, por el incremento de CMLs secundario, entre otros, a una secreción de los mitógeno FGF-2 y PDGF, pero también de IGF-I y de los receptores para GH (GHR) (25).

Las CMLs secretoras se replican y secretan matriz semanas o meses después de un daño, sin ser dependiente esto último de FGF-2 o de PDGF (26,27). En este contexto, la migración de estas células hacia la capa íntima dañada ayudará a reponer una neointima junto a las CEs vecinas no dañadas. Para ello, las CMLs tendrán que cruzar la lámina elástica interna. Dichas señales están mediadas por angiotensina II y TGF- β (17).

En este sentido, las CMLs juegan un papel crucial en la restenosis tras la intervención vascular, sea angioplastia y stent o cirugía. Como respuesta al insulto traumático se generará una hiperplasia de dichas células que engrosarán la pared arterial hacia la luz, pudiendo determinar una reducción significativa de la luz del vaso, con alto riesgo de obstrucción del mismo. Histológicamente, esta hiperplasia está formada de CMLs y MEC (17), y parece tener una alta dependencia, como ya se vio en estudios experimentales, del mitógeno IGF-I y del TGF- β (28).

1.1.3 Capa Adventicia. - Es la capa más externa y está formada por múltiples bandas fibrosas de colágeno por las que discurre la vasa vasorum (vasos arteriales y venosos), linfáticos y fibras nerviosas (17). Contiene además fibras elásticas dispersas y fibroblastos. En la actualidad se considera que dichos fibroblastos tienen la capacidad de transformarse en diversos tipos celulares según se precise, y también pueden secretar factores de crecimiento. Esto supone un cambio de concepto, ya que la capa adventicia, a la cual durante mucho tiempo se le otorgó una mera función de soporte y estabilidad del vaso, pasa a tener una participación activa en los procesos de reparación fisiológica. Es de destacar que, a este nivel, además existen otras células muy importantes, como los pericitos, que rodean al vaso y tienen una importante función de estabilidad de los neovasos en los procesos de angiogénesis; o las células residentes, una variedad de células progenitoras mesenquimales de gran importancia en la regeneración de tejidos en el adulto (29). Los pericitos, también pueden diferenciarse en CMLs vascular (30), al igual que los fibroblastos adventiciales (31).

La vasa vasorum tiene su origen en los puntos de salida de las colaterales arteriales, distribuyéndose de dos formas: longitudinalmente, a lo largo de la arteria; y circunferencialmente, estableciendo múltiples anastomosis conformando una verdadera

red (1). De esta manera el sistema arterial imitaría al sistema de irrigación del corazón. De hecho, las arterias coronarias podrían representar la vasa vasorum del músculo cardíaco. Esta red sólo se encuentra en los vasos de un diámetro superior a 200 micras, y penetra hasta la lámina elástica externa. Se encarga de la nutrición de la adventicia y de los dos tercios externos de la media, mientras la nutrición de la capa endotelial y el tercio interno de la media se realiza por difusión de sustancias directamente del torrente sanguíneo. Este mecanismo de difusión es inversamente proporcional al diámetro del vaso y del grosor de la pared arterial (32).

Es curioso el hallazgo que pone en relación la vasa vasorum con la placa de ateroma, ya que, conforme dicha placa crece, también se produce un crecimiento de dicha red, sin estar aclarado si es causa o consecuencia de este proceso (1).

1.2 LA FUNCIÓN HACE AL VASO

1.2.1 Células endoteliales y regulación del flujo

Las CE regulan el flujo vascular y el tono vasomotor basal y, por tanto, la presión arterial, mediante la liberación controlada de vasodilatadores tales como el NO, la prostaciclina o prostaglandina I₂ (PGI₂), y vasoconstrictores como las endotelinas y el factor activador de plaquetas. De ellos, el NO y las endotelinas son los principales reguladores en situación basal (14).

La CE regula el flujo de sangre a los tejidos en coordinación con las CMLs vascular, siendo de extraordinaria importancia el mecanismo de vasorregulación local (33). Esto se ve facilitado por la capacidad de respuesta de la CE a los agentes vasoactivos, y por la participación del endotelio en la transformación y el catabolismo de dichos agentes vasoactivos. Las CE adaptan su metabolismo en función de la tensión de oxígeno de los tejidos, existencia de nutrientes y las necesidades metabólicas del tejido al que irrigan.

En la inflamación, varias funciones del endotelio son fundamentales. Estas funciones incluyen aumento de la permeabilidad, vasodilatación, aumento de la extravasación de leucocitos y alteraciones en el control de la coagulación y la formación de trombos. En reposo, el endotelio intacto es principalmente antitrombótico, sin embargo, con la activación de la CE por estímulos presentes en condiciones patológicas, el endotelio puede volverse protrombótico. Stern y colaboradores, así como otros autores, demostraron la presencia de receptores para factores de coagulación en la superficie del endotelio intacto. En estudios *in vitro* se identificaron varios factores con capacidad de activar la CE, como el factor de necrosis tumoral (TNF) (34), la endotoxina (35), la interleuquina-1 (36) y la trombina (37). En la superficie luminal del endotelio existen numerosos receptores para las sustancias endógenas circulantes, algunos de los cuales están situados en la caveola, una estructura de gran importancia situada en la membrana celular que será analizada más adelante, y ofrecen los medios esenciales para la fijación, la endocitosis y el subsiguiente movimiento a través del endotelio. Estos componentes de superficie desempeñan importantes funciones homeostáticas y regulan la interacción entre los elementos transmitidos por la sangre y el intersticio (2).

1.2.1.1 Regulación mediante vasodilatación: Óxido Nítrico (NO)

El NO es sintetizado en las CE mediante la oxidación de la L-arginina a L-citrulina, sin gasto energético, mediante una familia bien conocida de enzimas: las sintasas de NO (NOS) (38). Aquellas que aparecen a nivel del endotelio son denominadas eNOS o NOS3. Otras isoformas de NOS se han descrito, como la NOS1 o neuronal

(nNOS), que aparece en tejido neuronal y fibras de músculo esquelético tipo II o anaerobias; y la NOS2 o inducible (iNOS), que aparece en el sistema cardiovascular y en el inmune (39). Estas distintas isoformas de NOS están codificadas por distintos genes (40). La NOS3 es la isoforma más importante en cuanto a los estudios que aquí presentaremos. Se trata de una enzima activa constitutivamente, al igual que la neuronal (41), y dependiente del calcio, a diferencia de la iNOS, que debe ser activada por agonistas como la trombina, el ADP, la bradiquinina y la sustancia P, y no depende del calcio (42). La iNOS supone otra fuente de NO no dependiente de eNOS, lo cual ha sido puesto de manifiesto en estudios de arteriogénesis usando roedores knockout (ko) para eNOS (eNOS^{-/-}), ya que permite la generación de NO y la arteriogénesis final, aunque de forma mucho más tardía (43). Por tanto, la iNOS puede compensar, al menos en parte, el déficit de función de eNOS (44). Sin embargo, el NO no es el único vasodilatador producido por el endotelio, ya que existen otras sustancias vasodilatadoras como la prostaciclina, lo cual implica que este proceso pueda seguir realizándose, aunque no hay NO. Desde una perspectiva funcional es importante reconocer que la función de iNOS puede ser sobre todo importante en las situaciones de alto estrés oxidativo, donde el NO procedente de la eNOS es inactivado, tal y como se verá. En este sentido, uno de los principales roles de GH a nivel endotelial, aparentemente no dependiente de IGF-I, es precisamente la acción sobre NO, afectando, por tanto, a la homeostasis vascular (29,45,46). Las SSF también pueden estimular la eNOS activando su gen promotor (47).

El NO, no obstante, tiene un efecto que va más allá de la mera vasodilatación, es decir, tiene una función pleiotrópica en el sistema vascular. Dichas acciones serán objeto de análisis profundo en esta tesis, sobre todo en lo que respecta a su estrecha relación con el balance redox y su papel en la neovascularización. El NO actúa directamente sobre las CMLs. Una vez en ellas, se une a la enzima guanilato ciclasa, incrementando el GMPc, el cual inhibe la entrada de calcio a la célula muscular, y, por tanto, su contracción (48,49).

Pero también, el NO juega un papel crítico en la inhibición de la trombosis impidiendo la adhesión y agregación plaquetaria (50). Este efecto parece también depender del GMPc y de su inhibición de la entrada de calcio, en este caso, en la plaqueta, lo cual previene el cambio conformacional necesario de la glicoproteína IIb/IIIa (50,51). En la plaqueta, el NO afecta a una vía de señalización celular de la que hablaremos mucho, la del fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3-K), que también actúa sobre el cambio conformacional de la glicoproteína mencionada. Ambos mecanismos actuarían de forma conjunta para prevenir la unión final del fibrinógeno a la plaqueta, y, por tanto, la agregación plaquetaria (52).

Además, el NO endotelial inhibe la adhesión de leucocitos a la CE (53,54), o la hiperplasia neointimal que llevan a cabo las CMLs activadas tras un daño de la pared vascular, bloqueando la proliferación y migración de las mismas (55,56).

Sin embargo, como se ha mencionado, el NO no es el único vasodilatador que deriva del endotelio (57), ya que éste también genera PGI₂, un eicosanoide que también relaja las CMLs a través de la activación de la adenilato ciclasa con la subsiguiente generación de AMPc. La PGI₂ es liberada constitucionalmente por la CE (58), y parece estar también involucrada en la regulación del tono vascular en reposo. Esta sustancia es liberada en grandes cantidades en respuesta a determinados ligandos que se unen a la superficie de la CE, como la trombina, el ácido araquidónico, la histamina o la serotonina.

La CE también genera otro vasodilatador, el llamado factor de hiperpolarización derivado del endotelio (EDHF), un factor producido por las epoxigenasas del citocromo P450 CYP (subfamilias CYP2C y CYP2J), que parece ser un metabolito del ácido araquidónico (57,59,60). Los experimentos han demostrado que cuando el NO y la PGI₂ son inhibidas, la vasodilatación aún sigue ocurriendo (61). La contribución del EDHF a la relajación parece ser significativamente mayor en los pequeños vasos de resistencia que en los grandes vasos de conductancia (2). Recientemente, los estudios pudieron demostrar que el EDHF parece convertirse en la vía de vasorelajación dependiente del endotelio predominante en ausencia de eNOS, como se demostró en los ratones eNOS^{-/-} (62).

1.2.1.2 Regulación mediante vasoconstricción: endotelinas

Por otra parte, los factores derivados del endotelio también pueden inducir la vasoconstricción, manteniendo un equilibrio. Los agentes vasoconstrictores incluyen la Ang II, el tromboxano A₂, la endotelina-1 (ET-1), la prostaglandina H₂ (PGH₂), así como las especies reactivas de oxígeno (ROS) (63–65). En 1988, la endotelina fue aislada del sobrenadante del cultivo celular de CEs porcinas (66,67). En el vaso, la pro-endotelina se libera de la superficie de la CE, convirtiéndose en endotelina madura extracelularmente por medio de enzimas convertidoras de endotelina unidas a la membrana citoplasmática. Aparentemente, la endotelina no se almacena en la CE, sino que se sintetiza de novo en respuesta a diversas señales químicas o físicas (67–69).

Las endotelinas (ETs) representan una familia de péptidos de 21 aminoácidos con 3 miembros: ET-1, ET-2, ET-3 (67). Son producidas por diversos tipos celulares y sirven para controlar el tono vasomotor, la proliferación celular y la producción hormonal. Las CEs producen exclusivamente la ET-1, la cual es también sintetizada por las CMLs. La ET-1 es inducida por la hipoxia, la isquemia o las SSF, compensando la acción del NO y contribuyendo a regular el tono vascular. La ET-1 es el vasoconstrictor más potente endógeno, siendo 100 veces más potente que la noradrenalina (70). El 75% de la ET-1 es secretada por el lado luminal de la CE y actúa de forma paracrina vía receptor tipo A en las CMLs. El 90% de la ET-1 circulante es eliminada en el pulmón (71,72).

La producción de ET-1 es también inducida por la Ang II, catecolaminas y trombina, mientras que es bloqueada por la ET-3, PGI₂ y el péptido atrial natriurético, los cuales afectan a la transcripción de la misma (73,74). Diversos factores de crecimiento como IGF-I, FGF-2, TGF- β o el factor de crecimiento epidérmico (EGF) influyen en la síntesis de ET-1, además del HDL y el LDL colesterol. El propio NO regula la síntesis de ET-1 (75,76). (Figura 1)

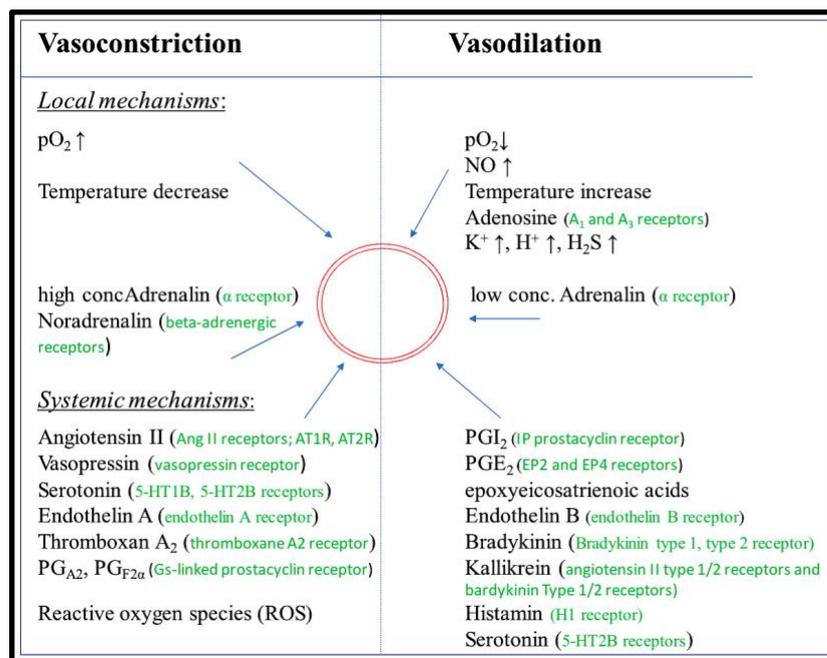


Figura 1. Resumen de factores que regulan el tono vasomotor mediante la inducción de vasodilatación y/o vasoconstricción. El círculo rojo representa un vaso sanguíneo. (Imagen obtenida de Krüger-Genge, Blocki, Franke, Jung. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. Int J Mol Sci. 2019 Sep 7;20(18):4411. Open access)

1.2.1.3 Heterogeneidad de células endoteliales

En general, las CE de diferentes regiones del organismo cumplen demandas similares. Sin embargo, algunas características las diferencian. Aird y colaboradores fueron los primeros en describir la heterogeneidad de las CE (77). La heterogeneidad estructural de la CE incluye variaciones en la morfología celular (tamaño, grosor y posición del núcleo), así como en el perfil de expresión de los genes, la producción de la MEC y, por último, en las propiedades de la superficie celular. Esta última se describe mediante diversas composiciones del glicocálix y las cantidades de caveolas o cuevas de la membrana citoplasmática. Además, también varía la expresión de las distintas uniones intercelulares (tight, adherent and gap junctions, principalmente) (78,79).

La morfología y función de la CE se va a adaptar para satisfacer las necesidades de su entorno local (2,80,81). La respuesta de la CE a los cambios ambientales o a los compuestos químicos puede ser muy llamativa. Por ejemplo, la altura o el grosor de la CE puede aumentar casi un 100 % (82), lo que a veces puede resultar en una posible obstrucción de la propia perfusión capilar.

El endotelio revela diferencias morfológicas regionales en las uniones intercelulares que forman la base de tres categorías distintas de endotelio. En la mayoría de las arterias, venas y capilares del cerebro, los pulmones y el músculo esquelético se encuentra un endotelio continuo, mientras que, en ciertos capilares viscerales, como la glándula suprarrenal, encontramos un endotelio fenestrado. En los sinusoides del hígado, el bazo y la médula ósea se encuentra un endotelio discontinuo (2,83). El endotelio continuo se mantiene perfectamente unido por uniones apretadas (tight junctions), mientras que el endotelio fenestrado presenta poros de 70 nm de ancho, llamados fenestras,

sellados por un diafragma no membranoso de 5 a 6 nm (78). En el caso del endotelio discontinuo, las fenestraciones son de mayor tamaño (100-200 nm) y están desprovistas de diafragma, estando además asociado a una MB mal formada (64,78). Estas uniones también son diferentes entre arterias, arteriolas, capilares y venas, existiendo diferencias en el tamaño y el grosor: las CE de la aorta tienen un grosor de 1 μm , cuando se comparan con las de los capilares (0,1 μm) y las venas (0,1-0,2 μm) (78). Estas diferencias se extienden al contenido de los orgánulos subcelulares (84), o a la densidad de las vesículas plasmalemales, siendo la mayor densidad en los capilares (78). Estas diferencias pueden reflejar distintas características funcionales. Por ejemplo, en estudios comparativos con CE recién aisladas de microvasos, arterias y venas coronarias se observaron diferencias regionales en la capacidad de síntesis de prostaglandinas (85). Johnson y colaboradores (86) encontraron que la CE arterial tenía de tres a cinco veces más actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) que la CE venosa cultivada.

El espesor del glicocálix varía diez veces, desde varios cientos de nanómetros hasta varios micrómetros en toda la vasculatura (3). No sólo se han descrito diferencias en el grosor del glicocálix entre los distintos vasos (87), sino que también se ha descrito cómo dicha estructura puede variar significativamente de tamaño dentro de un mismo vaso (3).

Pero estas diferencias no son siempre tan obvias. Así, sólo se han observado pequeñas variaciones en las actividades de la proteína quinasa de la CE bovina cultivada de la arteria pulmonar en comparación con la de la aorta (88). Snopko y colaboradores señalaron como la CE microvascular, cultivada como monocapas típicas, produce significativamente menos PGI₂ que la arterial o venosa después de la estimulación con suero (89). Además, la respuesta de la CE venosa y aórtica a los agentes químicos también puede diferir (90). La CE venosa secreta grandes cantidades de PGI₂ en reacción a los medios de contraste yodados. La liberación de PGI₂ de las CE arteriales expuestas al iodixanol fue más de 10 veces mayor en comparación con aquellas expuestas a otro contraste como el iomeprol. Una comparación de las CE cultivadas reveló diferencias en la presencia de los receptores de superficie como las integrinas $\alpha 1\beta 1$, específicas de la red microvascular (91).

Sin embargo, la CE en cultivo puede no mostrar las características que se observan *in vivo* (92). Así pues, los resultados de los modelos de CE cultivadas deben considerarse con cierta precaución hasta que se verifiquen *in vivo*. Por ahora, esto es una limitación para los estudios comparativos exhaustivos del endotelio capilar. Existen otras limitaciones cuando se utilizan sustratos artificiales como el vidrio, los polímeros o los metales que son extraños a la CE.

1.2.2 Sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS/NOS3)

Poco después de su aislamiento y caracterización inicial en las células endoteliales, se encontró que la eNOS funcional está principalmente asociada a la membrana plasmática o plasmalema (93). Dado que la actividad de la eNOS está sumamente regulada por múltiples estímulos extracelulares y que el NO producido es una molécula mensajera lábil y citotóxica con una función principalmente paracrina (94,95), tanto la especificidad celular de la expresión de la eNOS, como el sitio intracelular de la síntesis de NO tienen una gran influencia en la actividad biológica de la molécula.

Curiosamente, además de su papel en la pared vascular, hay pruebas de que eNOS es expresada en diversos tipos de células epiteliales incluyendo las vías respiratorias. Este

último NO o NO-derivado del epitelio cumple varias funciones, principalmente relajación de músculo liso bronquial y bacteriostasis, así como modulación de la motilidad ciliar, secreción de mucina o exudado de plasma (96,97).

Debido a la función trascendental del NO para la homeostasis y a su toxicidad potencial, existen múltiples mecanismos que regulan la expresión de eNOS a nivel de la transcripción de su gen, así como mecanismos reguladores de su actividad. Resaltaremos los más importantes, especialmente el papel primordial que juega su localización a nivel de las caveolas para la regulación de dicha actividad. Como iremos viendo, las caveolas tendrán también mucha importancia para el control de la actividad de la GH, ya que una alta proporción de los GHR se van a localizar a este nivel.

1.2.2.1 Caveolas y eNOS

Las caveolas o caveolae son microdominios especializados de la membrana citoplasmática que se estudiaron originalmente en tipos de células nerviosas por su participación en la transcitosis de macromoléculas (98). Las caveolas están enriquecidas en glicoesfingolípidos, colesterol, esfingomiélin y proteínas de membrana ancladas en lípidos. Después se descubrió que las caveolas también contienen una variedad de moléculas de transducción de señales. La lista de moléculas señalizadoras residentes incluye receptores acoplados a proteína G, la propia proteína G, así como moléculas implicadas en la regulación de la homeostasis, como la bomba de calcio asociada a la membrana citoplasmática, y la proteína quinasa C (99).

La localización de eNOS fue evaluada primero en estudios de cultivos de CEs, incluidas las porciones de la membrana citoplasmática con y sin caveolas (100). Dentro de la membrana plasmática, la proteína caveolina fue detectada exclusivamente en las caveolas, encontrándose, también, una alta concentración de eNOS a este nivel. Además, curiosamente, se detectó que la actividad de dicha sintasa era 7 veces mayor en la fracción de la membrana plasmática que en el citosol, y, dentro de la membrana plasmática, su actividad era indetectable en la fracción no caveolada, mientras que era de 9 a 10 veces mayor en las membranas caveoladas, en comparación con toda la membrana plasmática, lo que indica que en la CE la mayoría de la enzima funcional se localiza a este nivel.

Así es, durante su transporte hasta la membrana plasmática, la enzima sufre un proceso de acilación dual que incrementa mucho su actividad. Dicha acilación consiste en una miristoacilación y una palmitoacilación. Así pues, en CEs eNOS myr- o palm-, las cuales son incapaces de realizar ambos procesos de acilación mencionados, el cociente de actividad de la enzima localizada en la membrana plasmática respecto a la localizada en el citosol se reduce a menos de uno, mientras que en la CE wild-type se mantiene elevado. La miristoacilación aumenta por sí sola 10 veces la actividad eNOS, mientras la palmitoacilación, que tiene lugar específicamente en el aparato de Golgi, incrementa en 10 veces más la actividad (101,102), indicando que ambos procesos son necesarios para un mayor rendimiento de esta enzima, aunque también parecen ser requeridos para una función óptima de eNOS en un contexto fisiológico (103,104).

El entorno lipídico que rodea a eNOS en la caveola es otro elemento trascendental para su función. Los estudios han demostrado que las LDL oxidadas (oxLDL) inhiben las respuestas mediadas por el NO (105). De hecho, la exposición al oxLDL provoca un movimiento de traslado de la caveolina y la eNOS hacia otras membranas como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, las mitocondrias y otras organelas intracelulares, disminuyendo así su actividad. La eliminación de las oxLDL y

el tratamiento con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, permite que eNOS y caveolina regresen a las caveolas, aumentando de nuevo su actividad (106). ¿Cómo actúa el oxLDL? Pues parece que causa depleción del colesterol de la caveola, causando una perturbación del microambiente lipídico de la misma que conduce a una redistribución y disminución de la acción de eNOS. Sin embargo, HDL, no parece afectar a este microambiente lipídico (106). Además, la adición de la molécula HDL a un medio que contenía oxLDL evitó el desplazamiento de eNOS y caveolina de la caveola, y también restauró la estimulación de la enzima inducida por la acetilcolina. Otros experimentos demostraron que la capacidad del HDL para mantener la concentración de colesterol asociado a la caveola no eran a través de la inhibición del transporte de colesterol fuera de la misma por el oxLDL, sino como resultado de la donación de ésteres de colesterol por la propia molécula HDL. Así pues, en presencia del oxLDL, el entorno lipídico único dentro de las caveolas es preservado por el HDL, manteniendo así la localización normal y la función de la eNOS, explicando parte de las propiedades antiaterogénicas de esta última molécula. Se realizaron estudios de los efectos directos de las HDL en la función endotelial, y se demostró que las HDL causan una estimulación rápida y drástica de eNOS en las CEs cultivadas, en ausencia de cambios en el colesterol de la membrana. Al parecer, el receptor scavenger-BI (SR-BI) media los efectos del HDL en la eNOS (107), ya que su efecto se pierde en ratones SR-BI $-/-$ (108). El HDL activa dicha sintasa por medio del SR-BI en las caveolas a través de un proceso que requiere la unión de la apolipoproteína (apo) A-I. El aumento resultante en la producción de NO puede ser crítico para las características ateroprotectoras de las partículas HDL y apo A-I (109).

Otros elementos que modulan la actividad de eNOS son las interacciones proteína-proteína, como es el caso de la interacción de dicha enzima con la caveolina, ya que los dominios N- y C-terminal (y en concreto sus aminoácidos 82 a 101) de la mencionada proteína intervienen directamente inhibiendo la actividad catalítica de la enzima (110–113), así como la de otras moléculas de señalización residentes en la caveola, incluyendo la proteína quinasa C (PKC) o la proteína G- α . Esta afirmación viene soportada por el hecho de que la calcio-calmodulina, una proteína que altera la interacción eNOS-caveolina, conduce a una mayor actividad enzimática (112). Otras proteínas que pueden alterar la función de la eNOS son el receptor B2 de la bradiquinina cuando ambos se unen, o moléculas como la histamina, el VEGF o el propio SS, que determinan la unión de la proteína de shock térmico 90 a la eNOS, favoreciendo una activación de la enzima (114).

Además de la modulación por la interacción proteína-proteína, múltiples vías de transducción de señales convergen para regular la eNOS. La activación de la enzima en respuesta a múltiples agonistas hormonales como el estradiol y la bradiquinina, o por el propio VEGF se produce en asociación con elevaciones de las concentraciones de calcio citosólico (115–117). En cambio, la activación de la misma por el SS o por la vasoconstricción se produce independientemente de los cambios en los niveles de calcio intracelular (118,119). También hay pruebas de la función de las MAP (Mitogen-Activated Proteins) quinasas en la modulación de la actividad de las eNOS por el estradiol o bradiquinina (120,121).

Para comprender mejor cómo se estimula la eNOS con el estradiol, se han realizado estudios usando el receptor para estrógenos α ($ER\alpha$), también llamado NR3A1. El estradiol es un importante agonista de la eNOS endotelial en circunstancias tanto

fisiológicas como patológicas, lo que proporciona ateroprotección a las mujeres premenopáusicas (122). El lugar de interacción ER α -eNOS es en la caveola. El uso de quelantes de calcio evitó la actividad de eNOS estimulada por el estradiol, tanto en las membranas plasmáticas aisladas como en las caveolas. Estos hallazgos acumulativos revelan que parte de los ER α están localizados en la caveola acoplados a eNOS, siendo dependientes de calcio (123).

Además de la regulación por el calcio, la fosforilación de aminoácidos de la enzima es otro mecanismo que modifica su actividad, como es el caso de la fosforilación de su aminoácido serina (Ser) en la posición 1177. Entre los factores que activan la eNOS mediante dicha fosforilación, mediada por la vía de la proteína quinasa B o Akt, se encuentran el estradiol (124,125), el SS (126,127), el VEGF (128,129), el IGF-I (128), o la propia GH (130). A diferencia de la activación que se produce con la fosforilación de la Ser-1177, la fosforilación de su aminoácido treonina en la posición 497 (Thr-497) produce una actividad atenuada de la eNOS (131). Hay pruebas de una regulación coordinada de la actividad de eNOS por agonistas como el VEGF, que causan tanto la fosforilación de la Ser-1177 como la desfosforilación de la Thr-497 (132).

Así pues, la actividad de la eNOS está regulada por una compleja combinación de interacciones proteína-proteína y cascadas de transducción de señales que implican eventos de movilización de calcio y fosforilaciones.

1.3. El tridente de la Neovascularización: Angiogénesis, Arteriogénesis y Vasculogénesis

Para comprender bien el contexto en el que se desarrolla este trabajo, además del recuerdo de la histología funcional del vaso sanguíneo anteriormente expuesta, es conveniente definir cuáles son los mecanismos de regeneración vascular que se activan ante el insulto secundario al proceso de isquemia-hipoxemia, que puede poner en riesgo la viabilidad de un determinado órgano. Aunque existen similitudes en cuanto a dichos procesos entre los distintos órganos, también hay diferencias. En este trabajo nos centraremos en describir los procesos de regeneración del sistema vascular como respuesta a la isquemia de los miembros inferiores. Sin embargo, dichos procesos regenerativos no son exclusivos de la isquemia. Como concepto general, cualquier órgano que crece o debe regenerarse necesita un elemento trascendental: que se asegure un correcto aporte sanguíneo y, por tanto, una buena red de vasos que lo hagan posible. Dentro de los procesos de creación/potenciación de vasos sanguíneos encontramos tres: angiogénesis, arteriogénesis y vasculogénesis, englobados bajo el término neovascularización.

Se conoce con el nombre de angiogénesis al desarrollo de nuevos capilares a partir de capilares preexistentes, en contraposición con la vasculogénesis, que es la formación “de novo” de capilares y vasos sanguíneos que tiene lugar durante la embriogénesis y que da lugar a la formación del plexo vascular primitivo; o la arteriogénesis, que supone el desarrollo de la red colateral preexistente o red de compensación fisiológica del individuo. A esta última también se la conoce con el nombre de angiogénesis terapéutica, ya que es la que mayor cantidad de flujo consigue llevar a las partes deficitarias, y la que conviene promocionar más en los estudios con agentes terapéuticos para la isquemia periférica (133). Aunque, característicamente, angiogénesis y arteriogénesis son procesos propios de la etapa posnatal y la vasculogénesis de la embrionaria, ésta última ha sido también demostrada en adultos y la primera en el embrión (134).

En el adulto sano, la angiogénesis normalmente sólo tiene lugar de forma fisiológica en algunas fases del ciclo reproductor femenino o como mecanismo favorecedor de la cicatrización de heridas/repación tisular. Se ha atribuido a la angiogénesis el carácter de un proceso clave en situaciones patológicas como la fase proliferativa de la retinopatía diabética, la neovascularización de los tumores y en enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide. Desde la década de los 90 se ha generado un interés considerable por la angiogénesis como estrategia terapéutica, y de ahí que numerosas investigaciones se hayan centrado en los mecanismos subyacentes a su regulación.

La evidencia reciente sugiere que las CEs que llevarán a cabo el proceso angiogénico no sólo proceden de las CEs contiguas, sino que también pueden derivar de precursoras originarias de la médula ósea. Estas células precursoras se identifican por la expresión de antígenos de superficie característicos y pueden ser detectadas en sangre periférica en pequeño número (135). En modelos animales de isquemia de extremidades se ha visto que, dichas precursoras, una vez llegan a los lugares donde se produce angiogénesis, participan activamente en dicho proceso (136,137).

La angiogénesis implica siempre una serie de fases básicas, destacando la proliferación de las CEs, la degradación de barreras como láminas elásticas y MEC por proteasas liberadas desde las propias CEs, y la migración de dichas células al espacio perivascular. Tras ellas le sigue la tubulogénesis o agrupación de las CEs migradas en forma de túbulos, que darán lugar a capilares funcionales una vez son estabilizados por células anexas o pericitos. Éstos últimos representarían los “tirantes de un puente”, que ayudan a mantener la estructura junto con la nueva MEC (14). La supervivencia y migración de las CEs depende de su contacto con células semejantes (contacto célula-célula), así como de los anclajes célula-MEC.

1.3.1 Anclajes CE-MEC

Los anclajes entre CEs y MEC que las rodea son mediados por el grupo de proteínas integrinas. Estas proteínas proporcionan señales de adhesión y de señalización entre ambas estructuras, y esta interacción resulta crucial para mantener la polaridad de las CEs y su alineación a lo largo de la vasculatura. Las integrinas son proteínas heterodiméricas que comprenden dos subunidades: α y β , unidas de forma no covalente.

La migración de las CEs a través de la MEC se facilita por la degradación de la misma por las metaloproteinasas de la matriz (MMP). Las integrinas desempeñan una función clave en la regulación de la actividad de las MMP. Las moléculas más importantes implicadas son: integrina $\alpha v \beta 3$, y la MMP-2. Esta interacción es crucial en la migración de las CEs, y, de hecho, se ha observado que la inhibición de la unión MMP- $\alpha v \beta 3$ suprime la angiogénesis (138). Existe, además, un alto nivel de expresión de esta integrina en los vasos en crecimiento, otorgándosele por ello un papel fundamental en la angiogénesis. Su papel, por tanto, sería el de inducir la motilidad de las CEs y facilitar la degradación de la MEC simultáneamente para ayudar a las mismas durante su migración. También se ha visto que es capaz de unirse al receptor 2 del VEGF (VEGF-R2 o KDR/Flk-1), potenciando así la acción angiogénica de este último (139). El empleo de un anticuerpo monoclonal contra $\alpha v \beta 3$ (LM609) demostró que la angiogénesis resultaba inhibida, promoviéndose la apoptosis de la CE, lo cual sugiere que, en ausencia de fijación a $\alpha v \beta 3$, se pierden las señales protectoras, pasando a expresarse el gen p53 de la CE. Otra integrina importante en este proceso es la $\alpha 5 \beta 1$.

1.3.2 Contactos CE-CE

Las CEs deben formar contactos célula-célula para tejer redes semejantes a los capilares. Estos contactos son mediados por proteínas de superficie celular o moléculas de adhesión celular (CAMs), resaltando entre ellas la cadherina endotelial vascular (VE-cadherina), moléculas de adhesión endotelio-plaqueta (PECAM-1 o CD31) y selectina E. La PECAM-1 puede unirse a la integrina $\alpha v \beta 3$ (140), y se ha propuesto que actúa como una molécula de acoplamiento que permite que otras proteínas puedan aportar mayor resistencia a las estructuras vasculares (14). La VE-cadherina es expresada de forma abundante a nivel de las uniones intercelulares, y por tanto, debe estar implicada en la angiogénesis (14). La selectina E está implicada en la adhesión de leucocitos al endotelio activado. Aunque no se sabe bien su papel en la angiogénesis, se ha visto que su inhibición mediante anticuerpos anti-selectina E bloquean la tubulogénesis *in vitro* (141). De forma contraria, la adición de dicha proteína de forma exógena estimula la angiogénesis en la córnea de la rata (142).

1.3.3 Papel de la Esfingosina -1- Fosfato (S1P)

Este metabolito activo, generado por la fosforilación de la esfingosina de la membrana celular, está implicado en la proliferación y supervivencia celular, la supresión de la apoptosis, la migración y la angiogénesis. Se trata de un ligando específico de la superfamilia de receptores acoplados a la Proteína G o receptores EDG (143,144), siendo el más importante el EDG-1, implicado tanto en la migración de CEs (145–147) como de CMLs (148,149). La S1P interactúa con el PDGF, facilitando la migración de la CE mediada por el EDG-1 (150,151). La unión S1P-EDG-1 estimula la activación de la vía Rac/Rho, de vital importancia en los procesos de neovascularización (146,152).

1.4 EL INCOMPRENDIDO BALANCE REDOX EN LA HOMEOSTASIS Y EN LA ENFERMEDAD VASCULAR

El crecimiento y remodelado vascular hasta ahora comentados representan un tipo de respuesta de los vasos críticamente importante para todas las especies animales, tanto para el mantenimiento del estado fisiológico, como para luchar contra estados patológicos. En la última década se han logrado importantes avances en el conocimiento sobre la forma en que estos eventos se regulan a nivel celular y molecular mediante la identificación de factores críticos (VEGF, FGF-2, SDF-1 y otras), mediadores de señales (PKC, quinasa PI3, Akt, ERK 1/2 y otras) y diversas respuestas celulares como la activación, proliferación, migración y maduración (153,154). Sin embargo, todas estas vías y mediadores también están muy influidos por el balance de reducción-oxidación o redox, del cual aún no se conoce con exactitud cuál es la función/nes de las especies reactivas químicas generadas, como son las especies reactivas de oxígeno (ROS), o las especies reactivas de nitrógeno (RNS).

Actualmente se sabe que el grado de estrés oxidativo, determinado tanto por la cantidad de ROS/RNS, como por la producción de antioxidantes a nivel celular, va a influir enormemente en el crecimiento vascular de los tejidos. Aunque no se trata de un fenómeno universal, numerosos estudios experimentales indican que pequeñas cantidades de estrés oxidante regulan la respuesta fisiológica de crecimiento vascular, y, por tanto, no siempre sus efectos van a ser deletéreos.

A nivel vascular, una importante fuente de ROS producida en las CEs y CMLs proviene de la función de la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH)

oxidasa (NOX), responsable de la producción del ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) usando el oxígeno y el NADPH como catalizadores (155,156). La familia de la NOX comprende cinco isoformas (NOX1-5). De todas ellas destacaremos la NOX4, isoforma dominante y de especial relevancia, ya que con ella entenderemos parte de los hallazgos del estudio GHAS que aquí presentamos en uno de los artículos.

La NOX4 se encuentra dentro del retículo endoplasmático, en las mitocondrias y en el núcleo de la célula endotelial; sin embargo, sigue habiendo cierta incertidumbre con respecto a la relevancia que juegan estos diversos compartimentos intracelulares para las respuestas celulares. Se cree que esta enzima es la responsable de mantener un nivel de ROS basal (H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$), que favorece una activación continua de la célula (157,158).

Es importante destacar que la expresión y/o actividad de las subunidades NOX 1, 2 y 4 se incrementan en condiciones de enfermedad, como en la diabetes, la aterosclerosis o durante la angiogénesis (159). Así es, la expresión de NOX4 es regulada por SS, hipoxia, isquemia, TNF- α , y TGF- β 1 (160). Además de en la capa endotelial, la actividad enzimática de NOX también ha sido demostrada en las otras capas arteriales, tanto en la capa media como en la adventicia (CMLs, fibroblastos y macrófagos), siendo NOX 2 y 4 las isoformas predominantes, las cuales funcionan de manera similar a las de las CEs.

La actividad de la enzima NOX juega un papel importante en la regulación de los factores de crecimiento angiogénicos como el VEGF (161). El bloqueo de la NOX mediante inhibidores farmacológicos disminuye la formación de ROS, y también reduce la producción de VEGF en condiciones de hipoxia, lo que frena la activación de las vías de señalización Akt y ERK 1/2, y el subsiguiente crecimiento vascular (161,162). La angiopoyetina, con efecto angiogénico demostrado, también estimula la producción de ROS mediada por NOX, y la formación de capilares (163). Por tanto, la modulación de la expresión y la actividad de la enzima NOX cumple funciones críticas en la regulación del crecimiento y la remodelación vascular.

Determinadas cantidades de ROS en las mitocondrias se han asociado con la estimulación proangiogénica. Por ejemplo, se encontró que la inhibición de la producción de ROS por parte del complejo I de la mitocondria (también denominado NADH deshidrogenasa o NADH ubiquinona óxido-reductasa) usando rotenona, inhibe la expresión del VEGF así como el crecimiento y remodelado vasculares inducidos por el mismo, tanto *in vivo* como *in vitro* (162). Tocaría ahora desvelar cómo las mitocondrias y la generación de ROS contribuyen a dicho proceso. Para ello, es interesante analizar la Figura 2.

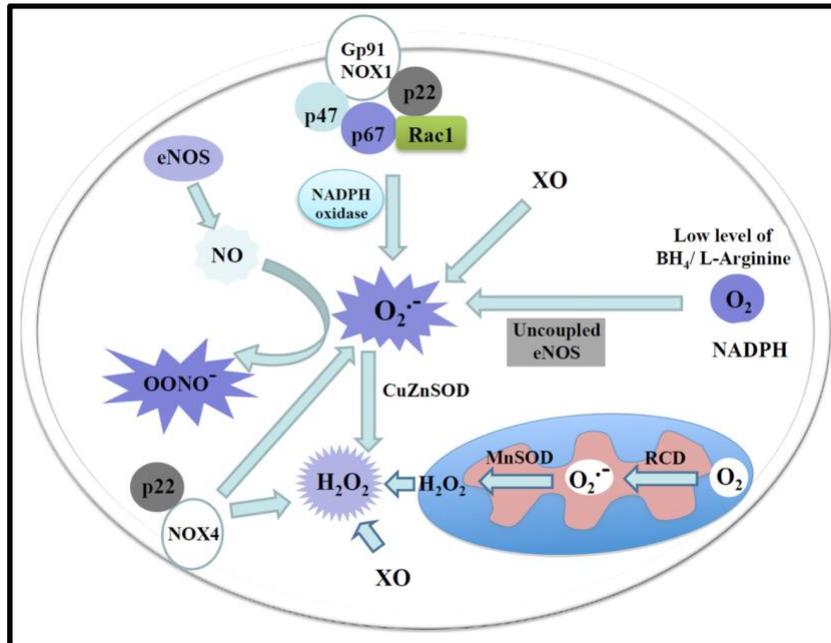


Figura 2. Principales fuentes enzimáticas e intracelulares de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). La NADPH oxidasa (NOX) asociada a la membrana es una fuente importante de ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). La isoforma NOX4 puede producir constitutivamente H_2O_2 . La sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) produce óxido nítrico (NO) que al reaccionar con el $O_2^{\cdot-}$ es inactivado produciendo peroxinitritos ($OONO^{\cdot}$). La xantina oxidasa (XO) produce tanto $O_2^{\cdot-}$ como H_2O_2 . El $O_2^{\cdot-}$ también puede derivar a H_2O_2 con la ayuda del cobre (Cu) y la enzima superóxido dismutasa dependiente de zinc (CuZnSOD) dentro del citosol. Las mitocondrias también producen $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 debido a la disfunción de la cadena respiratoria (RCD), lo cual es mediado por la enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD). (Imagen obtenida con permiso de Bir SC, Kolluru GK, Fang K, Kevil CG. Redox balance dynamically regulates vascular growth and remodeling. *Semin Cell Dev Biol.* 2012 Sep;23(7):745-57)

La cadena respiratoria mitocondrial es una de las mayores fuentes de ROS en la mayoría de las células de los mamíferos (164). El transporte de electrones a través de la membrana interna de la mitocondria es una de las principales fuentes de producción de ROS dentro de esta organela. En esta función intervienen los complejos I a IV de la cadena respiratoria, que van transfiriendo electrones de uno a otro a favor de gradiente. El objetivo final es transformar el dañino oxígeno en agua. En condiciones fisiológicas, alrededor del 1-4% del oxígeno es reducido a $O_2^{\cdot-}$ en las mitocondrias (164). Durante la isquemia tisular o hipoxia celular, el proceso de transporte de electrones se desacoplará, llevando a un aumento del $O_2^{\cdot-}$.

Es bien sabido que las ROS como el $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 son proinflamatorios, incrementando el grosor íntima-media, hecho considerado como un factor de riesgo para la patología vascular. Sin embargo, la producción de ROS regula numerosas cascadas de señalización celular que facilitan la actividad angiogénica, estimulando Akt, ERK, y MAPK, y aumentando eNOS, VEGF y VEGFR2 y HIF-1, entre otros (165–167). (Figura 3)

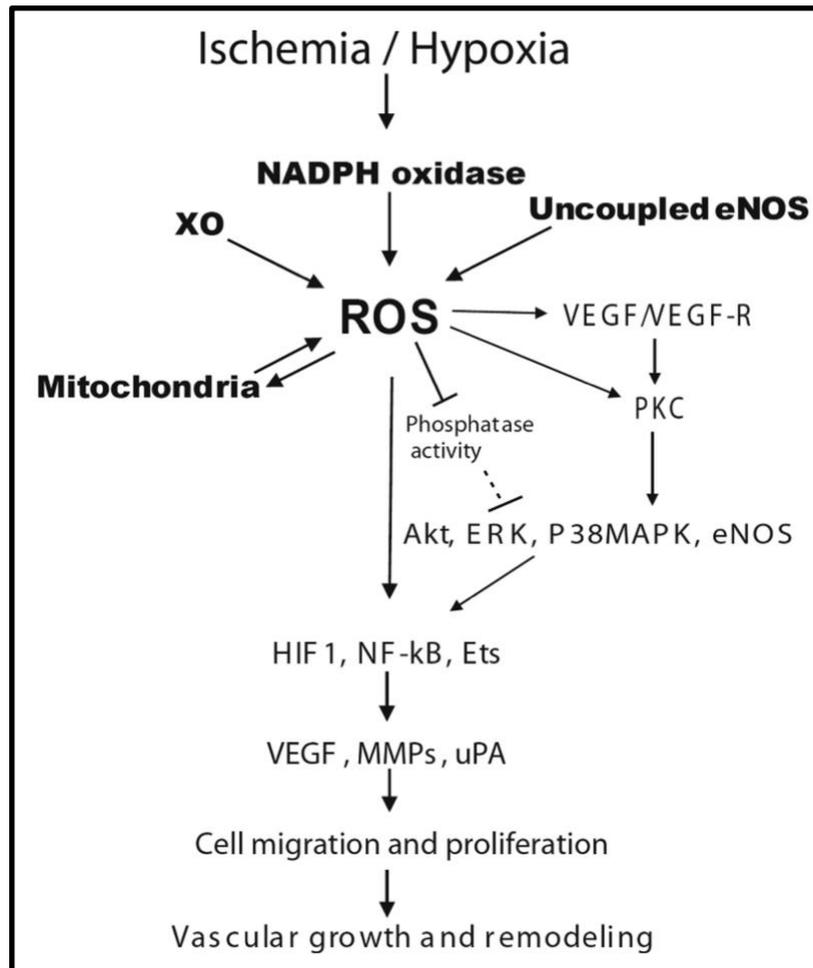


Figura 3. Vías de señalización angiogénica destacadas reguladas por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS procedentes de distintas fuentes (NOX, eNOS, XO y mitocondrias) influyen directamente en numerosas vías de señalización (por ejemplo, PKC, RTK, p38 MAPK y ERK1/2) que implican tanto la inhibición de la actividad reguladora de la fosfatasa, como la activación de la actividad de la proteína-quinasa C (PKC). La señalización posterior dependiente de redox estimula la activación de diversos factores de transcripción, como HIF-1, NF-kB y otros, seguida de una regulación ascendente de las moléculas angiogénicas como el VEGF, con efecto en el remodelado de la pared vascular. (Imagen obtenida con permiso de Bir SC, Kolluru GK, Fang K, Kevil CG. Redox balance dynamically regulates vascular growth and remodeling. *Semin Cell Dev Biol.* 2012 Sep;23(7):745-57)

Contrariamente a la idea de que NOX4 disminuye la actividad angiogénica, Craige y colaboradores han demostrado en ratones con sobreexpresión de NOX4 que la angiogénesis aumenta en condiciones de isquemia (168). Efectivamente, se ha demostrado que la sobreexpresión de NOX4 aumenta significativamente la producción de ROS y el VEGF, acción que se atenuó después de disminuir la enzima mediante el uso de NOX4-siARN (169,170). Además, la producción de H₂O₂ mediada por NOX4 activa ERK1/2 para promover la proliferación de las CE, que también se inhibe tras la disminución de la expresión de la NOX4 mediante el siARN (171). Otros estudios también han demostrado que el tratamiento previo de las células de la médula ósea con H₂O₂ aumentó su tasa de supervivencia, la expresión del VEGF y VEGFR2, y la

diferenciación y función endotelial *in vitro* e *in vivo* (167,172–174). Como era de esperar, el aumento de la neovascularización en respuesta a la isquemia o al VEGF se inhibe en los ratones NOX2 $-/-$, o en los ratones wild-type tratados con el antioxidante ebseleno o con agentes bloqueadores de NOX, como apocinina o gp91ds-tat (175,176), datos consistentes con el hecho de que la expresión de NOX2 se incrementa durante la isquemia experimental en la pata trasera de roedores. El aumento de la expresión de NOX4 endotelial también promueve la angiogénesis y la recuperación del flujo sanguíneo en la pata trasera isquémica del ratón mediante una mayor activación de la eNOS (168). Por último, la deficiencia de factores de respuesta antioxidante influye significativamente en la neovascularización inducida por la isquemia, de manera que los ratones con deficiencia de Nrf2 $-/-$ muestran un aumento del estrés oxidativo durante la isquemia con un sorprendente aumento concomitante de la contribución de las EPCs a la neovascularización (177). Así pues, el aumento de la formación de ROS está claramente implicado en la señalización de respuestas importantes para la angiogénesis isquémica.

Parece difícil entender estas contradicciones sobre el balance redox. Sin embargo, lo que hay que saber es que, mientras pequeñas cantidades de estrés oxidativo, como se ha visto, tienen efectos beneficiosos en la homeostasis vascular, es la producción excesiva o sostenida en el tiempo de ROS, como sucede en la isquemia crónica crítica, la que puede dar lugar a toxicidad celular, ya que se ha implicado en el deterioro de las respuestas de angiogénesis en diferentes modelos como la diabetes y la enfermedad vascular aterosclerótica. Por ejemplo, la deficiencia de NOX2 puede también aumentar la angiogénesis isquémica durante estas patologías (178). Así es, la corrección del deterioro de la respuesta de la angiogénesis se asoció con la reducción de la formación de ROS, la restauración de la activación de la vía de señalización angiogénica del VEGF/NO y la mejora de la función de las EPCs (179). Además se encontró que la cola citoplásmica de la ICAM-1 sirve como un regulador crítico de la actividad endotelial de NOX4 (180).

Por tanto, el estrés oxidativo durante la angiogénesis isquémica puede actuar de manera engañosa al activar o inactivar la señalización angiogénica en los estados de tejido sano o enfermo, o en los estados agudos y crónicos, respectivamente. Esta concepción final es de vital importancia para entender la acción de la GH sobre NOX en el estudio GHAS. (Figura 4)

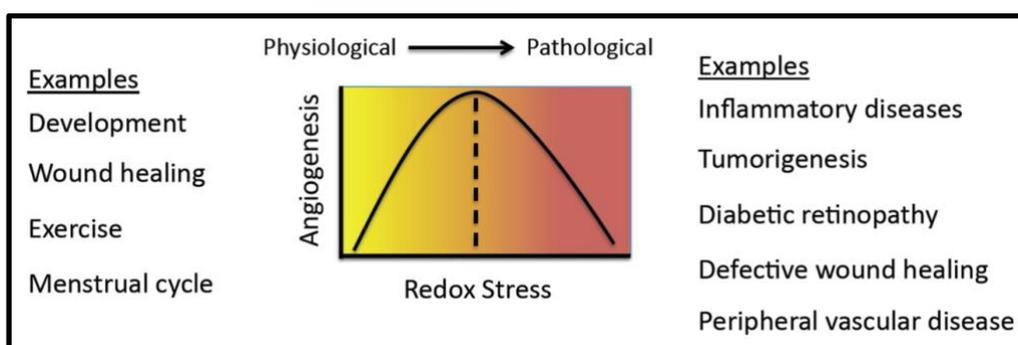


Figura 4. Modulación de las respuestas del crecimiento vascular dependiente de especies reactivas de oxígeno (ROS). En el lado izquierdo de la figura se destacan ejemplos de angiogénesis fisiológica que implican bajos niveles de producción de ROS. En el lado derecho de la figura se enumeran situaciones de angiogénesis patológica, que implican una generación abundante o prolongada de ROS, contribuyendo a varios procesos de enfermedad. (Imagen obtenida con permiso de Bir SC, Kolluru GK, Fang K, Kevil CG. Redox balance dynamically regulates vascular growth and remodeling. *Semin Cell Dev Biol.* 2012 Sep;23(7):745-57)

1.5 NEOVASCULARIZACIÓN EN UN TERRITORIO OSTIL: LA ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA (EAP)

1.5.1 Mecanismos básicos de la angiogénesis

Son numerosos los factores de crecimiento que median el proceso de la neovascularización, muchos de ellos participando tanto en la angiogénesis como en la arteriogénesis. El proceso angiogénico en los miembros inferiores se origina desde capilares preexistentes en la vecindad del tejido sometido a isquemia. El paso inicial es la estimulación de la proliferación de la CE por el VEGF. Esta familia de proteínas es, probablemente, la más importante para la angiogénesis, aunque esto ha sido cuestionado (181). Un ambiente de isquemia en el tejido lo somete a hipoxia, lo cual induce la síntesis de VEGF en distintos tipos celulares. La hipoxia es uno de los inductores más potentes del VEGF. Las bajas concentraciones de oxígeno estimulan la producción genética del factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α), el cual se une al área de respuesta a la hipoxia en el gen VEGF, incrementando su producción. La Hipoxia es un importante estímulo para el crecimiento fisiológico y patológico de los vasos sanguíneos (182). Conecta la suplencia vascular de oxígeno a la demanda metabólica. Las células están normalmente oxigenadas mediante difusión de oxígeno, pero cuando los tejidos crecen más allá de los límites de la difusión de oxígeno, la hipoxia estimula los factores de transcripción, que regulan al alza o a la baja la expresión de factores pro o antiangiogénicos, respectivamente (182).

La transcripción del VEGF también se produce por otros estímulos distintos a la hipoxia, como la hipoglucemia, la acidosis, y por el estímulo de otros factores de crecimiento como el PDGF, el FGF, o la propia GH, como veremos (12,183). El VEGF está constituido por una familia de 6 miembros, siendo el VEGF-A el primer identificado (también llamado simplemente VEGF). Dentro del VEGF-A, existen 5 isoformas con diferente número de aminoácidos. Cada una de estas isoformas parece tener una función distinta dentro del proceso angiogénico. Por ejemplo, mientras que la isoforma 189 estimula exclusivamente la proliferación endotelial, la 165, isoforma predominante, también favorece la coalescencia de las CEs formando vasos (184). Es, precisamente, a esta última isoforma, VEGF-A-165, a la que nos referiremos constantemente.

El siguiente paso en el proceso angiogénico es el aumento de la permeabilidad vascular mediada por el propio VEGF. Esta se debe a alteraciones en la estructura de la membrana celular y la redistribución/expresión de CAMs (PECAM-1 y VE-cadherina). La permeabilidad vascular es controlada por la angiopoyetina 1 (Ang-1). Le sigue una extravasación de proteínas plasmáticas, estimuladas mediante el VEGF, creando un soporte para la migración de las CEs. La degradación de la MEC es mediada por la angiopoyetina 2 (Ang 2) y debida a la liberación de proteasas desde las CEs, incluyendo: activadores del plasminógeno, MMP, heparinasas, quimasas, triptasas y catepsinas. Su función principal es crear espacio para la migración de las propias CEs (184).

Tanto la proliferación como la migración endotelial, importantes efectos del VEGF, son posibles gracias a receptores de superficie para VEGF en dichas CEs. El VEGFR-2 o KDR/Flk-1 o simplemente KDR media la mayoría de los efectos mitogénicos, de supervivencia y permeabilidad del VEGF y es principalmente expresado en la CE, mientras el VEGFR-1 o Flt-1 es expresado por células inflamatorias, y el VEGFR-3 se encuentra en endotelio de vasos linfáticos. Varias isoformas de VEGF, angiopoyetina, e integrinas regulan el diámetro de la luz del vaso que se está formando. El TGF- β y el PDGF estimulan la producción de MEC y el reclutamiento de pericitos para estabilizar la

estructura del nuevo vaso (184). La luminogénesis o regulación del diámetro de la luz del vaso es un elemento clave para que los neocapilares formados cumplan su cometido. No se conoce exactamente cómo se regula, pero parece que el VEGF no es suficiente para conseguir un lumen estable, necesitando de la ayuda de otros factores, estando implicada la vía R-Ras-Akt (185). Como se explicará, la GH es un importante estimulador de la vía luminogénica y, por tanto, podría ayudar para que los neovasos formados sean realmente nutricios o funcionales (12). Una proteína proveniente de la degradación de la MEC, la estatina vascular endotelial (VES), también llamada EGF-like dominio 7 o Eglf7, participa activamente en la formación del lumen, regulando un proceso dinámico durante el cual las conexiones entre células endoteliales y la migración local se controlan de manera coordinada para asegurar el ensamblaje adecuado durante la formación de los neovasos (186). (Figura 5)

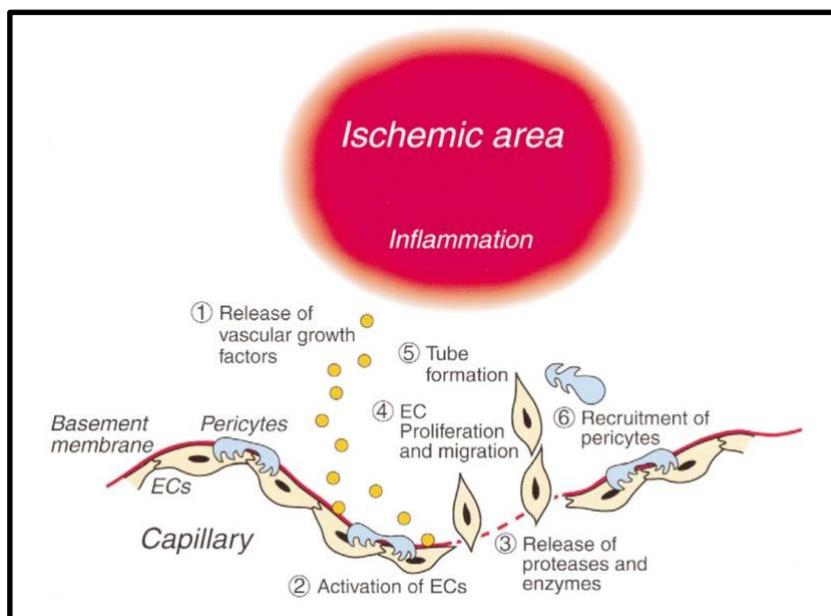


Figura 5. Esquema de las distintas fases que siguen al proceso angiogénico dirigido por las células endoteliales (CEs). (Imagen obtenida con permiso de Wahlberg E. Angiogenesis and arteriogenesis in limb ischemia. J Vasc Surg. 2003 Jul;38(1):198-203)

El HIF-1 y el VEGF, por un lado, y las Ang 1 y 2 y el TGF- β , por otro, son, probablemente, los factores más importantes implicados en la angiogénesis. Sin embargo, la regulación de este proceso es compleja e implica una extensa comunicación entre células, múltiples factores solubles y componentes de la MEC, los cuales han sido el foco de revisiones detalladas (187–190). Analicemos algunas de esas interacciones moleculares de relevancia.

El VEGF debilita las uniones intercelulares causando vasopermeabilidad (191). Las CEs son entonces libres para migrar fuera de la MB a través del espacio perivascular usando proteínas plasmáticas como matriz provisional. Parece que no todas las CEs responden a este estímulo, sino que sólo un tipo de ellas es seleccionado para brotar y responder a las señales proangiogénicas mediante mecanismos que implican los receptores Notch y el ligando delta-like 4 (DLL4) (192). La dirección de migración de

las CE es conducida primariamente mediante el VEGF, las angiopoyetinas y el FGF-2. Otras citoquinas que contribuyen son el PDFG, el EGF, el TGF- β y las denominadas moléculas guía: efrinas, semaforinas y netrinas (187,190).

Las proteasas de la MEC también facilitan el brote de los vasos mediante la liberación de activadores angiogénicos unidos a la propia MEC (FGF-2, VEGF, TGF- β) y activando citoquinas angiogénicas como la interleuquina (IL) 1 β . Tarde o temprano los brotes se unen entre sí y se convierten en estructuras tubulares, primero mediante la fusión intercelular y después mediante la fusión intracelular de grandes vacuolas (193).

La subsecuente liberación de oxígeno por el inicio del flujo sanguíneo disminuye la expresión local de VEGF, reduciendo, por tanto, la proliferación de CE. Las proteasas pueden también modular y finalizar el proceso angiogénico mediante la liberación de factores antiangiogénicos unidos a la MEC, tales como la trombospondina-1, canstatina, arresten, tumstatina y endostatina, así como inhibidores de la formación de vasos no derivados de la MEC, incluyendo: angiostatina, vasoinhibinas, antitrombina III, protrombina kringle-2, plasminógeno kringle-5 y VES (194).

Veremos detenidamente las diferencias existentes entre los dos tipos básicos de angiogénesis, la que cursa en brotes y la intususceptiva, así como la luminogénesis y la regulación angiogénica por la vía de señalización Notch-DLL4.

1.5.1.1 Sprouting angiogenesis o angiogénesis por brote

La angiogénesis por brote requiere la especialización en fenotipos de las CE a lo largo de la línea migratoria, estableciéndose las denominadas Tip cells y Stalk cells (195–200). Las células Tip, que dirigen la migración, forman y extienden filopodios hacia el estímulo, pero lo logran sin apenas proliferación. Las células Stalk, por el contrario, exhiben un fenotipo proliferativo responsable del alargamiento del brote endotelial. Estas células también son responsables de la secreción de la MB del neovaso y de la formación de la hendidura luminal inicial (198,200,201). El cómo una misma CE se convierte en Tip o Stalk, no es bien conocido, pero parece que tiene que ver con la concentración y distribución del KDR, que determina una mayor o menor efecto del VEGF (202). De hecho, mientras el tipo de distribución de este receptor determina la migración de las células Tip, su concentración determina la proliferación de las Stalk (203).

Un tercer tipo de CE, la célula falange o phalanx cell, es una célula que quedaría quiescente tras completar el brote. Estas células ayudan en la formación de la MB y forman uniones celulares de tipo tight a través de una mayor expresión de la VE-cadherina. Son las responsables, en última instancia, del suministro de oxígeno y nutrientes a los tejidos circundantes (201,204). (Figura 6)

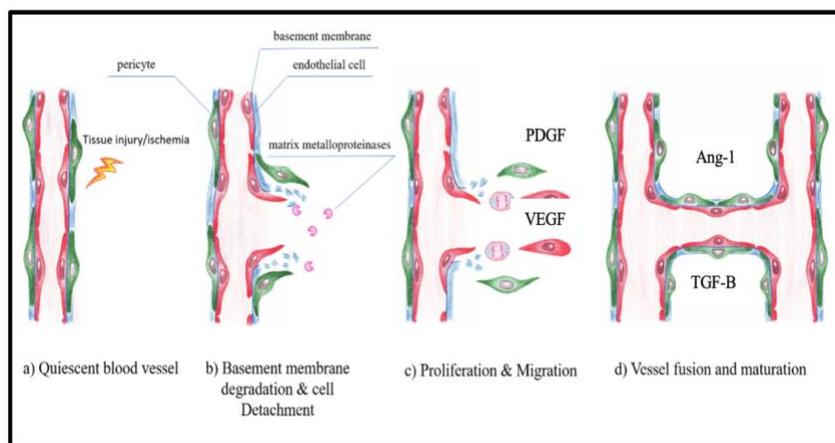


Figura 6. Breve esquema de la angiogénesis por brote. El VEGF inicia el ensamblaje de las CEs, el PDGF recluta pericitos, mientras que la angiopoyetina-1 (Ang-1) y el factor de crecimiento transformante (TGF-β) estabilizan el vaso naciente. (Imagen modificada obtenida de Krüger-Genge, Blocki, Franke, Jung. *Vascular Endothelial Cell Biology: An Update*. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep 7;20(18):4411. Open access)

1.5.1.2 Angiogénesis Intususceptiva

La angiogénesis intususceptiva implica la formación de pilares de tejido transcapilar que se fusionan para formar nuevos vasos (205–207). Efectivamente, tras el sprouting, se inicia la intususcepción la cual va a permitir la rápida expansión y remodelación capilar mediante tres mecanismos básicos: el crecimiento microvascular intususceptivo, arborización y remodelación de las ramificaciones intususceptivas (207–209).

El crecimiento microvascular intususceptivo implica inicialmente la formación de pilares de tejido, lo que proporciona un aumento de la superficie disponible para el intercambio de oxígeno, dióxido de carbono y nutrientes (208,210).

La siguiente fase, la arborización intususceptiva, implica el desarrollo de "pilares verticales", que transforman los segmentos capilares bien fundidos en arteriolas y vénulas. Este proceso disminuye la distancia entre las arterias y las venas a medida que el plexo capilar se expande.

La remodelación de las ramas intususceptivas es el proceso final por el cual la intususcepción altera la red vascular. Implica la adaptación para optimizar la hemodinámica de los fluidos en respuesta al SS. La poda vascular también se produce con la remodelación de las ramas intususceptivas, ya que la obstrucción luminal conduce a la regresión del vaso. La poda fomenta el predominio de los capilares mejor perfundidos (207,208,211). (Figura 7)

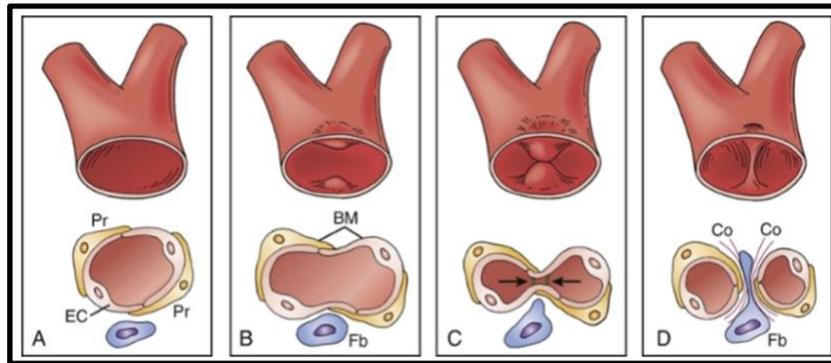


Figura 7. Crecimiento intususceptivo. A y B, Impacto de la pared celular endotelial en el lumen, que lleva a la creación de dos luces (C) que conducen a la formación de pilares (D). BM, Membrana basal; Co, Fibrillas de colágeno; EC, Célula endotelial; Fb, Fibroblastos; Pr, Pericitos. (Imagen modificada obtenida con permiso de Djonov V, Baum O, Burri PH. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 2003 Oct;314(1):107-17)

1.5.1.3 Luminogénesis

La luminogénesis o formación del lumen es responsable de dotar a los neovasos de la capacidad para llevar sangre oxigenada y nutrientes al tejido circundante, o, lo que es lo mismo, convertirlos en vasos funcionales. Este proceso implica inicialmente el establecimiento de la polaridad apical-basal de las CEs, mediada por la VE-cadherina. Se han propuesto tres mecanismos para explicar el desarrollo del lumen: el primero, implica el desarrollo de vesículas y vacuolas pinocíticas intracelulares, que se fusionan progresivamente dentro de la CE y luego con las células adyacentes, dando lugar a la formación de un lumen; el segundo, es similar, pero implica la exocitosis de estas vacuolas entre las CEs a lo largo de la longitud del brote en crecimiento, que se unirán y formarán un lumen; el tercero, se produce como consecuencia de la reorganización de las uniones intracelulares, mediada por la VE-cadherina (212,213). Más allá de la luminogénesis, los aumentos adicionales en el diámetro del lumen están relacionados principalmente con las SSF del fluido (195,212). (Figura 8)

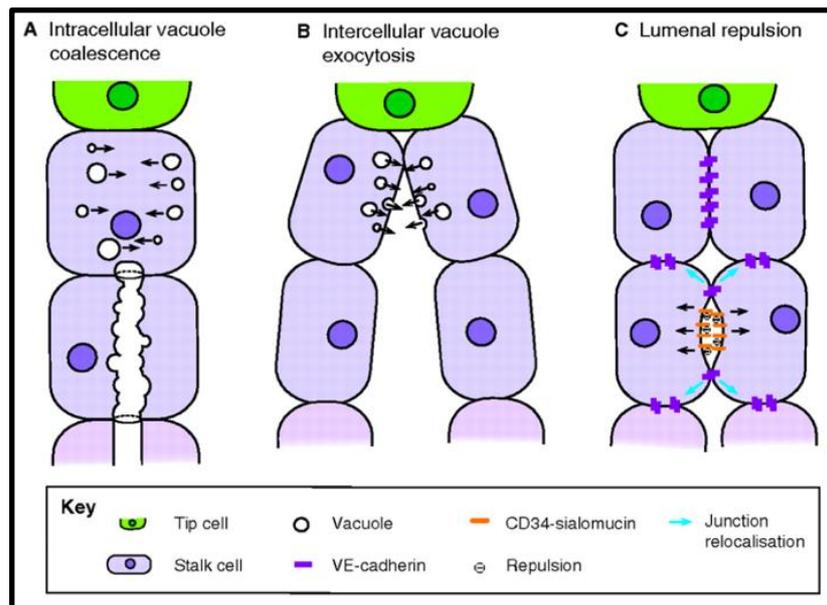


Figura 8. Paradigmas de la formación del lumen en la angiogénesis. A, las células endoteliales (CEs) forman vesículas y vacuolas pinocíticas intracelulares que se fusionan dentro de las mismas y entre las células adyacentes, formando un lumen. B, exocitosis de vacuolas intracelulares. Las CEs pueden formar un lumen mediante la generación de vacuolas exocíticas que son liberadas dentro del espacio intercelular. C, Polarización de las CEs por la localización mediada por VE-cadherina, lo que lleva a la polaridad apical-basal y la subsiguiente repulsión y formación de lumen. (Imagen obtenida con permiso de Geudens I, Gerhardt H. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development*. 2011 Nov;138(21):4569-83

1.5.1.4 Regulación de la angiogénesis: vía de señalización Notch

La vía de señalización Notch es esencial para el desarrollo y crecimiento arterial, tanto durante la embriogénesis como después del nacimiento. Esta vía implica mecanismos de regulación genética que controlan múltiples procesos de diferenciación celular, tanto durante la embriogénesis como durante la vida adulta. Es una vía importante, sobre todo, para la comunicación célula-célula. Esta vía ha sido implicada en múltiples procesos, no sólo en angiogénesis, sino también en neurogénesis. Tiene dos ligandos asociados: el DLL y el Jagged (JAG) (192).

El VEGF usa esta vía para iniciar la angiogénesis, estableciendo el eje DLL4-Notch-VEGF. Mientras que el VEGF induce el brote angiogénico, las vías de señalización Notch funcionan para limitar la migración de las células Tip (214). La señalización Notch se produce mediante el aumento de la expresión del VEGFR-1, vinculando competitivamente al VEGF, limitando así su disponibilidad (197-199,215,216). El equilibrio de la señalización del VEGF y de Notch regula el desarrollo de los neovasos (217-219).

La transformación de la CE al fenotipo Tip es inducida por la exposición de la misma al VEGF. El DLL4 es altamente expresado por las células Tip, aumentando la sensibilidad al VEGF, el cual se une a su receptor 2 o KDR a este nivel (197,198,217,219-221). El aumento de la unión VEGF-KDR regula la vía Notch-DLL4, y lleva a la disminución de dicho receptor en las CEs adyacentes como medida de control del proceso, ayudando también a que la célula Tip mantenga su posición de manera

competitiva (195,199,222,223). Estas células adyacentes se transforman en el fenotipo Stalk, que también expresa Notch (197,214,224). De hecho, las células Stalk expresan una mayor señalización de Notch y del ligando Jagged-1 (JAG-1) que las Tip, contrarrestando la actividad de Notch-DLL4 y limitando la migración de las células Tip (197,217,223–225). (Figura 9)

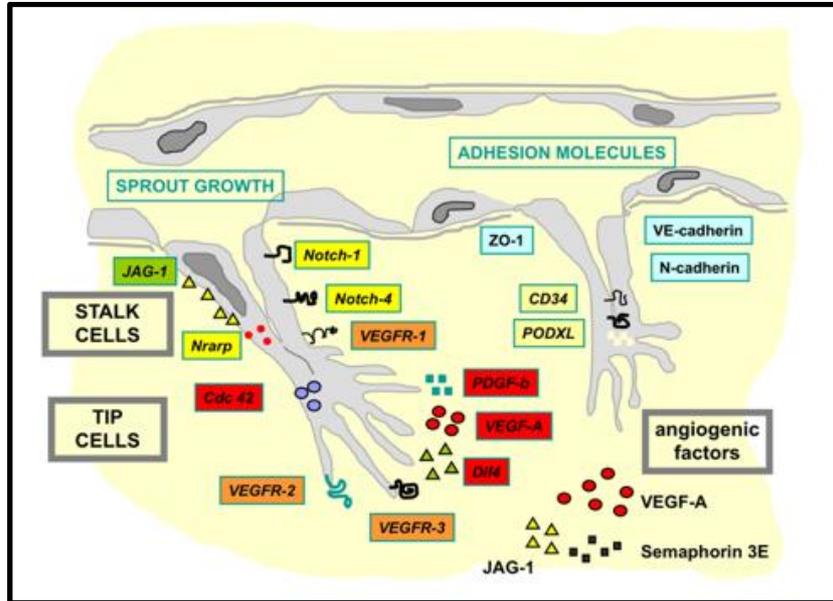


Figura 9. Especialización de fenotipos celulares durante la angiogénesis de brotes. Los factores proangiogénicos y antiangiogénicos regulan la especialización fenotípica de las células Tip o Stalk, y, eventualmente, de las falanges inactivas. Las Tip son responsables de la migración del vaso en desarrollo y de la formación de filopodios, mientras que las Stalk son responsables de la proliferación, la formación de lumen y, en última instancia, de proporcionar longitud al vaso en desarrollo. Cdc 42, Cell division control protein 42 homolog (proteína de control de la división celular 42 homolog); JAG-1, gen Jagged 1; Nrp1, Notch regulated ankyrin repeat protein o proteína de repetición de la anquirina regulada por Notch; PDGF-b, factor de crecimiento derivado de las plaquetas; PODXL, podocalixina; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; VEGFR, receptor de VEGF; ZO-1, Zonula occludens-1 o tight junction protein-1 (TJP-1). (Imagen obtenida de Ribatti D, Crivellato E. “Sprouting angiogenesis”, a reappraisal. Dev Biol. 2012 Dec 15;372(2):157-65. Open access).

1.5.2 Mecanismos Básicos de la Arteriogénesis

La red colateral o de suplencia preexistente en el individuo puede llegar a convertirse en largos vasos de conductancia que mantienen el flujo sanguíneo después de un infarto de miocardio o de una isquemia de miembros inferiores. Sin embargo, este fenómeno difiere entre especies, individuos de la misma especie y en los distintos lechos vasculares dentro de un mismo individuo.

Una vez que una estenosis en una arteria principal llega a ser hemodinámicamente significativa, el flujo sanguíneo de dicha arteria es redirigido hacia zonas de menor resistencia mediante las colaterales asociadas en ese territorio. A diferencia del proceso anterior donde la hipoxia era el estímulo desencadenante, en la arteriogénesis es la elevación de las mencionadas fuerzas de cizallamiento o SS contra la pared de estas

arteriolas la que inicia el estímulo. La fuerza derivada del fluido será proporcional a la velocidad de flujo, e inversamente proporcional al radio al cubo, por lo que pequeños cambios en el radio pueden normalizar el SS (226).

Se ha propuesto la existencia de receptores de presión sobre la superficie celular de las CEs que detectan este incremento del SS (227). Las CEs reaccionarían activando los genes sensibles a SS, los cuales a su vez pondrían en marcha una serie de reacciones que acabarían con la activación de la eNOS, que incrementaría la producción de NO para producir vasodilatación, primer elemento en el desarrollo de la red colateral para redirigir el flujo por zonas de menor resistencia. A su vez, se produce también una liberación de VEGF por el NO y un incremento en la liberación de citoquinas desde la CE, sobre todo de proteína quimiotáctica de los monocitos (MCP-1), factor estimulante de colonias granulocíticas-monocíticas (GM-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF- α) y CAMs (228–231). Atraídos por la MCP-1, el GM-CSF y el TNF- α los monocitos circulantes se adhieren (mediante las CAMs) a la CE, e invaden la pared vascular para dirigirse al espacio subendotelial. Las plaquetas también se adhieren a la CE, activándose y produciendo IL-4, que estimula aún más la producción de CAMs. El papel principal del GM-CSF es aportar un ambiente adecuado para una función estable de monocitos. Tanto es así, que si no está presente, los macrófagos no son activados dentro de la pared y no favorecen la arteriogenesis (232). De acuerdo con esto, esta fase puede ser considerada como una inflamación local en la pared del vaso.

Tras su transformación a macrófagos en la pared vascular, los monocitos producen NO (233), fibronectina, proteoglicanos y proteasas, las cuales remodelan la MEC. Los macrófagos también producen grandes cantidades de factores de crecimiento, principalmente de la familia del FGF, y particularmente el FGF-2, pero también IGF-I (234–236). El FGF utiliza cuatro tipos de receptores (FGF-1 al 4). Una de las principales acciones del FGF es la proliferación tanto de CEs como de CMLs. Sin embargo, tanto GH como IGF-I, también presentan una acción mitogénica importante en la pared vascular, como veremos (29).

La proliferación celular es seguida de disrupción de la lámina elástica interna y migración, en este caso, de CMLs. El remodelado del vaso es el paso final, que, en gran parte, ocurre en la capa adventicial, que también puede liberar NO mediante la iNOs (233). Las CMLs y fibroblastos son importantes durante esta fase (237). La lámina elástica externa y la elastina de la capa adventicial y de tejidos de alrededor es rota mediante enzimas proteolíticas tales como MMP y plasmina. Esto aporta espacio para el crecimiento del nuevo vaso. En esta fase la vieja estructura del vaso es más o menos desmontada. FGF-2 entonces estimula la maduración de fibroblastos, y capas celulares adicionales son añadidas a la pared del vaso. Durante este remodelado de la pared vascular también tendrá su papel el eje GH/IGF-I (29).

Los vasos colaterales, por tanto, contribuyen a neutralizar el incremento en el SS tras la estenosis u oclusión de un vaso principal. Tal es así que pueden llegar a aumentar su tamaño más de 20 veces. El vaso colateral nuevamente formado es, inicialmente, tortuoso, pero finalmente llega a ser indistinguible de una arteria nativa, disponiendo tanto de capa media como de reactividad normal. (Figura 10)

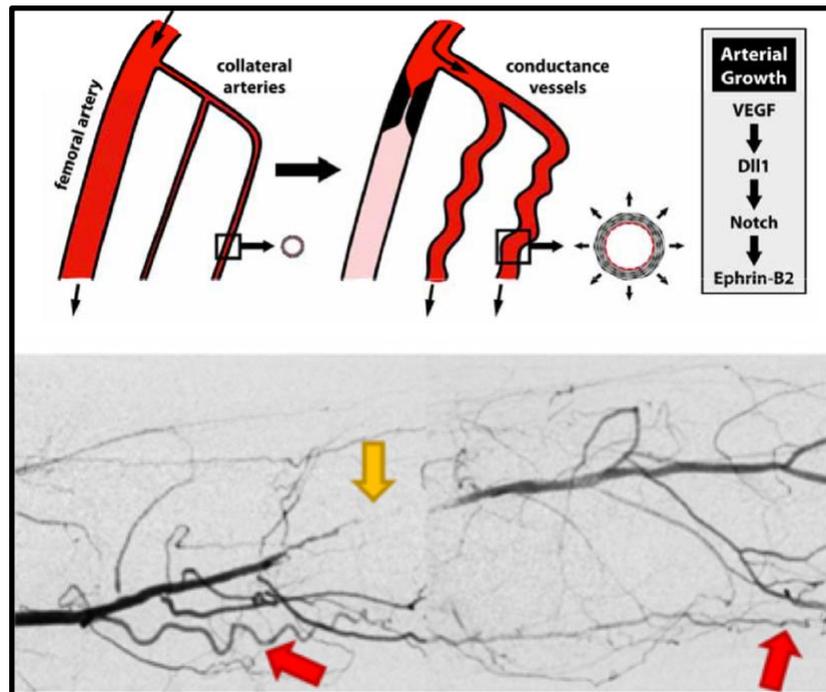


Figura 10. Representación de la arteriogénesis o engrosamiento de arterias colaterales. Arriba, dibujo que representa una situación normal con una arteria principal y sus colaterales preexistentes escasamente desarrolladas. Tras la oclusión de dicha arteria principal, se produce el desarrollo de las colaterales. El VEGF y la señalización Notch-DLL tendrán un papel principal en este desarrollo. Abajo, arteriografía del miembro inferior de un paciente donde se observa el mismo fenómeno arriba representado. Flecha amarilla: oclusión arterial. Flechas rojas: colaterales compensatorias desarrolladas salvando la oclusión. (Imagen obtenida con permiso de Unthank J, Haas TL, Miller S. Impact of shear level and cardiovascular risk factors on bioavailable nitric oxide and outward vascular remodeling in mesenteric arteries. In: Schaper W, Deindl E, editors. Arteriogenesis- Molecular Regulation, Pathophysiology and Therapeutics I. Aachen, Germany: Shaker Verlag Publishing; 2011. p. 89-119)

1.5.3 Vasculogénesis: El desarrollo embriológico debería servirnos de inspiración

El propósito fundamental del sistema vascular es suministrar al organismo oxígeno y nutrientes. Durante las primeras 3 semanas de gestación, la difusión simple es suficiente para soportar el embrión; sin embargo, para la cuarta semana, debe existir un sistema cardiovascular funcional para mantener el desarrollo rápido del embrión. El sistema cardiovascular en el embrión es uno de los primeros sistemas en aparecer y comenzar a funcionar (238).

El primer paso es la modificación de las células mesodérmicas esplácnicas en angioblastos que forman agregados vesiculares en el mesodermo esplácnico del embrión y las regiones extraembrionarias, incluido el saco vitelino, el tallo de conexión y el corion (239).

Estos agregados celulares están compuestos por un núcleo interno de células madre hematopoyéticas y un borde externo de angioblastos que se van a convertir en CE aplanadas, las cuales forman cordones que recuerdan a vasos pequeños, que, a su vez, se unirán entre sí para formar vasos más grandes. Este proceso de vasculogénesis estará bajo

el control de dos factores de crecimiento cruciales secretados por las células endodérmicas vecinas de cada región: el VEGF y el TGF- β (240,241).

Una vez que las CE se establecen como elementos vasculares, comienzan a brotar y a formar redes capilares simples. Estas redes capilares se remodelarán en sistemas arteriales, capilares y venosos en función del entorno circundante. Además, algunos de los presuntos vasos sufrirán intususcepción vascular para generar vasos adicionales. El VEGF y la Ang-1 no sólo son factores proangiogénicos, sino que también conducen a la especificidad endotelial. El VEGF determinará el tipo de capa endotelial (continua, fenestrada, discontinua) según la región, mientras que la Ang-1 influye más en el tipo de uniones intercelulares (tight, adherent,...) (80,242). A medida que los vasos maduran, los componentes de la MEC y la MB asociada estabilizan la vasculatura en desarrollo, actuando como fuente de una serie de factores de crecimiento y proenzimas que necesitan los vasos maduros. La importancia de la MB en la maduración y el mantenimiento del sistema vascular se demuestra por la cantidad de defectos vasculares observados en modelos animales que tienen una deficiencia de colágeno o lamininas tipo IV, componentes clave de la misma (242).

Aunque existen diferencias morfológicas entre las paredes de las venas y arterias, no fue hasta hace poco que se demostró que las arterias y venas también son diferentes con respecto a sus marcadores específicos de la superficie celular. Las CE de las arterias expresan el receptor de efrina B2 (Eph-B2); mientras que las de las venas expresan el receptor EphB4. Ahora se sabe que los angioblastos están destinados a convertirse en CE arteriales o venosas basadas en el tipo de unión del VEGF. Cuando este factor se une al complejo VEGFR2-neuropilina 1 (VEGFR2-NP-1), la CE derivará hacia arterial; por el contrario, cuando simplemente se une al VEGFR2, derivará hacia venosa (238).

El desarrollo de las arterias de los miembros inferiores ocurre algo tarde durante la gestación, comenzando alrededor de la séptima semana con la formación de brotes desde el tronco. El desarrollo del suministro arterial a las extremidades inferiores es más complejo que el de las extremidades superiores (243). El eje arterial de la extremidad inferior es inicialmente una continuación distal de la arteria ilíaca interna, y recibe el nombre de arteria ciática. Ésta es una rama ventral de la quinta arteria lumbar intersegmental. La arteria ciática desaparece en gran medida cuando una segunda rama de la quinta arteria intersegmental lumbar emerge, representando la arteria ilíaca externa, formando el sistema iliofemoral. La arteria ciática inicia su regresión al comienzo de la octava semana, aunque partes de ella persisten, como parte de la arteria poplítea y parte de la arteria peronea. El resto de las arterias de la extremidad inferior se desarrollan como brotes de la arteria ilíaca externa (238).

El proceso responsable del desarrollo y crecimiento de las arterias de las piernas en estos brotes es primariamente angiogénesis y remodelado. El remodelado tiene muchas similitudes con la arteriogénesis del adulto, y es mayor durante el período postnatal temprano.

En resumen, en el embrión los vasos sanguíneos se originan de células progenitoras endoteliales (mesodérmicas) que migran dentro de áreas avasculares y forman una red de vasos primitiva. Esta formación “de novo” de vasos sanguíneos o vasculogénesis, es seguida de un proceso de ramificación y estabilización conocido como angiogénesis, que utiliza vasos preexistentes para generar nuevos vasos. Desde hace mucho tiempo se sabe que ambos procesos inician un sistema circulatorio funcional durante la embriogénesis

(189), pero el hecho de que la vasculogénesis también aparece en el adulto ha sido clarificado más recientemente.

Efectivamente, se ha sugerido que algunas de las células progenitoras endoteliales presentes en esta época permanecerán presentes después del nacimiento (135), quedando principalmente localizadas en la médula ósea. Pero también aparecen en tejido muscular anexo a los vasos sanguíneos, tal y como se comentó con anterioridad. Estas células tienen la capacidad de comenzar un proceso similar a la vasculogénesis en el adulto si se dan las circunstancias adecuadas, y como se demostrará, su función es dirigida y estimulada en parte por la GH (29).

De forma curiosa, el prometedor concepto de angiogénesis terapéutica tras la inyección de células procedentes de la médula ósea en piernas isquémicas para formar nuevos vasos puede ser considerado como “vasculogénesis” (244).

Considerando las similitudes entre la formación de vasos embrionaria y en el adulto, mucha de la información obtenida mediante el estudio de la formación de vasos en la etapa embrionaria puede ser aplicada para el desarrollo de vasos en el adulto (184). Como se verá más adelante, la GH, sobre todo la autocrina, aunque también la endocrina, como hormona transcendental de supervivencia celular y mitogénesis, cumplirá un papel clave en el proceso vasculogénico.

1.5.4. Implicaciones para la fisiopatología y tratamiento de la isquemia de extremidades inferiores

La angiogénesis suele aparecer asociada a procesos de isquemia tisular producidos de forma aguda, como sería la isquemia aguda de extremidades inferiores o el infarto de miocardio. Luo F. y colaboradores describieron en modelos animales de isquemia aguda en 2002 cómo se produce una regulación al alza de genes inducidos por hipoxia como el VEGF, su receptor KDR y el propio HIF-1 α , de tal forma que, la mayor parte del VEGF, parecía proceder de los miocitos y macrófagos. Además describieron cómo la expresión de VEGF parece ser mayor en las fibras musculares de tipo oxidativas (aerobias) que en las de tipo glucolíticas (anaerobias) (245). En este mismo trabajo, también se observa un fenómeno que no se confirma o no se describe en otros trabajos experimentales, y es el hecho de que el VEGF, tras declinar su producción en la pata isquémica al final del primer mes, vuelve a estar aumentado en un control a los 2 meses, sin saber qué pasa en el tiempo intermedio. El FGF-2 también está presente en grandes cantidades en el tejido isquémico, pero no más allá de una semana. A diferencia del VEGF, las principales células productoras de FGF son las células inflamatorias (245). En un estupendo trabajo sobre diferencias celulares y moleculares entre isquemia aguda y gradual o crónica en modelos animales realizada por Yang Y. y colaboradores en 2009, se aclaran muchas de las dudas sobre las diferencias entre los factores de crecimiento y activación genética en ambos procesos (246). En este trabajo se pone de manifiesto cómo, en la isquemia aguda, también existen diferencias de producción de factores según se obtengan las muestras del muslo o de la pata de la rata. Por ejemplo, mientras los genes relacionados con la hipoxia comentados se expresan altamente en la pata, los genes inducidos por SS como eNOS, PDGF o Egr-1 y moléculas quimiotácticas como MCP-1 son principalmente expresados en el muslo (246). Estos últimos genes son pobremente expresados en el modelo de isquemia gradual, lo cual nos debe hacer pensar en la gran trascendencia de las fuerzas de SS en las colaterales para el remodelo, y en cómo debemos enfocar nuestras estrategias terapéuticas.

La información sobre angiogénesis es limitada en la enfermedad arterial crónica en humanos. Se ha publicado que dichos pacientes presentan mayores niveles sistémicos de FGF-2 comparados con el grupo control. Sin embargo, la fuente principal de éste parece ser la piel inflamada más que el músculo isquémico. Los niveles de VEGF no parecen estar elevados ni local ni sistémicamente en los pacientes con isquemia crónica, aunque hay datos contradictorios. En un estudio se detectó una disminución de los niveles sistémicos de VEGF y un aumento de la inflamación medida por TNF e IL-8 respecto a controles sin la enfermedad (247). A este respecto, el estudio GHAS, uno de los estudios que aquí se presentan realizado por nuestro grupo, aportará datos relevantes en este sentido analizando tanto muestras sanguíneas como de biopsias de tejido isquémico y no isquémico. Mientras que algunos estudios analizan muestras de músculo obtenidas durante el proceso de revascularización quirúrgica, encontrando niveles muy bajos de VEGF (184,248), altas concentraciones de este factor han sido medidas en ciertas partes de miembros amputados (249). No obstante, puede que parte de esos miembros sometidos a amputación sufrieran procesos agudos o crónicos agudizados más que crónicos, lo cual crea un aspecto diferencial.

Por tanto, parece haber escasas publicaciones que muestren una angiogénesis activa en la isquemia crónica de las extremidades inferiores, y que apoyarían que en la isquemia gradual o crónica existe una escasa estimulación de factores clave. Esto puede ser debido a una distribución heterogénea de dicho proceso en la pierna con isquemia crónica; o también, por la falta de métodos adecuados para valorarla, o porque este proceso no es central en la enfermedad crónica, lo cual parece más plausible, como será expuesto. Sin embargo, el fenómeno angiogénico parece ser importante a la hora de la cicatrización de heridas, especialmente en pacientes diabéticos. De esta forma, aunque la angiogénesis no parece ser central en la isquemia crónica, parece tener un papel especialmente importante a nivel de las heridas que aparecen en estos pacientes en su estadio de isquemia crítica, fundamentalmente en pacientes diabéticos donde ambos mecanismos de neovascularización parecen afectados (46).

Casi la mitad de los pacientes con isquemia de extremidades tiene DM. Se ha sugerido que, el incremento de riesgo de isquemia y el peor pronóstico de estos pacientes comparado con los pacientes sin DM puede ser debido a defectos en el proceso de angiogénesis. Esto puede parecer contradictorio considerando que la retinopatía diabética es una complicación producida por exceso angiogénico secundario a un incremento de VEGF. Existe evidencia de un empeoramiento en pacientes diabéticos en cuanto a un reducido número de capilares comparado con control en biopsias de pacientes con enfermedad arterial coronaria, y bajos niveles de factores de crecimiento, receptores y ARNm alrededor de úlceras isquémicas y en músculo isquémico de modelos animales de DM (250). El mecanismo final de esta peor respuesta angiogénica en DM es desconocido, pero puede estar relacionado con alteraciones en uno de los pasos necesarios del proceso angiogénico: la traducción hipóxica.

Tóxicos como el tabaco también pueden afectar la capacidad para formar nuevos vasos sanguíneos. Existen evidencias indirectas de que el proceso angiogénico está negativamente influenciado por el tabaco. Los fumadores sanos presentan niveles sistémicos de VEGF disminuidos, y los pacientes con carcinoma de células escamosas que fuman tienen una densidad de microvasos menor y una concentración de VEGF menor en piezas tumorales, comparados con no fumadores. La sustancia que ejerce esta acción en el tabaco es desconocida. Es de destacar que la nicotina, mientras a bajas dosis

presenta un efecto estimulante de la proliferación celular endotelial, a dosis mayores o altas es directamente citotóxica (251).

En cuanto a la arteriogenesis, sus mecanismos han sido inferidos principalmente de modelos animales de isquemia de extremidades, existiendo escasa información procedente de pacientes. En este sentido, los datos moleculares del estudio GHAS ayudarán también a dilucidar algunos aspectos desconocidos. La presencia de vasos colaterales es obvia para cualquiera que haya visto arteriografías de los miembros inferiores procedentes de pacientes con isquemia crónica, pero no se conoce mucho sobre el desarrollo de tales vasos colaterales y de su potencialidad real. Por ejemplo, los programas de entrenamiento en ejercicio en los pacientes claudicantes parecen producir cambios más importantes en el metabolismo muscular y del consumo de oxígeno que en el desarrollo de vasos colaterales. Existe una relación débil entre el incremento de flujo sanguíneo en la pierna y la distancia de claudicación tras un tratamiento de ejercicio, indicando que el incremento de flujo es el responsable de menos de un 30% de la mejoría (252). El principal beneficio del ejercicio es menos dependencia del metabolismo anaeróbico y más fuerza muscular (253). Sin embargo, también es cierto que se han publicado muchos artículos en donde se hipotetiza que el ejercicio, con unas determinadas características (aeróbico), es uno de los principales inductores de la arteriogenesis (254–257), lo cual induce a pensar que, probablemente, no se hayan usado los tests más adecuados para valorar su beneficio real. Así es, en su artículo, Vogel y colaboradores describen las adaptaciones vasculares inducidas por el ejercicio en individuos sanos sometidos a una situación artificial de bajo flujo sanguíneo, comparándolas después con los supuestos cambios adaptativos publicados en pacientes reales con la enfermedad isquémica, sometidos a terapia de ejercicio. Las principales conclusiones son, que pese a las diferencias obtenidas en algunos marcadores entre ambos procesos y las diferencias fisiológicas, las similitudes entre ambos procesos incluyen: una situación isquémica general, cambios en la expresión de micro-ARN, y un aumento de la producción de eNOS/NO, lo cual soporta el hecho de que el beneficio de la terapia de ejercicio, efectivamente, va más allá del simple beneficio a nivel muscular, y que puede ser que no se haya evaluado correctamente (258).

También se sabe que los factores de riesgo afectan al desarrollo de vasos colaterales en la isquemia de miembros inferiores. Se ha encontrado que el tener pobre desarrollo colateral procedente de la arteria femoral profunda, cuando la arteria femoral superficial está ocluida, está relacionado con la DM, duración corta de síntomas y hábito tabáquico en pacientes con claudicación (184). Los pacientes con diabetes y enfermedad arterial coronaria también tienen un reducido número de vasos colaterales comparado con pacientes coronarios sin DM (259). Al igual que en modelos animales, no parece haber una regulación al alza de factores de crecimiento vascular o inflamación extensa en el tejido que rodea a la arteria colateral desarrollada en pacientes con isquemia de extremidades.

La arteriogenesis parece ser un proceso importante y relativamente constante asociado a la isquemia de miembros inferiores, continuando durante mucho tiempo después del inicio de la enfermedad. Sin embargo, la angiogenesis, puede funcionar principalmente en situaciones agudas. Uno puede especular de este modo que, la angiogenesis puede ocurrir en ciertas partes de la pierna con enfermedad crónica en las que se produce una inhibición brusca del flujo sanguíneo, así como, incluso, en trombosis agudas subclínicas y en pacientes con enfermedad de vaso pequeño, típicamente

vasculitis de pequeño vaso como la tromboangeitis obliterante o en pacientes diabéticos con microangiopatía (46). Más aún, zonas fronterizas entre tejidos metabólicamente inactivos por necrosis pueden llegar a ser isquémicas por incremento de la demanda, creando un entorno adecuado para la formación de nuevos vasos (260).

De todo lo anteriormente expuesto, podemos dilucidar que ambos procesos, angiogénesis y arteriogénesis, aparecen dinámicamente regulados en la isquemia según se precise. Incluso, como hemos visto, pueden aparecer simultáneamente, a distintos niveles, o incluso a un mismo nivel, cuando se trata, por ejemplo, de regenerar un tejido.

2 GH Y SISTEMA CARDIOVASCULAR

2.1 LAS HORMONAS TAMBIÉN CUENTAN EN EL SISTEMA VASCULAR. HORMONAS PROANGIOGÉNICAS

Las *hormonas peptídicas* han sido consideradas tradicionalmente como moléculas de comunicación intercelular con acción a distancia. Esto las diferenciaba de los *factores de crecimiento*, considerados moléculas de instrucción, es decir, que dan órdenes a las células y son producidos localmente en los tejidos. En los últimos años, sin embargo, esta distinción entre hormonas y factores de crecimiento se ha vuelto menos clara, con el descubrimiento de que algunas hormonas bien establecidas tienen acciones locales en la diferenciación celular durante el desarrollo. Así es, en el embrión, además del origen materno de las hormonas, las células embrionarias pueden producir hormonas ya antes de que esté formado o maduro el tejido glandular que da origen a las mismas. En estas circunstancias, estas hormonas pueden actuar de manera paracrina /autocrina, a menudo antes de que se haya establecido la circulación embrionaria en desarrollo. Por tanto, parece que podría haber un solapamiento en cuanto a la función entre hormonas y factores de crecimiento, de tal forma que las primeras, como veremos, también pueden jugar este rol (261–264).

Por otra parte, la relación que se establece entre hormonas y vasos sanguíneos es estrecha. Por ejemplo, las glándulas endocrinas están dotadas de una densa red de capilares que proporcionan sustratos para la síntesis de hormonas, facilitando su transporte, una vez liberadas, para ejercer su acción a distancia (265). Las CE y los pericitos localizados en la red vascular de las glándulas endocrinas secretan una batería de factores de crecimiento, citoquinas y moléculas de MEC que controlan la proliferación, diferenciación, mantenimiento e incluso la regeneración de las células endocrinas. De hecho, el propio mantenimiento de la integridad vascular endocrina está estrechamente regulado por la señalización VEGF/VEGFR2 (266). Además, los vasos sanguíneos contienen proteínas circulantes que se unen a las hormonas para controlar su acción a nivel celular.

Pero esta relación es bidireccional, de manera que algunas de estas hormonas pueden influir en la formación y función de los propios vasos sanguíneos. Entre estas hormonas proangiogénicas se encuentra la familia de la hormona de crecimiento (GH), la Prolactina (PRL), el Lactógeno Placentario (PL), y otros sistemas como el sistema Renina-Angiotensina (RAS) y el sistema caliceína-quinina (KKS). Todos estos sistemas hormonales tienen en común que son regulados por escisión proteolítica intracelular. Como veremos más adelante, en el caso de la GH, este concepto tendrá una importancia trascendental para comprender su acción.

La familia GH/PRL/PL son hormonas peptídicas producidas en la glándula pituitaria anterior, así como en la unidad útero-placentaria y en otros lugares fuera de la pituitaria. Estas hormonas están relacionadas estructural y funcionalmente, y derivan de un gen ancestral común de hace 400 millones de años (267–269). Sin embargo, la relación entre sus similitudes estructurales y propiedades biológicas permanece no aclarada. Por ejemplo, mientras todas son potentes agonistas del receptor de la PRL (270,271), sólo la GH activa su propio receptor (GHR), ya que se precisa de la unión a la GHBP para su activación (12,29,46).

De todas las hormonas proangiogénicas, la GH es la mejor conocida. Entre sus múltiples funciones destacan la de ser el mayor regulador del crecimiento lineal postnatal, la de contribuir a regular el metabolismo energético y su función de estimulación inmunológica. La GH actúa estimulando la producción local y sistémica de IGF-I para muchas de sus funciones, de tal forma que IGF-I llegó a ser considerado como la auténtica hormona de crecimiento periférica, y la GH como su factor estimulante. Sin embargo, esta idea fue abandonada tras detectar que la GH también puede actuar directamente en células diana mediante su propio receptor (272,273).

La evidencia acumulada, tanto clínica como experimental, indica que la GH tiene un papel importante en la regulación de la homeostasis vascular, así como en las respuestas vasculares frente a condiciones patológicas que implican la pérdida de dicha homeostasis (12,29,274). Esta última acción es la que pone las bases del potencial efecto neovascularizador de la GH.

2.2. REGULACIÓN DINÁMICA HORMONAL DE LA ANGIOGÉNESIS FISIOLÓGICA

Uno de los hechos clave que nos obliga a estudiar los efectos a nivel vascular de la GH es la detección de sus receptores en vasos sanguíneos procedentes de distintos lechos vasculares (275–278). Además, en cultivos de CEs con GH se ha visto como la hormona es capaz de estimular eNOS (279), estimulando la proliferación de dichas células (280), así como su agrupación tubular formando vasos capilares (281,282).

Pero los efectos angiogénicos de la GH se demuestran también *in vivo*. El tratamiento con GH incrementa el número de arteriolas corticales en el cerebro de ratas añosas (283), aumenta la expresión de VEGF y la angiogénesis en el miocardio de la rata tras infarto (284,285), estimula la angiogénesis en heridas de ratas diabéticas (286) y puede aumentar la vascularización promoviendo la movilización de células progenitoras endoteliales derivadas de la médula ósea (EPCs) dentro del torrente sanguíneo (287,288). Además, en situaciones que cursan con déficit de GH la piel muestra una densidad capilar y una permeabilidad reducidas, las cuales mejoran tras el tratamiento con la hormona (289). La retina, por ejemplo, ha sido considerada como una diana mayor para los efectos proangiogénicos del eje GH/IGF-I (290), siendo rara la retinopatía proliferativa diabética en aquellos casos que cursan con deficiencia del eje GH/IGF-I (291).

El IGF-I puede mediar las acciones proangiogénicas de la GH en múltiples lugares, ya que los receptores para IGF-I son ampliamente expresados, también, en las CEs, y se ha mostrado que el IGF-I es un estimulante de la angiogénesis *in vivo* e *in vitro* (292). Sin embargo, la GH parece incapaz de incrementar la transcripción de IGF-I en la CE. En su lugar, promueve la expresión y la actividad de eNOS (279), y el NO derivado de la eNOS estimula la vasorelajación, vasopermeabilidad y angiogénesis (49). Además, infusiones locales o sistémicas de GH (293) incrementan de forma aguda el flujo sanguíneo del

antebrazo y la liberación de NO en humanos sanos sin elevación significativa de los niveles plasmáticos de IGF-I o la expresión muscular de ARNm para IGF-I. Mientras estas observaciones están a favor de una acción autónoma de la GH mediada por NO, IGF-I es también vasoactivo debido a su activación de eNOS (292). La relevancia de las acciones vasculares de la GH está enfatizada mediante datos clínicos que muestran que los pacientes con deficiencia de GH tienen incrementado el riesgo de muerte cardiovascular (294). La pérdida de la producción de GH en humanos conduce a incrementar las resistencias periféricas, reduce la fracción de eyección cardíaca, disminuye el flujo sanguíneo en respuesta a vasodilatadores, y reduce los niveles de NO, mientras que el reemplazamiento de la hormona restaura estas respuestas a la normalidad (295). De forma interesante, algunos efectos vasoconstrictores de la GH vía NO han sido informados en un estudio experimental en cerdos (296), aunque estos autores usan dosis muy altas de la hormona. Si comparamos con el estudio de Napoli y colaboradores de 2003 (293), donde se demuestran claros efectos vasodilatadores de la GH, la infusión de GH fue de 0,0013 mg/minuto durante 4 horas, lo que hace un total de 0,31 mg de GH para un adulto humano de unos 65 kg. En el estudio en cerdos referido, se introdujeron 1,6 mg para cerdos de 65-70 kg en un único bolus (296).

La complejidad de los efectos vasculares de la GH es aún mejor ilustrada por el hecho de que los niveles elevados de la hormona no están siempre asociados con angiogénesis, lo que apoya la contraregulación que tiene la GH a nivel celular para evitar el exceso de acción (29). Además, el tratamiento con GH no estimula la proliferación de algunas líneas de CEs en cultivo (280). Estos hallazgos contradictorios implican que la GH tiene unas acciones vasculares dependientes del contexto, influidas por el microambiente que rodea a la célula y por otros agentes angiogénicos, incluyendo el IGF-I, el NO, el VEGF, y la propia GH local. La GH es producida por las propias CEs, y ésta GH derivada del endotelio estimula la proliferación, migración, supervivencia y formación de capilares de forma autocrina, tal y como se ha visto en tumores (282). Por tanto, la ausencia de activación de los GHR tras la administración exógena de la misma puede ser explicada por la ocupación de dichos receptores por la hormona endógena, pero también por la inhibición de su acción si las condiciones no son las más adecuadas. Sin embargo, la GH humana recombinante (rhGH), forma utilizada terapéuticamente y en la mayoría de los trabajos de experimentación, tiene la capacidad de activar también los receptores de PRL, lo cual puede mediar también señales proangiogénicas (130,274,297). Es importante resaltar, no obstante, que la heterogeneidad de efectos de la GH publicados pueden ser debidos a otros factores que analizamos en los artículos aquí expuestos, entre ellos, a la forma en cómo se han realizado dichos experimentos, así como a las dosis utilizadas para los mismos (12).

Así es, una acción dual angiogénica y antiangiogénica ha sido descrita para la familia GH/PRL/PL, incluyendo la variante de la GH humana (GH-V). Tanto estudios *in vitro* como *in vivo* muestran esta característica. Parece ser que mientras las hormonas completas ejercen acciones promotoras de la angiogénesis, sus respectivos productos de escisión intracelulares tienen efectos antagónicos (298). Cuando la GH es internalizada en la célula es fragmentada en dos, un fragmento N-terminal de 16KDa, y otro C-terminal de 7KDa. Esta escisión es llevada a cabo por moléculas como la plasmina, la trombina o la subtilina. El fragmento de 16KDa inhibe la activación de la vía de señalización MAPK, impidiendo o ralentizando la angiogénesis. Además, se ha visto que estimula también al PAI-1, disminuyendo la producción de plasmina, un factor esencial para la angiogénesis

puesto que interviene en la rotura de la MB para posibilitar la migración de las CEs, así como en la arteriogénesis, facilitando la digestión de la capa media para llevar a cabo el remodelado de los vasos colaterales, tal y como se ha comentado. La molécula intacta de GH no tiene ningún efecto sobre el PAI-1, una observación que nos pone en la pista de que los fragmentos parecen actuar a través de receptores separados de la hormona estructuralmente completa (298).

La actividad angiogénica de la GH fue evaluada *in vivo* mediante el uso de ensayos con membrana corioatlántica (CAM assays). Al usar los péptidos de 16 kDa se obtuvo un efecto inhibitor dependiente de la dosis sobre la proliferación celular de células BBCE (Bovine Brain Capillary Endotelial) inducida por FGF-2. En contraste, tanto GH como GH-V sobreestimularon la proliferación celular inducida por FGF-2 hasta un máximo de 2 veces el nivel obtenido con FGF-2 sólo. En la etapa tardía del bioensayo, mientras las mencionadas hormonas intactas estimularon la formación de nuevos capilares y vasos sanguíneos, los fragmentos de 16 kDa de las mismas no tuvieron efecto (298).

Por tanto, podemos afirmar que los fragmentos intactos y N-terminales de la familia GH/PRL/PL, a través de sus acciones opuestas, son importantes moduladores fisiológicos de la neovascularización.

La formación de nuevos vasos sanguíneos es esencial para la organogénesis y para el desarrollo exitoso embrionario y fetal (299). En el organismo adulto, la proliferación de los vasos sanguíneos es la llave para el crecimiento y función de los órganos reproductores femeninos, tales como los ovarios y el endometrio durante el ciclo menstrual, y la glándula mamaria y placenta durante el embarazo (300). Quizás, en la mayoría de los tejidos adultos, la angiogénesis fisiológica es altamente restringida, y el crecimiento de capilares ocurre sólo raramente y en asociación con procesos de reparación tales como cicatrización de heridas y fracturas.

Miembros de la familia GH/PRL/PL y de la RAS y KKS regulan esta transformación fisiológica de los órganos reproductivos, y algunas de sus acciones implican el control del crecimiento y regresión de vasos sanguíneos. El hecho de que los órganos reproductivos femeninos estén bajo el control de múltiples hormonas que posibilitan la acción angiogénica, es un fuerte argumento a favor de que en la regulación de la angiogénesis debe haber un componente hormonal. Además, con excepción del sistema reproductivo femenino, los vasos de la mayoría de los tejidos sanos están en estado quiescente durante la vida adulta, reflejando la predominancia de inhibidores naturales capaces de contrarrestar los efectos proangiogénicos de abundantes mediadores. El estudio de este alto control de la angiogénesis es particularmente atractivo en tejidos como la retina o el cartílago, los cuales están parcial o totalmente desprovistos de vasos sanguíneos. En ellos, el daño de los mecanismos que regulan la angiogénesis contribuye al desarrollo de la retinopatía proliferativa y la artritis (274).

2.3 LA GH PODRÍA Y DEBERÍA JUGAR UN PAPEL CRUCIAL EN LA VASCULOGÉNESIS

De forma curiosa, coincidiendo con el desarrollo vascular embrionario, se produce el desarrollo de la producción de la GH endocrina. Las células mammosomatotrópicas iniciales expresan tanto PRL como GH, y surgen de una misma célula madre acidófila que se tiñe principalmente para PRL. Las células somatotropas se localizan predominantemente en las alas laterales de la glándula pituitaria anterior, constituyendo

entre el 35% y el 45% de las células de la pituitaria. Estas células ovoides contienen prominentes gránulos de secreción (301).

El principal rol asignado a la GH en el desarrollo está asociado con la supervivencia celular y la proliferación en angiogénesis, neurogénesis y condrogénesis, con un especial énfasis de su acción a nivel de la retina y sobre blastocistos. No obstante, el papel de la GH en el desarrollo temprano continúa siendo ciertamente enigmático. Si bien el crecimiento tanto fetal como postnatal generalmente se consideran dependientes de la GH endocrina procedente de los somatotropos pituitarios, el desarrollo embrionario antes de la diferenciación funcional de la glándula pituitaria, se ha considerado como un ejemplo de "crecimiento sin crecimiento hormonal" (302). Si bien esto puede ser cierto para la GH endocrina, no es cierto, a la luz de estudios posteriores, a nivel local paracrino/autocrino, porque la GH es producida también en el embrión, al igual que en la etapa postnatal, en sitios extrapituitarios, actuando en este caso más como un verdadero factor de crecimiento (303–305). Parece que esta GH producida localmente es una forma de 15 KDa, algo distinta a la forma monomérica de 22 KDa descrita a nivel pituitario. Por ejemplo, esta forma de 15 KDa parece secretarse de las células ganglionares de la retina (RGC) al vítreo en esta etapa temprana, donde está unida a los proteoglicanos y la opticina (306,307). El vítreo embrionario actuaría, por tanto, como un depósito para la concentración y liberación controlada de GH retiniana, al igual que lo hace para otros factores de crecimiento (308).

Debido a que tanto la GH como sus receptores están presentes en el embrión temprano antes de la diferenciación funcional de los somatotropos hipofisarios, y antes del establecimiento de un sistema circulatorio funcional, es lícito pensar que la GH puede ser un miembro de la gran batería de factores de crecimiento autocrino/paracrino que controlan el desarrollo embrionario (304). Efectivamente, en los embriones muy tempranos, el GHR parece estar asociado con las superficies celulares, la MEC e intracelularmente con el núcleo, y puede ser responsable de la capacidad de respuesta de los embriones (309,310). La expresión de GHR nuclear puede estar asociada con posibles acciones intracrininas de la GH (311).

Se ha establecido claramente que la GH puede ejercer efectos directos, independientes del IGF-I, en la diferenciación, proliferación y supervivencia de las células en una amplia variedad de tejidos en el embrión y feto, además de en el adulto (304). Ha sido demostrado que la GH es angiogénica en el embrión de pollo, evocando una respuesta significativa cuando se prueba en la CAM (312), aunque la molécula de GH en sí misma puede comprender fragmentos tanto angiogénicos como antiangiogénicos, tal y como se ha comentado (298). Existe evidencia de que la GH puede influir en la migración de CEs inducida por endotelina 1 cuando la vía usada es la MAPK, pero no la PKC. Sin embargo, la mitogénesis de CEs secundaria a IGF-I y mediada por MAPK, no es inhibida por GH, lo cual apoya aspectos diferenciales en la acción de GH e IGF-I a nivel de la CE (313).

La apoptosis es una parte integral del proceso de desarrollo (314), y se ha sugerido que este proceso puede ser la vía predeterminada para diferenciar unas células de otras, según estén o no expuestas a factores antiapoptóticos (315). Hay evidencia sustancial de que la GH puede actuar como un factor de supervivencia para las células *in vivo* e *in vitro* (316–318), y que durante el desarrollo tales acciones se ven ya en las etapas de ovocitos y blastocistos (319,320). Sin embargo, gran parte de los datos sobre los efectos antiapoptóticos de la GH en el desarrollo se han recopilado en etapas neonatales; por

ejemplo, se demostró un efecto protector *in vitro* sobre los miocitos cardíacos en las células de la rata de 1 día de edad, y se demostró que involucra quinasas reguladas por señal extracelular (ERK) y fosforilación de tirosina del receptor EGF y JAK2 (321). De manera similar, se ha demostrado que la GH es neuroprotectora en el cerebro de rata neonatal (322), y parece actuar directamente en esta capacidad, y no a través de IGF-I (323).

Estos efectos antiapoptóticos de la GH pueden (322,324), o no (325), estar mediados por la expresión de miembros de las familias de moléculas bcl-2 y bax. Además, las vías de señalización que favorecen la supervivencia parecen activarse por la fosforilación de Pi3K, como segundo mensajero, y, posteriormente, por la de la serina-treonina quinasa Akt, que en otros sistemas se ha demostrado que inactiva las moléculas proapoptóticas tales como la caspasa-9 (325,326). También se ha establecido que las vías mediadas por Akt promovidas por la acción de GH pueden aumentar la actividad de algunos factores antiapoptóticos, incluidos bcl-2 y NF-kB (326–328), en una forma similar a la acción del IGF-I (329).

Los efectos de la GH en la supervivencia celular podrían estar mediados también por su acción sobre el citoesqueleto y la adhesión celular, ya que la pérdida de adhesión célula-matriz, también llamada anoikis, puede conducir a la muerte celular (330). Se ha demostrado que GH puede iniciar una reorganización tanto de la actina (331–333) como del citoesqueleto de microtúbulos (334), así como mejorar la expresión de CAMs (335) y activar la quinasa de adhesión focal de proteína asociada al citoesqueleto y la adhesión celular (336). Estos efectos abren la posibilidad de que la GH pueda influir no solo en la apoptosis, sino también en los fenómenos asociados con el movimiento celular, como la morfogénesis y el control de la vasculogénesis, sobre todo si sumamos sus efectos sobre la estimulación de la producción de VEGF y su receptor KDR, como ha quedado de manifiesto en el adulto (29).

Ante esta estrecha relación vaso-GH, y dado que dicha hormona va a tener un papel crucial en el desarrollo embrionario, es completamente lógico pensar que ha de estar también presente en el momento de formación del sistema vascular, influenciando el control del mismo, ya que de ello dependerá el desarrollo de los distintos órganos vascularizados (46).

2.4. INSTANTÁNEA FÍSICO-QUÍMICA DE LA GH

2.4.1 Biosíntesis de la GH

El locus del genoma humano donde se encuentra la información para la GH contiene un grupo de cinco genes altamente conservados ubicados en el brazo largo del cromosoma 17, en la región q22-24 (337). Estos genes comprenden la GH humana normal (hGH-N) y su variante (hGH-V), así como el grupo de genes coriónicos: hCS-L, hCS-A y hCS-B (268). Todos ellos contienen cinco exones separados por cuatro intrones. Mientras el gen hGH-N es selectivamente transcrito en los somatotropos de la hipófisis y codifica una proteína de 22 kd (191 aminoácidos), los genes coriónicos se expresan también en los trofoblastos de la placenta (338). Además, estos genes y los de las hormonas PRL y PL parecen derivar de un gen ancestral común, incluso aunque dichos genes estén localizados en diferentes cromosomas (6 para la PRL, 17 para GH), ya que comparten la misma organización: cuatro intrones separando cinco exones (269,274,339).

Aproximadamente el 10% de la GH de la hipófisis es una variante de 20 kd que carece de los aminoácidos 32 a 46. La hGH-V es expresada también en los

sincitiotrofoblastos placentarios. Las elevadas concentraciones séricas de hGH-V en la madre van acompañadas de una disminución de la hGH-N, lo que sugiere una regulación de retroalimentación del eje hipotalámico-pituitario materno. Después del parto, los niveles de hGH-V en circulación caen rápidamente y son indetectables después de una hora (340). No se sabe si la hGH-V es igual en acciones a la GH-N. El gen productor de GH-V está presente en la hipófisis anterior, sin saber cuál es su función (341,342). Sin embargo, no existe producción de este tipo de GH en condiciones de normalidad. Parece secretarse sólo en estados patológicos, principalmente en tumores hipofisarios.

Las moléculas de GH circulantes comprenden varias formas heterogéneas (monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros) cuyo significado aún no ha sido aclarado. El monómero de 22 kd es el principal componente fisiológico de la hormona, representando el 75% de la secreción de GH de la pituitaria. En este péptido reside principalmente la actividad promotora del crecimiento, con escasos efectos diabetogénicos, que son más pronunciados con la forma de 20 kd. Esta heterogeneidad es importante, ya que podría aclarar la heterogeneidad de acciones de GH, ya que pueden regular su acción.

2.4.2 Secreción y tipos

El patrón pulsátil característico de la secreción de GH es un reflejo de la acción de dos péptidos reguladores hipotalámicos: la hormona liberadora de la GH (GHRH), y la somatostatina o factor inhibidor de la liberación de somatotropina (SRIF), con presumible modulación mediante otros factores putativos liberadores de la GH. Las células somatotropas expresan receptores específicos para GHRH (343), para secretagogos de la GH como la grelina, y también expresan los subtipos de receptores SRIF 2 y 5 para la somatostatina (344,345).

GHRH induce selectivamente la transcripción del gen de GH, así como su liberación, no induciendo otras hormonas de la pituitaria anterior o intestinales (346,347).

La actividad de GHRH es especie-específica, y viene modulada por su receptor de unión perteneciente a la superfamilia de la proteína G. La regulación de la producción de GH se realiza a nivel de la transcripción celular mediante el incremento de AMPc. El GHRH es producido a nivel del hipotálamo o centro neurálgico donde se regula la mayor parte de la acción de la hipófisis. La pérdida de la capacidad de unión de GHRH con su receptor por distintas causas suponen la forma más frecuente de deficiencia de GH.

El SRIF suprime, tanto la producción de GH basal, como la frecuencia y amplitud de pulsos de la hormona secundarios al estímulo de GHRH, pero sin afectar directamente a la biosíntesis de la GH. El GHRH administrado a adultos normales provoca un rápido aumento de la GH sérica con niveles más altos en sujetos femeninos (348). La preexposición de los somatotropos al SRIF aumenta la sensibilidad de los mismos a la estimulación de la GHRH. Por tanto, durante el valle de producción de GH normal, el alto nivel de SRIF, probablemente, prepara al somatotropo para responder al máximo al siguiente pulso de GHRH, optimizando así la liberación de GH. El SRIF también inhibe la liberación central de GHRH a través de conexiones sinápticas directas con las neuronas hipotalámicas que contienen SRIF.

Sin embargo, la regulación de la secreción recíproca de la GHRH y somatostatina no es perfectamente bien comprendida. En esta regulación están implicados múltiples neurotransmisores y neuropéptidos. Estos factores alteran la secreción de GH ante situaciones como el estrés, una hemorragia, una hipoglucemia, o el ejercicio, entre otros.

La propia hipoxia es un estímulo importante para GH, como veremos. Un ejemplo claro de esto es el que acontece a nivel del sistema nervioso central, donde la GH constituye un importante sistema de respuesta al daño cerebral por isquemia. La respuesta apoptótica inicial irá seguida de una segunda fase de proliferación neuronal para restituir a las neuronas perdidas. En esta regeneración la GH tendrá un papel preponderante (349). Por tanto, que la GH es estimulada en situaciones de isquemia, es un hecho demostrado, al menos a nivel cerebral.

La síntesis y secreción de GH está también regulada mediante péptidos de IGF. Los receptores específicos para IGF-I e IGF-2 han sido identificados en una variedad de sistemas celulares de la pituitaria. La inhibición de la secreción de GH mediante IGF-I y IGF-2 en células de la pituitaria anterior de la rata ha sido demostrada, y la secreción espontánea de GH está disminuida en humanos tratados con IGF-I sintético. En los estudios que aquí presentamos, se profundiza aún más en otros factores que contribuyen a la regulación de la GH pituitaria que han sido puestos de manifiesto más recientemente, como la molécula Klotho, de la que hablaremos más adelante pormenorizadamente, o el factor de diferenciación del crecimiento 15 (GDF-15), de origen cardíaco (12).

Por último, la secreción de GH también se ve influida por una variedad de factores no peptídicos, como andrógenos, estrógenos, linfocitos T4 y glucocorticoides.

2.4.2.1 Patrones de secreción de la GH

La medición de las concentraciones de GH en sangre ha revelado un patrón de secreción pulsátil separado por valles, durante los cuales la GH presenta muy bajos niveles o es indetectable. La concentración de GH es alta en la circulación fetal, alcanzando un máximo durante la mitad de la gestación (350,351); en neonatos los niveles son más bajos, posiblemente reflejando un control mediante el aumento de los niveles de IGF-I en circulación; durante la infancia, los niveles de hormona aún bajan más, pero existirá un aumento de la amplitud de los pulsos con frecuencia de los mismos invariable (351–353). Las amplitudes de pulso de la GH disminuyen inexorablemente con la edad (somatopausia). Por ejemplo, las amplitudes de pulso existentes en la edad media son un 20-30% menores que aquellas registradas en la pubertad (354–356). (Figura 11)

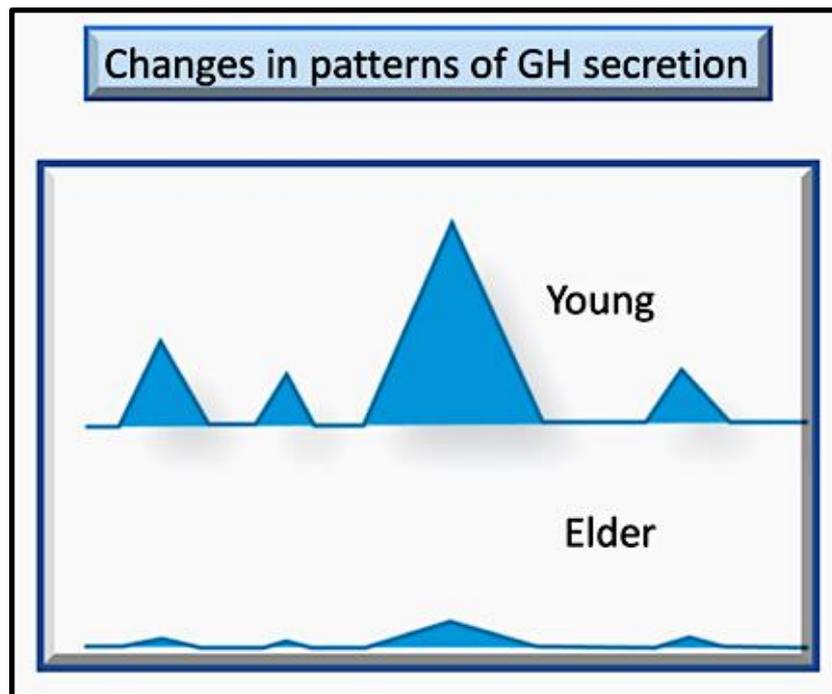


Figura 11. Somatopausia. Diferencias de secreción entre la juventud y la etapa de senescencia, con caída de la producción endocrina de GH. (Imagen modificada obtenida de Arce VM, Devesa J, Fernández-Tresguerres JA. Hormona de crecimiento. In: Fernández-Tresguerres JA, editor. Fisiología Humana. 4th ed. Madrid, Spain: Mcgraw-Hill Medical; 2019. p. 1-36)

La obesidad afecta tanto a los pulsos de la GH, con una disminución de la frecuencia y duración de los mismos, como a la respuesta a secretagogos, disminuyéndola. De forma contraria, el ayuno se asocia con una mayor frecuencia y amplitud de pulsos de GH (357,358). La obesidad a edades tempranas se caracteriza también por un descenso de la producción de GH, pero con IGF normal e incremento de los niveles de su proteína transportadora (GHBP), y, con frecuencia, aumento del crecimiento lineal (358). El hiperinsulinismo asociado con la obesidad además causa disminución de la unión de IGF-I a su proteína transportadora (IGFBP-1), lo que aumenta los niveles de IGF-I libre (359).

Un hombre adulto joven experimenta unos 6 a 10 pulsos en 24 horas (352,353,360). Los estados fisiológicos que afectan a dicha secreción, aparte de la maduración y la edad, incluyen: el sueño (361,362), el estado nutricional (357), el ayuno, el ejercicio, el estrés (363), y la producción de esteroides gonadales (364).

El impacto de la naturaleza específica pulsátil de la secreción de GH sobre sus acciones biológicas ha sido objeto de estudio. De hecho, esta secreción es distinta a la de la GH autocrina, generando diferencias de acción que serán analizadas (29). El tipo de secreción pulsátil es una constante en muchas especies, por lo que debe ser fundamental para su función. Se cree que este tipo de liberación impide la aparición de fenómenos de desensibilización de las células diana (349). Mientras que en roedores existen pulsos de gran amplitud de secreción de GH cada 3,5 horas en machos y cada hora en hembras, en humanos, se considera la existencia de un único pulso de gran amplitud coincidiendo con

el sueño profundo o de ondas lentas (slow-wave sleep). Las fases REM del sueño, en cambio, están asociadas con una secreción baja de GH (361,362).

Sin embargo, también existen diferencias sexuales de producción de GH en humanos, que se engloban bajo el término de dimorfismo sexual. Mientras que en el varón hay un pico claro nocturno con pulsos muy pequeños durante el día y fases de secreción indetectable interpulsos, en la mujer, los pulsos son menos altos, pero con niveles interpulso más elevados donde la GH se sigue detectando (349). Los patrones sexualmente dimórficos de la secreción de GH y la focalización del tejido parecen estar determinados por la STAT5b, que es sensible a los pulsos repetidos de GH inyectada exógenamente mientras que otras respuestas inducidas por GH se desensibilizan por la administración repetida de la hormona (365).

Es de destacar que la persistencia de la secreción de GH fuera del período de crecimiento constituye una prueba clara de la importancia de las acciones de esta hormona más allá del crecimiento longitudinal. La elevada tasa de GH durante períodos sin aparente crecimiento como la etapa fetal y neonatal temprana apoyan esta aseveración (349).

2.4.3. El bueno, el feo y el malo: el receptor de la GH (GHR)

Después de unirse con su receptor, la GH estimula la fosforilación de una proteína (tirosina-quinasa) asociada al propio receptor: la denominada Janus Kinase 2 (JAK2). La secuencia de pasos propuesta sería: 1, unión de la GH a su receptor de membrana (GHR); 2, cambio en la estructura del receptor (dimerización); 3, interacción de GHR con JAK2; 4, fosforilación de ambos; 5, cambios en proteínas citoplasmáticas y nucleares con fosforilaciones y desfosforilaciones; 6, estímulo de la transcripción del gen diana. Este el mecanismo básico a partir del cual pueden activarse múltiples vías de señalización celular. A lo largo de los artículos de revisión que presentamos se analizan aquellas vías que la GH pone en marcha para inducir neovascularización, destacando aquellas que llevan a la inducción del NO a partir de la eNOS, o al aumento del VEGF, entre otros (29,366).

El GHR es una proteína de 620 aminoácidos y 70 Kd de la clase I de la superfamilia de receptores citoquina-hematopoyetina que consiste en un ligando extracelular o dominio de unión, una porción transmembrana y un componente de señalización citoplasmático. La superfamilia del receptor de GH es homóloga con los receptores para PRL, IL 2 y 7, eritropoyetina (EPO), interferón y el GM-CSF (367).

Una de las vías activadas que actúa en la transcripción genética a nivel nuclear es la signal transducer and activator of transcription 5 (STAT 5). La STAT fosforilada es la que se une al ADN nuclear para activar una expresión genética determinada. La respuesta tisular a las señales de la GH está determinada por el patrón de secreción de la misma, además de por la cantidad absoluta de hormona circulante. Los patrones de secreción sexo-específicos de GH implican, por ejemplo, expresiones enzimáticas distintas del citocromo P450 (368).

El IGF-I también puede regular directamente la función del GHR, ya que se ha visto que, al igual que la insulina, puede inhibir la traslocación de este receptor a la superficie celular en osteoblastos (369).

La GHBP incluye dos proteínas distintas, una de 60 kd y alta afinidad de unión a la GH, que corresponde con el dominio extracelular del receptor de la GH, y otra de 20 kd y baja afinidad de unión (370). Mientras la de alta afinidad se une al 45% de la forma de

GH monomérica de 22 kd circulante, la de baja afinidad, que no está relacionada con el GHR, se une a la GH de 20 kd (371,372).

La función de GHBP es la de prolongar la vida media de la GH, presumiblemente evitando su filtrado glomerular a nivel renal, además de facilitar y modular la unión de GH a su receptor. De esta forma amortiguaría las oscilaciones agudas en los niveles de GH en suero asociadas con la secreción pulsátil de GH pituitaria. En general, los niveles de GHBP reflejan los niveles y actividad de GHR. De ahí que bajos niveles de GHBP estén asociados con un estado de insensibilidad a la GH (373,374), como puede verse en estados como la desnutrición, la enfermedad hepática crónica, o en el enanismo de Laron, caracterizados por una disminución de los niveles de GHBP en el plasma. Por el contrario, los niveles altos de dicha proteína se encuentran en sujetos obesos, embarazadas o en aquellos que reciben estrógenos o están en proceso de realimentación (375).

También existen múltiples elementos de control intracelular de la actividad de la GH. Además de las vasoinhibinas, se ha informado sobre la inhibición de las señales de GH intracelulares mediante varios miembros de la familia de supresores inducibles de señales de citoquinas (SOCS), que interrumpen la vía JAK/STAT, y por lo tanto interrumpen la acción de la GH (376). La importancia de estas proteínas se demuestra bien en el crecimiento. Por ejemplo, tras el bloqueo de las SOCS-2 en ratones se produce gigantismo en los mismos (377). También la presencia de endotoxinas y citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1 β y el TNF- α , los cuales pueden inducir a su vez proteínas SOCS, pueden producir insensibilidad a la GH (378). Las SOCS-3, inducidas por las anteriores citoquinas *in vivo*, pueden jugar un importante papel en la insensibilidad a GH inducida por la sepsis (379). Esto llevó a usar dosis muy altas de GH para ver su posible beneficio en pacientes enfermos críticos con shock séptico, en los cuales se obtuvo un aumento de la mortalidad (380), posiblemente relacionado con el favorecimiento, por parte de la propia GH, de una tormenta de citoquinas ya incrementadas por la sepsis (12).

Por último, la acción de la GH puede ser igualmente controlada mediante un mecanismo de internalización de su receptor. Como hemos comentado anteriormente, el GHR se encuentra distribuido, no sólo en la superficie celular, sino también a nivel de la MEC y el núcleo. Sin embargo, una de las zonas con mayor concentración de GHR es en las caveolas. Se ha investigado el papel de las caveolas en la internalización de la GH en células Chinese hamster ovary (CHO) transfectadas de forma estable con el ADN complementario (ADNc) del receptor de la GH (CHO-GHR1-638). Mediante microscopía electrónica inmunográfica se pudo ver que una porción de los GHR en la superficie celular estaba localizada en o cerca de las estructuras que contienen caveolina y que, tras estimularlo con GH marcada, una porción de la hormona se internalizaba en la célula en las vesículas que contenían caveolina. Si se alteraba la integridad caveolar por agentes aglutinantes de esteroides (filipina, nistatina) se inhibía parcialmente la internalización de la GH, mientras que la internalización de la hormona no se veía afectada por agentes no aglutinantes de esteroides como la polimixina B o la xilacina. La transfección transitoria del ADNc de caveolina en células CHO, transfectadas simultáneamente con el ADNc del GHR, aumentaba tanto la internalización de la hormona como la estimulación por parte de la GH de la transcripción mediada por STAT. Por tanto, en conclusión, las caveolas constituyen una vía importante de internalización de la GH y de regulación de su actividad intracelular. Esta vía de internalización también puede ser utilizada por otros miembros de la superfamilia de receptores de citoquinas (381).

2.4.4. Secretagogos y otros factores que influyen en la secreción de GH

La grelina es un secretagogo secretado principalmente por las células neuroendocrinas de la mucosa gástrica. Está implicado en la regulación del peso, en parte debido a su acción sobre el control del GHRH y el SRIF, y, por tanto, regulando la secreción de GH. Presenta receptores tanto a nivel hipotalámico como pituitario (382) para inducir la GHRH hipotalámica y la GH pituitaria (383).

Los llamados secretagogos artificiales como los hexapéptidos sintéticos inducen una liberación potente y reproducible de GH, siendo útiles para el diagnóstico de la deficiencia de la hormona (384). Estos secretagogos estimulan tanto la secreción de GH como la de GHRH, actuando a través de distintos receptores y diferentes vías de señalización intracelular en las subpoblaciones somatotropas (385). Requieren la presencia de un hipotálamo funcional para inducir la GH (386) y pueden potenciar la liberación de GH incluso ante una dosis máxima estimulante de GHRH exógena (387). Así es, una vez saturada de GHRH la hipófisis, siguen siendo plenamente eficaces si se continúa con su administración (388). La secreción de GH por estas sustancias se altera mínimamente por la edad, el sexo o la adiposidad, y no tienen efectos secundarios potenciales, a diferencia de la hipoglucemia inducida por la insulina (389).

La leptina desempeña un papel clave en la regulación de la masa grasa corporal (390), regulando la ingesta de alimentos y el gasto de energía, y puede actuar como una señal metabólica para regular la secreción de GH. Las neuronas hipotalámicas productoras de leptina y del neuropéptido Y hacen sinapsis con las neuronas de la somatostatina, potenciando su acción (391). En los adultos hipopituitarios con deficiencia de GH, las concentraciones de leptina son más altas de lo que se esperaría por su masa grasa corporal (392).

Los neuropéptidos, incluyendo la neurotensina, VIP, motilina, colecistoquinina y glucagón, neurotransmisores y opiáceos inciden en el hipotálamo y modulan la liberación de GHRH y SRIF. Los efectos integrados de esta compleja regulación neurogénica determinan el patrón final de secreción de la GH. La apomorfina, un agonista central del receptor de la dopamina, estimula la secreción de GH (393), al igual que el tratamiento con L-dopa. Las neuronas colinérgicas y serotoninérgicas estimulan la GH.

La administración aguda de glucocorticoides estimula la secreción de GH, mientras que el tratamiento crónico con esteroides inhibe la GH (394). Los glucocorticoides administrados a sujetos normales inhiben la producción de GH inducida por GHRH de una forma dosis-dependiente, de forma similar a la que se observa en el síndrome de Cushing (395). Además, el cortisol, elevado tras la administración de glucocorticoides, antagoniza a las acciones periféricas de la GH.

Los niveles de GH disminuyen en los pacientes hipertiroideos, pero se vuelven normales cuando los pacientes se vuelven eutiroideos, lo que sugiere que la hormona tiroidea suprime la secreción de GH. La TRH no estimula la secreción de GH en sujetos normales, pero sí induce la GH en el 70% de los pacientes con acromegalia (396). Las respuestas discordantes de la GH a la TRH se evidencian también en pacientes con enfermedades hepáticas, renales, tumores carcinoides ectópicos liberadores de GHRH, anorexia nerviosa y depresión.

Los elevados esteroides gonadales circulantes que se observan durante la pubertad también pueden explicar los mayores niveles de GH en esta época. Los estrógenos estimulan las tasas de secreción de GH, mientras la testosterona aumenta la GH por pulso, con el consiguiente aumento del IGF-I (397).

2.4.5 Administración de GH y sus efectos secundarios

La mayor experiencia con GH proviene del tratamiento de los pacientes con déficit de dicha hormona. La rhGH, forma de uso habitual para terapia, se administra generalmente en una única inyección subcutánea nocturna, siendo la dosis recomendada para adultos mucho menor que para los niños, ya que en estos últimos los efectos secundarios son menores. Las personas de edad avanzada son más sensibles a la terapia hormonal, y los hombres suelen requerir menos dosis que las mujeres. La mayoría de los adultos toleran una dosis inicial de 300 µg/d (0,3 mg), que es luego ajustada según los niveles plasmáticos de IGF-I y la presentación o no de efectos secundarios. Los niveles de IGF-I deben mantenerse en su rango normal para la edad y sexo del individuo, evitando niveles de IGF por encima del quintil 5 o más de 2 desviaciones estándar de la media para la edad y sexo. El ejercicio de escalamiento desde dosis inferiores hasta dosis superiores es muy común durante las primeras semanas de tratamiento con GH. El tipo de terapia continuada o discontinuada en el tiempo suele depender de varias variables, pero principalmente dependerá de la experiencia del médico. Cualquiera de ellas tendrá una serie de ventajas e inconvenientes que serán analizados más adelante. De forma característica, en los pacientes con déficit de GH suele haber un período de latencia de unos 3 meses hasta que el paciente reconoce los beneficios del reemplazamiento de la hormona.

El efecto secundario más común de la administración de GH es el edema, sobre todo en la zona donde se administra. También pueden aparecer artromialgias en hasta 1/3 de los pacientes tratados con GH. Si se usa una dosis de GH titulada por niveles de IGF-I, dichos efectos secundarios son menos frecuentes. Los pacientes con enfermedad maligna activa (cáncer no curado), no deberían ser tratados con GH, ni tampoco los pacientes con síndrome del túnel carpiano u enfermedades con retención de líquidos. La posibilidad de que la GH pueda iniciar un nuevo cáncer o estimular el crecimiento de un tumor benigno preexistente es un concepto más bien teórico. En algunos estudios epidemiológicos (398–400) los niveles altos de IGF-I se han relacionado con cáncer de próstata, colon, pulmón y mama en mujeres premenopáusicas. Sin embargo, no existen datos en la literatura que demuestren la transformación de una célula normal hacia la malignidad por efecto de la administración de IGF-I. Hasta la fecha, no se ha publicado aparición de más tumores en pacientes que hayan recibido terapia con rhIGF-I, así como tampoco se ha hallado relación entre IGF-I y hepatocarcinoma en pacientes cirróticos (401). Además, los pacientes con acromegalia, portadores de grandes niveles de GH y de IGF-I, no tienen un incremento especial de tumores sobre la población general, aunque es cierto que se ha publicado un leve incremento de cáncer de tiroides sin significación estadística (402). En niños tratados con GH e IGF-I hay mayor experiencia, y no existe un incremento de la aparición de cáncer en la edad adulta. No obstante, nuevos estudios se están realizando para determinar este aspecto. Los niveles de glucosa en sangre deberían ser monitorizados cuidadosamente durante el tratamiento con GH, especialmente en pacientes con diabetes mellitus (403).

3 CONCLUSIONES SOBRE NEOVASCULARIZACIÓN Y GH

Conocemos, por tanto, que existen una serie de hormonas implicadas en procesos de neovascularización, entre ellas una gran familia de hormonas: GH/PRL/PL. Hay evidencias recientes de que estos sistemas hormonales regulan la angiogénesis ejerciendo ambos efectos: estimulador e inhibidor, representando este último un sistema de contraregulación para evitar la sobreestimulación. La complejidad de las hormonas implicadas se evidencia mediante el hecho de que la regulación de la angiogénesis depende de diversos ligandos, sus receptores y de múltiples vías de señalización. También el solapamiento de funciones entre miembros de una misma familia repercute en los resultados de la respuesta angiogénica.

No obstante, la información concerniente a la regulación de la angiogénesis mediante estas familias de hormonas es, aún hoy, insuficiente, ya que pocas condiciones fisiológicas o patológicas se han examinado en profundidad. Se ha informado de muchas excepciones y datos contrapuestos, debidos, en parte, a las diferencias metodológicas en el diseño de los estudios (modelo animal, tipo de tejido, grado de enfermedad, parámetros farmacológicos y tiempos de seguimiento, entre otros). Es importante la relativa proporción de células estromales e inmunes presentes en los tejidos específicos, ya que estas células liberarán sustancias químicas como citoquinas y moléculas que pueden afectar a la angiogénesis. La relativa proporción de hormona circulante frente a la producida localmente será otro factor destacado, así como el porcentaje de aclaramiento hormonal, y la producción y actividad de proteasas. Los datos son, de forma sorprendente, limitados sobre la contribución de especies antiangiogénicas producidas endógenamente, como es el caso de la fragmentación de la GH llevada a cabo por las vaso-inhibinas.

4 EL DÉFICIT DE GH DEL ADULTO NOS PUSO EN LA PISTA

Basta con hacer una sencilla búsqueda bibliográfica o leer alguno de los múltiples libros sobre GH para darse cuenta de que las evidencias de los efectos cardiovasculares de la somatotropina abarcan un abanico tan amplio que resulta casi imposible resumirlos sin perder información valiosa. Si nos centramos sólo en la neovascularización, dichas evidencias son menos abundantes, y pueden ser agrupadas dentro de cuatro grupos: clínicas, experimentales, embriológicas y aquellas que tienen que ver con el balance redox. Algunas de estas evidencias ya han sido expuestas. No obstante, no es el objetivo principal de esta tesis el de concentrar las múltiples evidencias en un solo apartado, sino el de ir comentando evidencias conforme se vayan exponiendo hechos fruto de nuestra investigación. De esta manera, se tendrá una visión más clara.

Curiosamente, una de las primeras evidencias sobre el papel que la GH podía ejercer en el sistema cardiovascular viene representada por el déficit de GH del adulto, ya que dichos pacientes, como se ha comentado, presentan un mayor riesgo cardiovascular (404). Incluso entre los pacientes con insuficiencia cardíaca, aquellos con deficiencia hormonal presentan un aumento significativo de la mortalidad respecto al grupo sin dicha deficiencia (405). En una alta proporción de pacientes con insuficiencia cardíaca se ha detectado un síndrome de deficiencia hormonal múltiple, con implicación del eje

GH/IGF-I, hormonas tiroideas, andrógenos y resistencia a la insulina (405–407). Numerosos estudios han demostrado que los pacientes con déficit de GH presentan disfunción endotelial, base del mayor riesgo aterosclerótico. Esta disfunción queda reflejada en una menor vasodilatación dependiente de endotelio (408,409), y, posiblemente, se debe a una menor producción de NO endotelial, ya que, en dichos pacientes, se ha encontrado una disminución de los niveles de nitritos y GMPc en orina (408,410).

Efectivamente, las primeras evidencias contundentes de laboratorio sobre la relación de la GH y la eNOS provienen de uno de los autores más referenciados aquí, Thomas Thum, que ya entre los años 2003 y 2006 publicaba dos artículos donde se mostraba cómo la GH inducía la eNOS y el NO en una línea de CE humanas en cultivo (279), y recogía todas las evidencias, tanto experimentales como clínicas, sobre cómo la hormona regulaba la función vascular (411). En el período 2002-2003, Cittadini también publicaba sus estudios sobre GH e insuficiencia cardíaca (295,412), y Napoli presentaba los primeros datos sobre el efecto agudo de la GH aplicada en sujetos jóvenes sanos produciendo una importante vasodilatación en el lugar de administración, mediada por NO (293). Sin embargo, mucho antes, en 1996, todo esto ya se hipotetizaba en un artículo de Böguer sobre pacientes deficientes de la hormona (413). Para que se vea la trascendencia de la antigüedad de los estudios que abalan la GH, ya en el año 2000, Evans presentaba el efecto de la terapia sustitutiva de GH en pacientes deficientes sobre la función endotelial y el estrés oxidativo (409).

Hoy se sabe que los principales efectos de la GH sobre el sistema cardiovascular son la estimulación del crecimiento de los cardiomiocitos y la producción de óxido nítrico (NO), molécula fundamental para la homeostasis vascular (12,318). El tratamiento sustitutivo con GH restaura la función endotelial (409,410), y, paralelamente, disminuye el estrés oxidativo, fenómeno éste íntimamente ligado a la disfunción endotelial. Esta mejoría en la función endotelial sucede independientemente del perfil lipídico de los individuos. Igualmente, la administración de la hormona es capaz de revertir lesiones vasculares estructurales incipientes, como el engrosamiento de la media-íntima (414). El papel de GH e IGF-I como moduladores de la estructura y función miocárdica está, por tanto, bien establecido. En pacientes deficientes de GH, el tratamiento sustitutivo es capaz de mejorar la función cardíaca, aumentando la masa muscular del ventrículo izquierdo (415). Diversos estudios experimentales muestran los efectos beneficiosos de la GH en el tratamiento del infarto de miocardio en animales de experimentación. Así, el tratamiento con GH postinfarto en ratas disminuye los volúmenes telesistólico y telediastólico, y evita la disminución en la fracción de eyección tras el infarto. Por tanto, parece que la administración de GH tras el mismo preserva la función del ventrículo izquierdo y evita su remodelado patológico.

A nivel cardiovascular el efecto positivo de GH no se limita a la mejora citada de la función miocárdica. La hormona es capaz, tanto directamente, como vía inducción del VEGF y de otros múltiples factores, de potenciar la revascularización de un territorio sometido a isquemia, a expensas de poner en marcha un potente efecto angiogénico (12,29,46,414).

5 DESANDAR EL CAMINO PARA ENCONTRAR LA SOLUCIÓN: JUSTIFICACIÓN DE ESTUDIOS CON GH EN ISQUEMIA DE MIEMBROS INFERIORES

Un largo número de estudios clínicos sobre angiogénesis han sido publicados en la literatura, oscilando desde publicaciones no controladas de casos aislados o series de casos, pasando por estudios piloto y, finalmente, estudios controlados randomizados (RCT). Se han ensayado varias modalidades de tratamiento angiogénico con factores de crecimiento y/o implantes celulares. Estos estudios han utilizado una variedad de tratamientos, criterios de selección de pacientes y objetivos, así como diseños y duración de la terapia diferentes, haciendo la comparación entre ellos muy difícil y, por tanto, siendo difícil la valoración de la eficacia real. El establecimiento de la seguridad de tratamientos novedosos ha sido una prioridad para los estudios clínicos.

Además, las técnicas de transferencia genética usadas en algunos estudios arrojan cierta incertidumbre sobre el hecho de introducir ADN no propio en el individuo, con el teórico riesgo de alterar el crecimiento de células musculares y su recambio. La posibilidad de generar malformaciones vasculares fue ilustrada en la primera publicación sobre transferencia genética de VEGF para la EAP. El paciente al que se refiere dicha publicación desarrolló tres angiomas sobre la pierna tratada varias semanas después de la administración del ADN (416).

La administración de altas concentraciones sistémicas de VEGF, uno de los factores de crecimiento más usados en terapéutica angiogénica, tiene el potencial de causar hipotensión y edema. Estos efectos adversos han sido publicados en estudios con VEGF recombinante, pero parecen, en cualquier caso, ser bien tolerados, transitorios y reversibles (417,418). En el caso del FGF-2 recombinante el efecto adverso principal es sobre el riñón, produciendo principalmente proteinuria (419). Así es, incrementos modestos de la albuminuria han sido publicados en diversos estudios con dosis única o doble de FGF-2, pero un estudio con infusión intravenosa repetida de FGF-2 fue abortado por proteinuria severa en 5 de 24 pacientes (21%) (419).

Por otro lado, la terapia génica puede provocar una respuesta inflamatoria no deseada. Varios estudios han informado de fiebre transitoria tras su administración, especialmente con vectores adenovíricos (420,421). De hecho, en uno de los estudios con transferencia adenovírica el 61% de los pacientes desarrolló anticuerpos antiadenovirus, lo cual puede tener importantes limitaciones para la adecuación de dar tratamientos repetidos (420).

En cuanto a resultados, el pool de estudios en angiogénesis parece mostrar beneficios inconsistentes y varios estudios no fueron adecuadamente controlados o con el poder suficiente para establecer firmes conclusiones sobre la eficacia de dichos tratamientos. Es particularmente difícil llevar a cabo metanálisis sobre este tema por la gran heterogeneidad existente entre los estudios, que presentan objetivos distintos y diferentes criterios de inclusión/exclusión.

Queda aún mucho por aprender sobre la modalidad de tratamiento óptima, frecuencia de dosis y lugar de administración. Parece claro que los estudios sobre un único factor angiogénico no están alcanzando los resultados anticipados por los estudios

experimentales, y por tanto, la administración de múltiples agentes puede ser necesaria para optimizar la respuesta angiogénica (422). Por ejemplo, se sabe que la combinación de FGF y VEGF tiene efectos sinérgicos (423).

Por todo lo expuesto, y por el papel que se sabe que la GH juega en la homeostasis vascular y, en general, en la neovascularización, sumado al hecho de que la GH no ha sido probada previamente en estudios experimentales ni en ensayos clínicos con isquemia periférica, creemos que está más que justificado que sea probada en este contexto. Además, hay que destacar que se trata de un fármaco de fácil administración cuyos efectos secundarios son bien conocidos. No obstante, aunque cada vez se conoce más sobre la dosificación correcta para ciertas patologías como el déficit de GH del adulto o los trastornos del crecimiento en niños, no hay experiencia sobre la mejor forma de usar la hormona para neovascularización en pacientes isquémicos. Su bajo precio actual, es otra ventaja frente a otro tipo de terapias, excesivamente caras. Si la tendencia en los estudios de angiogénesis es a imitar al organismo, entonces creemos que puede estar justificado testar la GH como aproximación terapéutica para pacientes que sufren de isquemia sin otras posibilidades terapéuticas. El mayor beneficio, posiblemente, vendrá de la mano del estudio sobre la mejor dosis, pauta, y vía de administración de uso de la hormona, y de la combinación de GH con terapia celular, especialmente, como veremos, con células madre mesenquimales.





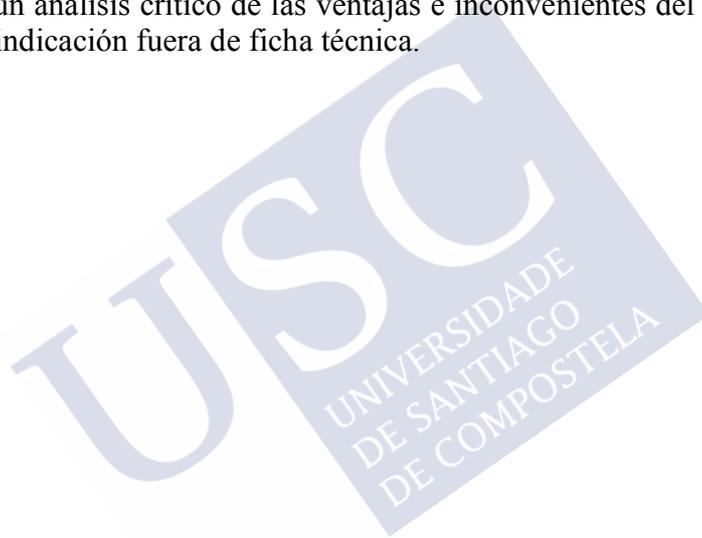
OBJETIVOS

1 OBJETIVO PRIMARIO

1. Mediante los dos primeros artículos, se pretende probar la hipótesis de que la GH, administrada exógenamente, podría tener un papel en el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, aliviando el dolor de reposo asociado a la isquemia de miembros inferiores avanzada, y ayudando a cicatrizar las heridas.

2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Mediante los dos artículos últimos, se pretende poner juntas todas las evidencias, clínicas y experimentales, que forman la base para el posible uso de la GH para tratar la isquemia en aquellos casos resistentes a las terapias convencionales.
2. Formular nuevas hipótesis de trabajo en aquellos temas que aún no hayan sido probados en cuanto a la relación de la GH con otras moléculas de acción en el sistema cardiovascular.
3. Realizar un análisis crítico de las ventajas e inconvenientes del uso clínico de la GH para indicación fuera de ficha técnica.





METODOLOGÍA Y ASPECTOS ÉTICOS

Desde el punto de vista metodológico, y dado que nos encontramos con un tipo de tesis por compendio de artículos, se irán exponiendo y comentando cada uno de los textos por separado, desde el más reciente hasta el más antiguo, para luego realizar una discusión general. Los dos primeros artículos serán los originales: el ensayo clínico y el trabajo experimental; los dos últimos están referidos a sendos trabajos de revisión exhaustiva sobre GH y sistema cardiovascular, proporcionando las bases de los trabajos originales. Hemos preferido discutir los resultados de los trabajos de forma individualizada, realizando una discusión profunda e individualizada para cada artículo que ahonde en todos los aspectos, sin dejar nada atrás. Esto no significa que los comentarios no estén conectados entre sí. De hecho, tal y como se verá, todas las partes, incluida la introducción, están conectadas entre sí formando un todo. La discusión general servirá de resumen de aquellas ideas generales que queremos destacar.

Para abordar los objetivos propuestos, se planeó la realización de dos estudios: un trabajo experimental y un ensayo clínico. Veremos sus aspectos metodológicos por separado.

ESTUDIO EXPERIMENTAL

Animales.- Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley de un peso entre 350-400 gramos, estabuladas y manejadas de acuerdo a las normas de experimentación animal del centro realizador y del Comité Ético de Experimentación Animal (CEEAA) de Galicia, en concordancia con las guías del European Community Council.

Cirugía.- Mediante sedación profunda con mezcla 50-50 de gas isoflurano y oxígeno (inducción: 3%, mantenimiento: 1.5-2%), bajo visión microscópica se procedió a incisión inguinal en la pata trasera izquierda y laparotomía media, disección y control del origen de arteria iliaca común, así como de arteria femoral hasta la bifurcación safeno-poplítea. Dicho sector fue excluido mediante ligadura quirúrgica con seda de 7/0, y electrocoagulación de arterias colaterales. En función de si hubo o no ligadura de la arteria epigástrica superficial caudal, los animales fueron divididos en dos subgrupos. Finalmente se resecó todo el sector excluido. Toda la cirugía fue llevada a cabo en un solo tiempo, preservando los sectores venoso y nervioso.

Grupos Experimentales.- Se establecieron 3 grupos de animales:

- Grupo GH, con administración de hormona de crecimiento tras la cirugía (n=8), en una sola dosis al día, durante 30 días.
- Grupo Placebo, con administración de suero fisiológico con el mismo protocolo que para el grupo anterior (n=6).
- Grupo sham. En este grupo de animales las incisiones fueron realizadas de la misma forma, pero sin llegar a realizar ligadura arterial ni recibir ningún tratamiento (n=2). El objetivo de este grupo es observar la influencia de la cirugía en sí misma y el comportamiento del animal sometido al mismo estrés, pero sin isquemia.

Tratamientos.- Se utilizó GH recombinante: Genotonorm miniquick 0.4mg, Pfiser®, en un volumen total de 0.04 ml de una dilución 1/10 de dicho fármaco (dosis total 15 µg). La administración se hizo por vía s.c. a las 9 am para hacerla coincidir con el pico fisiológico del animal, que es el inverso al del ser humano. El suero salino se administró al mismo volumen. Como analgésico se utilizó Buprenorfina (0,03-0,05 mg/kg/24h, im).

Seguimiento.- Se realizaron controles hemodinámicos y clínicos con el siguiente protocolo: basal previo (T0-pre) y posterior a la cirugía (T0-pos), y a los 10 (T10), 20 (T20) y 30 (T30) días de la misma.

Fotopleetismografía (PPG).- Se realizó bajo sedación leve del animal (isoflurano a 1.5%), en una sala a temperatura constante (24-25 °C), utilizando la sonda PG-21 con velcro strap para doppler portátil Hadeco (Smartdop, ES-100V3 Bidop, y software V-link, Quermed, SA). Los animales se tapaban durante las sesiones de valoración hemodinámica para evitar las pérdidas de calor. Se procedió al análisis cualitativo mediante registro grabado de la onda de pulso, y cuantitativo mediante el cálculo del cociente de pulsatilidad entre pata isquémica y la pata contralateral o relación pata-pata (rpp).

Se analizaron los cambios de la onda tras el proceso isquémico y su teórica recuperación durante el tratamiento mediante el siguiente esquema:

- PPG con trazo normal: aquel obtenido de la pata contralateral del mismo animal.
- Ausencia de recuperación: curva completamente plana, o recuperación menor del 5% del rpp o de la altura de la onda respecto a la T0-pos.
- Recuperación leve: curva PPG con recuperación entre el 5 y el 30%.
- Recuperación moderada: recuperación entre el 31 y el 60%.
- Recuperación importante: aquella mayor del 60%.

Se identificaron y corrigieron los casos de sobreestimación tras cálculo automático de pulsatilidad de la onda. Para ello se revisaron todas las ondas y recalcularon los rpp erróneos.

Escalas de valoración clínica y funcional.- Para el seguimiento clínico y funcional de la pata isquémica del animal se usaron escalas similares a las previamente publicadas (ver ref. 6 y 7 del artículo de Angiología). El daño clínico de los tejidos fue evaluado como sigue: 1= coloración normal de la pata; 2= coloración normal con lesiones de decúbito en cara plantar y/o palidez; 3= cianosis; 4= necrosis parcial o de garras; 5= necrosis completa con autoamputación de la pata. Para facilitar el estudio estadístico, se hicieron dos grandes grupos: daño clínico menos severo (agrupando las escalas del 1 al 4), y daño clínico severo (representado por la escala 5).

Por otro lado, el daño funcional de la pata isquémica se evaluó de la siguiente forma: 0= función normal al deambular o con flexión plantar de las garras al suspender el animal por la cola; 1= ausencia de flexión plantar en las garras, aunque persistencia en pata; 2= pérdida de la flexión plantar, pero sin arrastrar pata al caminar; 3= arrastra la pata al caminar con retracción de la misma en forma de puño (lesión nerviosa completa). Dicha escala también se agrupó en: daño funcional no severo (escalas 0 al 2), y daño funcional severo (escala 3).

Dichas escalas fueron determinadas con el mismo protocolo de seguimiento que para la PPG, tomando siempre fotografías.

Estudio estadístico.- Para conocer la normalidad de las variables se realizó el test de Shapiro-Wilk. Para la comparación de las variables categóricas se escogió el test Chi-Cuadrado (χ^2) con corrección de Fisher, mientras que para las variables continuas fue usada la t de Student para dos muestras independientes o pareadas, según el caso. Para establecer el grado de correlación se usó el test de Pearson. El cálculo estadístico se llevó a cabo usando los paquetes estadísticos R (versión 3.5.1) y Epidat 4.2.

ENSAYO CLÍNICO (ESTUDIO GHAS)

Selección de los pacientes.- Los pacientes se seleccionaron entre los ingresos en el servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Complejo Hospitalario de Pontevedra

(CHOP) con el diagnóstico de isquemia crítica de miembro inferior siempre y cuando cumplieran los criterios de inclusión-exclusión.

Criterios de inclusión:

- Mayores de edad (18 o más años en el momento que se le propone participar).
- Pacientes con Isquemia Crítica de la Extremidad Inferior diagnosticada por métodos clínicos (lesiones tróficas y/o dolor de reposo o nocturno de naturaleza isquémica) y/o hemodinámicos (Índice Tobillo-Brazo o ITB igual o menor de 0.4).
- Imposibilidad de Revascularización o Fallo de intento previo de revascularización por los métodos principales: terapias quirúrgica y/o endovascular.
- Alto riesgo de pérdida de la extremidad.

Criterios de exclusión:

- Mujeres en edad fértil
- Menores de edad
- Incapacitados legalmente
- Pacientes con neoplasia activa o neoplasia tratada 5 años antes del estudio.
- Neumonía
- Sepsis
- Hipotiroidismo y/o hipocortisolismo no tratados

Criterios de retirada:

- Petición del propio paciente.
- Decisión del médico responsable debido a reacciones adversas supuestamente secundarias al fármaco
- Neumonía
- Sepsis
- Aumento de niveles de IGF-I más de 2 desviaciones estándar de la media para grupo de edad y sexo
- Aumento de marcadores tumorales por encima de los límites considerados normales

Procedimiento de aleatorización.- Tras la firma del consentimiento informado, se seleccionó el tratamiento (A o B) mediante técnica del sobre cerrado. El etiquetado del producto se realizó cubriendo el etiquetado original tanto de la medicación como del placebo (suero fisiológico) con el fin de realizar enmascaramiento que pudiera paliar el doble ciego que, por motivos logísticos, no resultó factible en el medio asistencial en que se llevó a cabo el estudio. Se mantuvo el ciego en el análisis estadístico. La aleatorización fue llevada a cabo por una aplicación informática (Epidat 4.0®), siendo puesta en práctica y custodiada por el Servicio de Farmacia del CHOP. Los datos se recogieron de forma que el estadístico encargado del análisis y los facultativos encargados del seguimiento no tuvieran conocimiento del tratamiento empleado para cada paciente

Justificación del tamaño muestral.- El cálculo del tamaño muestral del estudio se basó en el número de personas necesario para detectar diferencias entre grupos en términos de alteraciones en la PPG, definidas por los cambios del trazado de la onda en papel milimetrado. Concretamente, se calculó el número mínimo de pacientes necesario para detectar diferencias medias superiores a 4 mm entre dos grupos independientes. Asumiendo un nivel de confianza del 95% y una potencia del 90% se estimaron 14 personas por grupo. Para el cálculo, se tuvo en cuenta la correspondiente corrección del método estándar, basado en la distribución normal, para muestras pequeñas. El tamaño de muestra estimado se amplió hasta 20 personas por grupo en prevención de posibles pérdidas.

Grupos.- Se establecieron dos grandes grupos: Grupo 1 o Experimental, al que se le administró GH; y Grupo 2 o Control, al que se le administró placebo (suero salino).

Tratamientos. Se utilizó GH (Genotonorm®, Pfizer©) a dosis de 0.4mg/día, durante 5 días a la semana y un total de 8 semanas. La administración fue por vía s.c. en dosis única nocturna (23h) para coincidir con el ritmo circadiano de producción fisiológica de GH en el grupo 1. En el grupo 2 se administrará suero salino a la misma hora y de la misma forma.

Evaluaciones. Se llevaron a cabo en condiciones basales y a los 60 días de tratamiento, con una valoración intermedia a los 30 días.

La valoración basal (día cero pretratamiento) incluyó:

- Analítica general: Hematimetría, bioquímica y coagulación.
- Determinación de marcadores tumorales: PSA, CEA, CA 125,19.9,15.3, α -fetoproteína.
- Determinación de biomarcadores
- Determinación de niveles de IGF-I en plasma
- Pruebas hemodinámicas: doppler y PPG.
- Clínica: lesiones tróficas (fotografía) y/o dolor de reposo (escala EVA).
- Prueba de imagen basal de extremidades inferiores.
- Biopsia muscular basal (músculo sóleo) para estudios histoquímicos.
- Cuestionario de Calidad de vida SF-12

La valoración intermedia (día 30 postratamiento, 4ª semana) incluyó:

- Analítica general, Marcadores Tumorales y niveles de IGF-I.
- Pruebas hemodinámicas: doppler y PPG.
- Control de evolución clínica (fotografía y escala EVA).

La valoración final (día 60 o final de tratamiento, 8ª semana) incluyó:

- Analítica general: Hematimetría, bioquímica y coagulación.
- Determinación de marcadores tumorales: PSA, CEA, CA 125,19.9,15.3, α -fetoproteína.
- Determinación de biomarcadores
- Determinación de niveles de IGF-I en plasma
- Pruebas hemodinámicas: doppler y PPG.
- Clínica: lesiones tróficas (fotografía) y/o dolor de reposo (escala EVA).
- Prueba de imagen final o de control de extremidades inferiores.
- Biopsia muscular final (músculo gastrocnemio) para estudios histoquímicos.
- Cuestionario de calidad de vida SF-12

Evaluación de la respuesta:

Estudio Doppler

Se utilizó Doppler continuo bidireccional con sonda de 8 MHz con pantalla y memoria para análisis curvas doppler en tiempo real (Doppler Vascular Haeco modelo Biflow es-100V3, software smartV-link especial para registros doppler, Quermed SA). Se midieron distintos parámetros: Cuantitativos (Velocidades sistólica y diastólica, Resistencia Periférica, Índice de Pulsatilidad, Índice Tobillo-Brazo); Cualitativos: análisis morfológico de la curva.

Fotopleletismografía (PPG)

Se procedió, igualmente, al análisis de la onda de pulso en papel milimetrado (sonda de PPG21 para Doppler Haeco, Quermed, SA). Se parte de una onda patrón considerada normal y se analizan los cambios de la onda que depende de la gravedad del proceso isquémico. Se calibra el aparato para partir de un pico de onda de 10mm, considerado

como normal. Se expresó en porcentaje de caída de la onda, considerándose los siguientes intervalos:

PPG con trazo de 10 mm: flujo sanguíneo normal.

PPG con caída del trazo a valores entre 9.9 y 6.1 mm: disminución leve del flujo o caída menor o igual al 39%.

PPG con caída del trazo a valores entre 6 y 3.1 mm: disminución moderada del flujo o caída del 40 al 69%.

PPG con caída del trazo a valores entre 3 y 0.1 mm: disminución severa del flujo o caída del 70 al 99%.

PPG con trazo plano: flujo nulo o ausente o caída del 100%.

De acuerdo con estudios previos, es de esperar que la mayoría de los pacientes presenten curvas con trazo plano o disminución severa del flujo (caída mayor o igual al 70%), y que al menos un 75% de los mismos suban una escala, normalmente a escala moderada–leve (caída menor del 70%).

Tomografía Computarizada con contraste (Angio-TC)

Tras informar al paciente sobre la prueba, y verificar que haya firmado el consentimiento informado para la inyección de agente de contraste, se usó el protocolo interno del CHOP para realización de dicha prueba.

Arteriografía

Previa información y firma de consentimiento informado, se llevó a cabo la prueba bajo anestesia local, canalizando de forma percutánea la arteria femoral, e inyectando medio de contraste, obteniéndose una serie de imágenes en varias proyecciones de toda la extremidad. Se usó el protocolo interno del CHOP para realización de la prueba.

SPECT-MIBI

Dicha prueba fue realizada en el Hospital Meixoeiro de Vigo, siguiendo el protocolo interno de dicho hospital, bajo firma de consentimiento informado.

Valoración Bioquímica

Se analizaron los niveles plasmáticos de IGF-I, obtenidos de una vena periférica del antebrazo. La cuantificación se realizó mediante ELISA utilizando un kit específico (Immulite 2000, Siemens).

Estudio histológico

Se obtuvieron muestras de músculo sóleo. Se realizó una incisión pequeña en la piel de 2 a 3 mm bajo anestesia local con lidocaína al 2%, introduciendo una aguja de True-cut de 11G hasta alcanzar la masa muscular diana. Se procedió al disparo, obteniendo un cilindro de músculo. Se recogieron dos fragmentos de tejido, uno de ellos para ser procesado por el servicio de Anatomía Patológica del CHOP, y otro se conservó en RNAlater y enviado en 24h al CIMUS para su congelación y análisis ulterior.

ASPECTOS ÉTICOS

Es necesario subrayar los aspectos éticos de cada uno de los dos primeros trabajos. El primero de ellos, nos presenta los datos moleculares de un ensayo clínico: estudio GHAS (Growth Hormone Angiogenic Study), con número Eudract y número de entrada en el Registro Español de Ensayos Clínicos (REEC): 2012-002228-34, el cual fue aprobado por el Comité Autnómico de Ética de la Investigación de Galicia (CAEIG) el día 09/09/2015, con código de registro 2012/378. En dicho estudio tanto el investigador principal (IP) como el promotor, es el actual doctorando. Este estudio fue aprobado por

la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) el 30/09/2015, siendo la fecha de finalización el 15/01/2018. Cabe señalar que este estudio cumple con la Declaración de Helsinki, así como con los requisitos del Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, y la Circular nº 07/2004: investigaciones clínicas con productos sanitarios y demás normas que los desarrollan. Se anexan todos los documentos acreditativos a los que se ha hecho referencia.

También presentamos un estudio experimental en ratas, que fue llevado a cabo en el animalario del CIMUS con número de registro y autorización ES150780275701, siendo el actual doctorando el investigador responsable del estudio. Contó con la aprobación del Comité de Ética en Experimentación Animal (CEEA) del centro usuario el 30/07/2015, del Comité de Bioética de la USC, el 02/10/2015, y de la Xunta de Galicia el 28/01/2016, con expediente número 15010/2015/002, siendo clasificado como proyecto de tipo I. Este estudio cumplió con todos los criterios del ARRIVE. Se anexan todos los documentos acreditativos a los que se ha hecho referencia.

Por último, también resaltar que el doctorando declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral aquí presentada.





ARTÍCULOS DEL COMPENDIO

**ESTUDIO 1. BENEFICIOS MOLECULARES DE LA GH
APLICADA A PACIENTES CON ISQUEMIA CRÍTICA DE
MIEMBROS INFERIORES: BALANCE REDOX (NOX4),
ANGIOGÉNESIS (VEGFR2/KDR/FLK-1) E INFLAMACIÓN
(TNF- α)**

Artículo 1: Caicedo D, Devesa P, Alvarez C V., Devesa J. Why Should Growth Hormone (GH) Be Considered a Promising Therapeutic Agent for Arteriogenesis? Insights from the GHAS Trial. Cells. 2020 Mar 27;9(4):807. DOI: 10.3390/cells9040807

Url: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/4/807>

Este es un artículo que, aunque finalmente se clasificó como de revisión, es un artículo original, ya que fueron presentados los primeros datos del análisis molecular realizado en biopsias de músculo esquelético de pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores procedentes del estudio GHAS. También se presentaron los datos analíticos sobre determinados biomarcadores de inflamación asociados a la enfermedad isquémica, además de las características generales del estudio, que también serán comentadas brevemente.

En primer lugar, en este artículo destacamos el paralelismo existente entre el declive fisiológico de producción de la GH o somatopausia (355,356) y el deterioro o envejecimiento vascular asociados a la edad, con cambios motivados principalmente por un aumento en la producción celular de las especies reactivas de oxígeno (ROS), con el correspondiente desbalance redox (424) y en los fenómenos inflamatorios, expresados por diferentes biomarcadores, especialmente en el grupo de población con enfermedad vascular (294,404,405,410,425,426).

Existen también interesantes estudios experimentales sobre el concepto de la somatopausia, y en general del declive hormonal con la edad, y sus consecuencias deletéreas en cuanto a la pérdida del poder antioxidante y favorecimiento de un estado proinflamatorio. En un interesante estudio realizado en hígados de ratas añosas y ratas ovariectomizadas, se observó el efecto de la administración exógena crónica de estrógenos y GH sobre parámetros de inflamación y redox. Los niveles de lipopolisacárido (LPO), así como la expresión de la proteína iNOS y los niveles de NOX, aumentaron en las ratas añosas en comparación con los animales jóvenes; este efecto fue aún más evidente en los animales ovariectomizados. Las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β y IL-6 aumentaron significativamente, mientras que las antiinflamatorias como la IL-10 disminuyó durante el envejecimiento y después de la ovariectomía. El envejecimiento también aumentó significativamente la expresión de la proteína oxidasa hemo 1 (HO-1), y las ratas ovariectomizadas mostraron un aumento adicional. El tratamiento con hormonas, incluida la GH, disminuyó los niveles de NOX, LPO y citoquinas proinflamatorias, en comparación con las ratas no tratadas, y también se encontró un aumento significativo de la IL-10, así como reducciones en la expresión de las proteínas iNOS, IL-6, TNF α y IL-1 β . Dicho beneficio fue mayor en las ratas añosas ovariectomizadas que en las intactas. Por tanto, la administración de las diferentes terapias de reemplazo hormonal pudo inhibir la inducción de las citoquinas proinflamatorias y la iNOS, disminuyó también los niveles de marcadores de estrés oxidativo y tuvo potencial terapéutico en la prevención de las lesiones hepáticas (427). Lo expuesto resulta consistente con los datos hallados en el estudio GHAS a nivel clínico en muestras de músculo sóleo, tal y como se expondrá en adelante.

El aumento de la oxidación y de la inflamación asociados al envejecimiento y a la pérdida de la protección hormonal afectarán a la función del NO para mantener la homeostasis vascular, favoreciendo la disfunción de la CE. Pero también, a medida que envejecemos, habrá una disminución en el número y función de las EPCs, lo cual se considera un marcador de riesgo cardiovascular (428–430). Muchos de estos cambios pueden ser compensados por la administración de GH, ya que la hormona es capaz de inducir la movilización de las células mononucleares de la médula ósea (BMMNCs) (287), corrige la disfunción de las EPCs (288), y puede aumentar la producción de NO. Que este hecho se haga vía IGF-I (431) o no (279,293), no está claro, al menos a nivel endotelial. El resultado dependerá de cómo se mida dicho IGF-I, ya que no es lo mismo los niveles en

sangre que a nivel de la pared vascular o en el músculo, ni medirlo en el momento agudo de los primeros días de la aplicación de la GH que un tiempo después de la aplicación de la misma. Así es, por ejemplo, el propio Thum que presenta datos distintos en 2003 y 2007 (279,431), nos dice que al bloquear en ratas el IGF-IR, desaparece la acción de GH sobre el NO, lo cual sería concordante con el estudio de Devin (287). Sin embargo, la aplicación de GH en ratas durante 2 o menos días, tampoco produjo elevación de IGF-I y sí de los niveles de nitratos en sangre, lo que también concuerda con el estudio de Napoli (293). En el estudio GHAS, tal y como se discutirá, no se produjeron movilizaciones significativas ni de IGF-I en sangre ni de ARNm de IGF-I a nivel muscular en pacientes tratados con GH durante 2 meses (29).

El estudio GHAS fue un ensayo aleatorio, controlado, de fase III, simple ciego con enmascaramiento, que utilizó la rhGH o un placebo en pacientes con isquemia crítica de las extremidades sin opciones de revascularización (no opciones de cirugía ni terapia endovascular). En la Figura 12 representamos todos los elementos que usamos con la intención de evaluar el papel angiogénico de la GH.

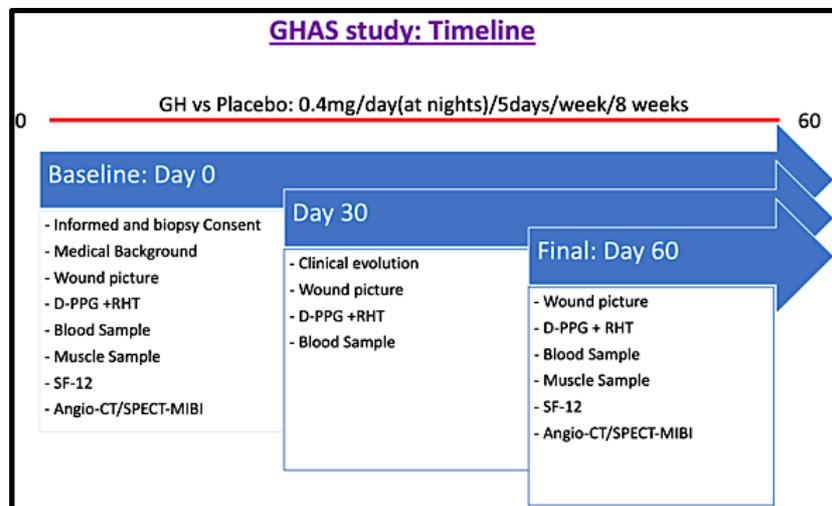


Figura 12. Esquema del diseño del estudio GHAS. Obsérvese 60 días de tratamiento (8 semanas). En las cajas aparece la batería de pruebas que se solicitaron en cada tiempo. También se especifica la dosis y pauta utilizadas de GH. (Imagen obtenida del estudio GHAS)

Las principales características de los pacientes de este estudio se resumen en la tabla 1, destacando que la población evaluada tenía una edad avanzada (obsérvese la edad media de edad de 71 años), con casi el 60% de individuos diabéticos con una alta prevalencia de neuropatía establecida, lo cual afecta, aún más, el mal pronóstico de los mismos. Finalmente, se dispuso de datos procedentes de 34 pacientes, de los 36 incluidos, ya que dos pacientes murieron antes de iniciar el tratamiento, una vez reclutados para el estudio.

Tabla 1. Arriba, características generales de los pacientes participantes en el estudio GHAS. Abajo, resumen de los ítems más significativos. El mayor porcentaje de varones frente a mujeres es normal en las series de pacientes con isquemia crítica, que afecta más frecuentemente a varones. ABI: Índice tobillo-brazo; Rutherford class: categoría de gravedad de la isquemia. Las categorías 5 y 6 son las más graves. (Imagen obtenida del estudio GHAS)

		Total		GH group		Placebo group		p Value
		n	%	n	%	n	%	
Age	< 65	14	41.18	6	33.33	8	50	0.1211
	65-80	8	23.53	3	16.67	5	31.25	
	> 80	12	35.29	9	50	3	18.75	
Gender	Male	27	79.41	13	72.22	14	87.5	0.2715
	Female	7	20.59	5	27.78	2	12.5	
Etiology	Atherosclerosis	24	70.59	11	61.11	13	81.25	
	Buerger	3	8.82	1	5.56	2	12.5	
	Scleroderma	1	2.94	1	5.56	-	-	
	Mix	6	17.65	5	27.78	1	6.25	
HT	No	12	35.29	4	22.22	8	50	0.0907
	Yes	22	64.71	14	77.78	8	50	
DM	No	14	41.18	6	33.33	8	50	0.3243
	Yes	20	58.82	12	66.67	8	50	
CRF	No	25	73.53	13	72.22	12	75	0.8546
	Yes	9	26.47	5	27.78	4	25	
HD	No	18	52.94	8	44.44	10	62.5	0.2924
	Yes	16	47.06	10	55.56	6	37.5	
Dialysis	No	33	97.06	17	94.44	16	100	0.3386
	Yes	1	2.94	1	5.56	-	-	
Tobacco	No	24	70.59	16	88.89	8	50	0.0107
	Ex-smoker <1y	2	5.88	1	5.56	1	6.25	
	Smoker	8	23.53	1	5.56	7	43.75	
		5	14.71	3	16.67	2	12.5	
Rutherford	4	5	14.71	-	-	5	31.25	0.188
	5	15	44.12	9	50	6	37.5	
	6	9	26.47	6	33.33	3	18.75	
		8	23.53	5	27.78	3	18.75	
		26	76.47	13	72.22	13	81.25	
Rest Pain	No	11	32.35	3	16.67	8	50	0.0381
	Yes	23	67.65	15	83.33	3	50	
Neuropathy	No	14	42.42	7	41.18	7	43.75	0.8812
	Yes	19	57.58	10	58.82	9	56.25	

Enrolled Patients	Sex	Age (Mean ± SD)	Comorbidity	Baseline ABI (Mean)	Rutherford class 5-6
36	Male: 28	71 ± 12.7	Heart disease:47%	0.19	70.6%
	Female:8		DM:59%		
			Neuropathy:57.6%		
			CRF:26.5%		

Analizaremos primero el papel de los biomarcadores en la enfermedad cardiovascular enfocados a los datos del estudio GHAS. Es sabido que la inflamación juega un papel clave en el desarrollo y las complicaciones de los pacientes con condiciones isquémicas. Cuanto más alta es la inflamación, más complicaciones, incluyendo la mortalidad (432,433). Esto se ve claramente en los pacientes que sufren enfermedades inflamatorias como la psoriasis, la artritis reumatoide o la Enfermedad Inflamatoria intestinal, que presentan un mayor riesgo de enfermedad aterosclerótica y más temprana (154,434,435). En la isquemia periférica, varias citoquinas han sido involucradas en la evolución de la enfermedad en un estudio de choortes reciente, destacando incrementos significativos de interleuquina 6 (IL-6), TNF- α , selectinas P, E y L (PS, ES, LS), neopterinina (N), VCAM-

1 e ICAM-1, y MMP-2 y MMP-9 (436). Sin embargo, en un estudio algo anterior no se hallaron diferencias significativas para la IL-6 ni la IL-1B en dichos pacientes con isquemia de miembros inferiores (247).

No obstante, ambas citoquinas, IL-6 y 1B, han sido fuertemente relacionadas con la inflamación y la mortalidad cardiovascular un ensayo clínico que utilizó el fármaco canakinumab, un antagonista de la IL-1 Beta, el principal mediador de la IL-6, mostrando el papel de las mismas, y el gran beneficio de este enfoque terapéutico en el entorno clínico de la isquemia cardíaca, en este caso (433). Los niveles de IL-6 también han sido relacionados con la isquemia de miembros inferiores representando un predictor potente de progresión de la enfermedad a medio y largo plazo, siendo una de las citoquinas más estrechamente relacionadas (437,438). Por tanto, el verdadero papel que desempeñan la IL-6 y la IL-1Beta en la isquemia periférica, debido a estos datos algo contradictorios, debería ser mejor definido en los pacientes con EAP mediante estudios de intervención con antagonistas de la misma específicos en la población de pacientes con dicha enfermedad.

En este sentido, una de las principales conclusiones del estudio GHAS que puede hacernos entender parte de las acciones de la GH en el escenario real, es la influencia de la hormona en algunos biomarcadores. Ciertamente, entre los marcadores usados en este estudio, la proteína C reactiva (PCR), el TNF- α y la cistatina C se mostraron elevados de forma basal en los pacientes con isquemia crítica, ocurriendo mayoritariamente en pacientes del grupo GH (Tabla 2), lo que significa que dicho grupo partió de una enfermedad isquémica más grave. No obstante, al final del estudio, sólo el TNF- α se redujo significativamente en el grupo GH frente a placebo, lo cual es consistente con estudios previos (439,440), y con el hecho de que la GH puede disminuir la inflamación cuando se encuentra con este microambiente proinflamatorio. Aunque la disminución de la PCR no fue significativa, obsérvese la tendencia a la disminución de este biomarcador en el grupo de GH en comparación con el placebo, en el que la tendencia fue la contraria. Debe tenerse en cuenta que este marcador tiene un significado diferente al del TNF- α y que el tamaño relativamente pequeño de la muestra en este estudio podría ser responsable de la falta de resultados significativos en algunos de los marcadores.

Tabla 2. Distribución de biomarcadores en el estudio GHAS: tnf: factor de necrosis tumoral alpha; crp: proteína C reactiva; b2m: beta 2 microglobulina; cystic: cistatina C. 0: valores basales o previos al tratamiento; 2: valores finales tras el tratamiento; Group A: tratados con GH; Group B: placebo). En rojo se resalta la significación estadística. (Imagen obtenida del estudio GHAS)

	Group A			Group B				Difference	
	Obs	Mean	SD	Obs	Mean	EE	SD	Mean	p-value
glycemia 0	18	130,5556	41,05122	16	116,75	6,791232	27,16493	13,80556	0,2625
glycemia 2	17	117,5882	40,24621	14	135,6429	16,15774	60,45673	-18,05462	0,3284
tnf 0	16	12,35375	5,20452	16	8,7875	0,9860251	3,9441	3,56625	0,0184
tnf 2	15	10,928	5,128023	14	8,041429	0,9621644	3,600089	2,886571	0,0464
crp 0	18	2,072222	2,868245	16	0,7875	0,1748511	0,6994045	1,284722	0,0454
crp 2	17	1,1	1,384738	14	3,428571	2,007553	7,511574	-2,328571	0,2188
b2m 0	7	0,4685714	0,2743737	4	0,2275	0,0398696	0,0797392	0,2410714	0,1269
b2m 2	8	0,56125	0,5124852	2	0,215	0,085	0,1202082	0,34625	0,3894
cystic 0	7	1,752857	0,9341077	4	0,7625	0,0850857	0,1701715	0,9903572	0,035
cystic 2	8	1,7125	1,125595	2	0,8	0,1	0,1414213	0,9125	0,3054

Así es, en el estudio MESA, los niveles de PCR no pudieron relacionarse con la EAP (441). Además, estudios de randomización mendeliana para PCR han dado resultados neutros, por lo que parece que no es un factor causal como la IL-6 o el TNF- α , sino que es un reactante de fase aguda, que puede ser útil como biomarcador, pero no un objetivo terapéutico (433). Sin embargo, en los estudios en pacientes con deficiencia de GH, la terapia de reemplazo disminuyó la PCR (410). Aunque los pacientes con isquemia y deficiencia de GH no son comparables, ambos tipos de pacientes sufren una insuficiente secreción de la GH. TNF- α ha demostrado ser también, junto con la IL-6, un factor predictor de futuros eventos cardiovasculares en población sana (433,442), y en estudios con inhibidores de TNF- α se ha demostrado la disminución de eventos ateroscleróticos del mismo nivel de la IL-6 (443).

Todo esto nos lleva a pensar que, mientras que el TNF- α puede ser un objetivo en pacientes con EAP, la PCR no lo es y no parece que lo vaya a ser. Así es, el papel de la PCR como factor de riesgo no está completamente aclarado, ya que tiene estudios a favor y en contra. En el estudio JUPITER se estableció un punto de corte ≥ 2 mg/dl para su uso como predictor de eventos. De hecho, cuando es así, las estatinas disminuyen el número de eventos cardiovasculares de forma inversamente proporcional a los niveles de la PCR (444–446). Como dato curioso, en el estudio GHAS encontramos que los niveles basales de la PCR tenían una relación significativa con la mortalidad (Tabla 3), y si observamos dichos niveles basales, sólo en el grupo GH están por encima de 2 mg/dl, y la GH los disminuyó por debajo de ese punto de corte que marca su carácter predictor de mortalidad. Por último, no hay que olvidar, que el beneficio de las estatinas, además de por su reducción de LDLc en un 50%, es también consecuencia de su efecto antiinflamatorio.

Tabla 3. Relación entre mortalidad y biomarcadores. Los niveles basales de PCR (Baseline CRP) están relacionados con la mortalidad de los pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores. (Imagen obtenida del estudio GHAS)

Mortality and Biomarkers in the GHAS trial							
Baseline CRP (differences based on outcomes of death)							
Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]		p-value
Live	27	0,9703704	0,3287642	1,708309	0,2945859	1,646155	
Die	7	3,385714	1,121952	2,968405	0,6403975	6,131031	
combined	34	1,467647	0,3790108	2,209994	0,6965437	2,23875	
diff		-2,415344	0,8507433		-4,148251	-0,6824365	0,0078

Para ver la trascendencia de que la GH disminuya el TNF- α , hay que destacar un meta-análisis de 54 estudios de cohortes prospectivas sobre inflamación y EAP, en donde ciertos biomarcadores como el TNF- α fueron capaces de predecir el riesgo cardiovascular de forma independiente, y su magnitud fue al menos tan importante como el de la tensión arterial y la terapia hipolipemiente, incluso tras ajustar por factores de riesgo tradicionales como edad, sexo, etc (447,448). Típicamente los pacientes con EAP, sobre todo en su estado de isquemia crítica, presentan aumentos de citoquinas inflamatorias, reactantes de fase aguda y CAMs.

No se debe olvidar los efectos deletéreos que el TNF- α puede tener en circunstancias de exceso de inflamación, como es la EAP en su estado avanzado. En estos estados, la

inflamación, y en concreto factores como el TNF- α o las partículas de LDL colesterol oxidadas producen una disminución del IGF-I bioactivo y de sus receptores en las CMLs vascular, que pierden parte de su capacidad mitogénica, favoreciéndose su apoptosis (449), afectando a la capacidad de regeneración de la pared vascular. El TNF- α produce también una elevación de las proteínas SOCS intracelulares que, como se ha descrito con anterioridad, van a inactivar la GH autocrina y la acción de la GH endocrina (450). Además, TNF- α puede disminuir los GHR, afectando a la acción de la GH endocrina (451). Todos estos efectos deletéreos del TNF- α crónicamente elevado van a interferir en el crecimiento y remodelación vascular, sobre todo si consideramos que niveles elevados de dicha molécula han sido relacionados con un aumento de la fosforilación de eNOS y su correspondiente disminución de NO, facilitando la disfunción endotelial y empeorando la arteriogénesis (452,453) (Figura 13). La GH, como se ha visto, podría corregir estos efectos negativos, disminuyendo los niveles de TNF- α , efecto que puede que sea mediado o facilitado por Klotho a nivel intracelular (454).

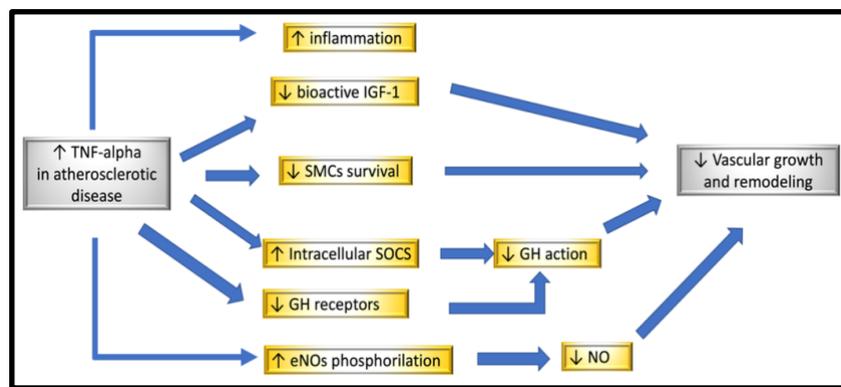


Figura 13. Esquema resumen de las acciones deletéreas del TNF- α crónicamente elevado sobre la acción del eje GH/IGF-I a nivel vascular, afectando finalmente al remodelado vascular. SOCS: Supresores inducibles de señales de citoquinas); eNOS: Sintasa de óxido nítrico endotelial; NO: Óxido nítrico.

Aunque también se ha observado actividad proinflamatoria para la GH, tal y como se ha descrito, esto es algo que ocurre cuando se consideran altos niveles de la hormona, lo que demuestra, una vez más, que el papel de la GH depende de sus concentraciones fisiológicas o patológicas y de si la condición mórbida se establece de forma aguda o crónica (455). No hay que olvidar, que al TNF- α también se le ha asociado una acción beneficiosa, tanto para la angiogénesis como para la arteriogénesis, tal y como hemos defendido en la introducción de esta tesis. A nivel local, dicha citoquina juega un papel importante en la homeostasis vascular. Sin embargo, como venimos diciendo, este hecho se refiere a las pequeñas concentraciones que produce la propia CE en situación normal. Será cuando sus niveles se incrementan y se hacen crónicos, como ocurre en los pacientes con EAP, cuando los efectos del TNF se volverán negativos, afectando a la mitogénesis del IGF-I y GH, y sobre estimulando la NOX4, lo que llevará a la inactivación final del NO por el exceso de ROS (247,454). En estas circunstancias, se favorece la activación de la CE, favoreciendo el estado protrombótico y las complicaciones trombóticas asociadas a la EAP (35).

Como se ha comentado, una de las principales fuentes de datos sobre la influencia de la GH en el sistema vascular es la deficiencia de GH del adulto, en la que se han puesto de relieve muchos problemas vasculares fruto de la disfunción endotelial, expresada como una disminución de la función eNOS y de la producción de NO, como también se verá mas adelante. En estos pacientes, también parece favorecerse un estado proinflamatorio, lo cual apoya el efecto protector frente a la inflamación de GH. Muchos de estos problemas parecen ser secundarios al exceso de oxidación detectado en pacientes con deficiencia de GH, y pueden corregirse después de la terapia de reemplazo con la hormona (410). Hay que subrayar que tanto los cambios en la IL-6 como en el TNF- α no fueron significativos en el estudio de Depak y colaboradores. Sin embargo, la dosis de GH utilizada en los primeros estudios sobre la deficiencia de GH como éste, fue mayor que la dosis recomendada ahora, y este hecho puede haber tenido un impacto en los resultados. El efecto de la dosis de GH en sus acciones se ve bien en la Figura 14.

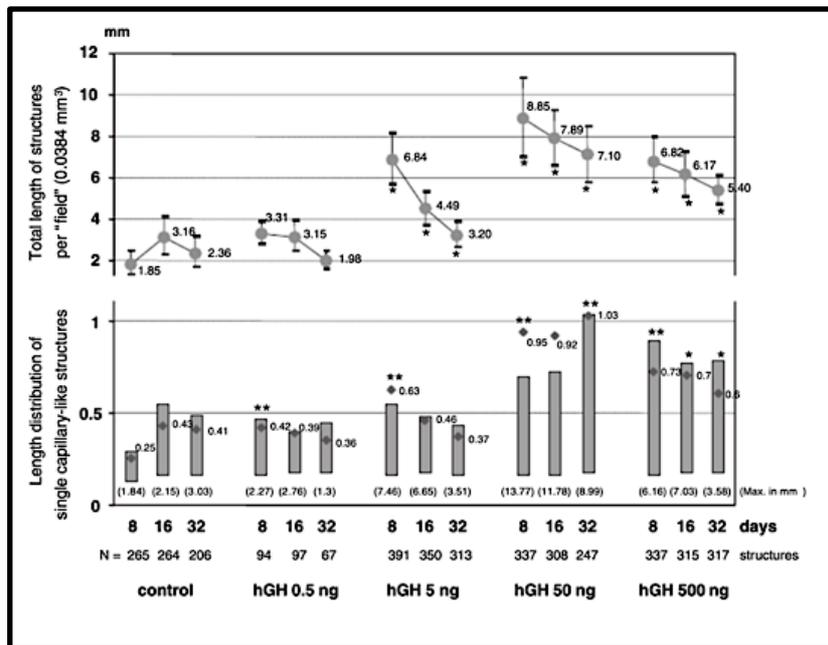


Figura 14. Efecto de la dosis de GH sobre la formación de capilares por parte de CEs en cultivo. Las líneas con círculos grises denotan la longitud total resumida de las estructuras capilares por "tejido". Las barras muestran la desviación estándar para n = 36 medidas (excepto el grupo de 0,5 ng: 12 medidas). En la parte inferior se muestra la distribución de la longitud absoluta de las estructuras individuales. Los rombos oscuros representan las longitudes medias, las columnas denotan el rango entre el primer y el tercer cuartil basado en la evaluación de las estructuras capilares. Los valores máximos están en el fondo especificados en mm (*P < 0,05, **P < 0,001) frente al control correspondiente. (Imagen obtenida de Frerich B, Kurtz-Hoffmann J, Lindemann N. Influence of growth hormone on maintenance of capillary-like structures in an in vitro model of stromal vascular tissue - Results from morphometric analysis. *Artif Organs*. 2005;29(4):338-41. Open access)

En la figura anterior vemos el efecto de la GH en CEs en cultivo en cuanto a la formación de capilares, mayor cuanto mayor es la dosis, pero este efecto tiene un límite a partir del cual, no sólo no se aumenta el efecto, sino que se disminuye.

La concentración de GHR será la que determine la intensidad de las señales de GH, principalmente cuando se considera la vía eNOS-NO. Cuanto mayor sea el número de GHR, mayor será el efecto de la GH. No obstante, existe un límite en el que si se administra más hormona el efecto no sólo no aumenta, sino que disminuye (130,456). Es importante señalar que la propia GH controla el gen implicado en la expresión de su receptor y que esta regulación depende del tiempo y la dosis de administración de la hormona. Este hecho es importante para comprender las razones por las que la GH tiene diferentes efectos dependiendo de la dosis y para entender por qué los ensayos clínicos con la GH a veces difieren en sus resultados. Como se explicó anteriormente, la relación entre el GHR y la GH es bidireccional, ya que su dominio extracelular, la GHBP, se une a la hormona libre en sangre para controlar la cantidad de GH libre que interactúa con su receptor, pero también para regular la eliminación renal de la GH. Incluso dentro de las células, las acciones de la GH están reguladas exhaustivamente. Este es un importante concepto común a todos los factores de crecimiento que actúan en el organismo. Los efectos de la GH en la expresión del gen de su receptor parecen depender del tiempo/dosis de exposición además del tipo de célula y de si el experimento se llevó a cabo *in vivo* o *in vitro*. Sin embargo, dicha expresión génica es aún más compleja, ya que también se ve influida por otros factores como la ingesta nutricional, los esteroides o la diabetes mellitus. Además, el gen GHR tiene múltiples exones 5' no traducidos que están controlados por múltiples promotores, lo que demuestra la complejidad y la alta calidad de la regulación de la expresión genética de este receptor (457).

Lo que aquí vemos es trascendental para entender la razón por la que, en aquellos ensayos clínicos donde se usan dosis muy altas de GH, pueden obtenerse resultados no significativos o incluso empeorar la situación clínica que se pretende mejorar. Todo ello se debe al mecanismo de regulación de GHR a nivel celular para protegerse de la propia GH mediante mecanismos de internalización a nivel de las caveolas (381) y otros múltiples mecanismos comentados como el de la fragmentación de la GH para inactivarla por vasoinhibinas (274).

Por otro lado, muchos son los artículos que abordan los factores reguladores de la neovascularización, pero muy pocos de estos artículos se centran en el papel tan importante que juega el equilibrio redox en la misma. No obstante, recientemente, se han publicado importantes conocimientos sobre la forma en que el equilibrio redox podría regular la homeostasis y el crecimiento y remodelación vasculares. Si bien, como se ha comentado, se pensaba que las ROS siempre tenían un efecto deletéreo en la homeostasis vascular, actualmente, la evidencia acumulada muestra cómo esta concepción no es completamente cierta, ya que pequeñas cantidades de ROS participan en una buena homeostasis estimulando muchas vías de señalización como ha sido expuesto.

Una importante fuente de ROS producida en las CEs y CMLs vasculares proviene de las enzimas catalíticas NOX, que se encuentran ubicuamente distribuidas en las tres capas de los vasos asociadas a estructuras como el retículo endoplásmico, las mitocondrias o el núcleo, siendo la mitocondria una de las localizaciones más relevantes para su ubicación, lo cual tendrá que ver con la cadena respiratoria. NOX4 es la isoforma dominante y se cree que mantiene una generación de ROS basal. La NOX4 está altamente expresada en células bajo estrés, como sucede en condiciones isquémicas o tumorales. Esta enzima jugará un papel importante en la regulación de los factores de crecimiento angiogénicos como el VEGF, ya que la inhibición de la producción de NOX y/o ROS mitocondrial disminuye la expresión de este factor (162). (Figura 15)

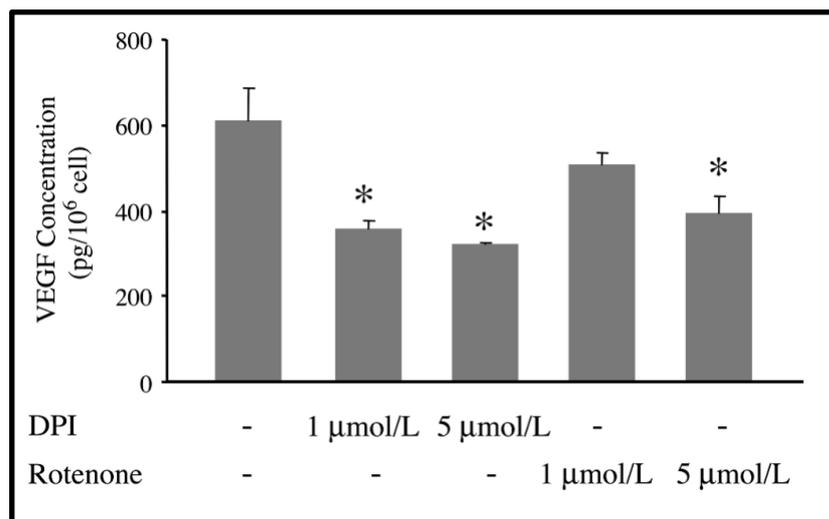


Figura 15. Cultivo de células OVCAR-3 (ovarian carcinoma), que fueron tratadas con DPI (diphenylene iodonium), un inhibidor de la NOX, y rotenona, un inhibidor de la cadena de electrones mitocondrial, a las concentraciones indicadas durante 16 h. Se analizaron los niveles de proteína del VEGF por ELISA. Los datos se presentan en forma de picogramos de proteína VEGF por cada 10⁶ células de seis experimentos de replicación. *P < 0,05, diferencia significativa cuando se comparó el valor del tratamiento con el del control. Al disminuir el estrés oxidativo basal de dichas células por cualquiera de las dos sustancias indicadas, la producción de VEGF disminuye también de forma significativa, siendo el efecto dependiente de la dosis. (Imagen obtenida con permiso de Xia, C. et al. Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* 2007; 67:10823-10830)

Como se ha comentado, el ión superóxido producido por NOX inactiva el NO procedente de eNOS, y esta bajada en las concentraciones de NO estimula la eNOS, incrementado su actividad.

Se ha venido defendiendo cómo la GH es una molécula de señalización que regula la proliferación, diferenciación y metabolismo de las células mediante la activación de receptores específicos de superficie celular y el subsiguiente desencadenamiento de vías de transducción de señales. Esto se asocia con la internalización del complejo GHR/GH y la acumulación de GH en varios compartimentos subcelulares, incluyendo las mitocondrias. Para evaluar la relevancia funcional de dicha acumulación mitocondrial, primero se demostró la captación de GH por esta organela, la cual se producía tan pronto como 10 minutos después de la inyección de la GH marcada con yodo 125 (GH-I⁽¹²⁵⁾) en la rata. La densidad inmunorreactiva de la GH marcada dentro de las mitocondrias aumentó después de la incubación de la hormona in vitro, sin que se modificara el patrón de distribución submitocondrial. Por medio de microscopía electrónica fue confirmada la presencia de GH en el espacio intermembranoso y en la membrana interior de la mitocondria, lo que sugiere la participación de la GH en el control de la respiración celular. Ensayos polarográficos y espectrofotométricos en mitocondrias aisladas apuntaron a un efecto directo, selectivo y dependiente de la dosis de GH en la inhibición de las actividades de enzimas como la succinato deshidrogenasa y la citocromo oxidasa (458). En conjunto, estos datos muestran que la GH es conducida dentro de las mitocondrias, donde opera con un efecto directo. Además, la polarografía y el análisis de

microscopía de fluorescencia de excitación de fotones mostraron que el box 1 del dominio intracelular del GHR parece necesario para una activación de la respiración mitocondrial en respuesta a una exposición a la GH. Sin embargo, las células que carecen del box 1 en el GHR pueden internalizar igualmente la hormona de manera eficiente. Esto es debido a que el fenómeno de internalización también se produce a otros niveles como en las caveolas, siendo así capaces de regular el efecto mitocondrial de la GH. Así pues, la vía caveolar parece esencial para dirigir el complejo GHR/GH a las mitocondrias (459).

Habiendo establecido algunas bases de la GH en la angiogénesis y en el equilibrio redox, hablaremos ahora de algunas ideas interesantes en el entorno clínico de los pacientes con isquemia severa de miembros inferiores tratados con GH en el estudio GHAS. En dichos pacientes, se tomaron muestras de músculo de la pantorrilla de forma basal, antes del inicio del tratamiento, y final, justo después de 8 semanas de tratamiento. Después de analizar la expresión del ARNm de algunos genes relacionados con la angiogénesis, los datos moleculares arrojaron unos resultados sorprendentes. En el grupo tratado con GH hubo, efectivamente, un aumento en el nivel de eNOS en comparación con los datos basales, pero, de forma curiosa, este aumento fue menor que aquel detectado en los pacientes tratados con placebo. Este fue un resultado extraño y completamente inesperado para nuestro grupo. La primera explicación que dimos fue que habría un error en algún punto, porque si GH aumenta eNOS y su actividad, esto no tenía sentido, y porque además, como veremos en la publicación del año anterior, al hacer un primer análisis con 14 pacientes, efectivamente obtuvimos un aumento significativo de eNOS, lo cual nos alentaba a seguir con el estudio (12). Sin embargo, empezamos a entender los resultados cuando observamos una disminución significativa paralela de los niveles de NOX4 en el grupo de GH en comparación con el placebo. Esto significaba que la actividad de eNOS depende en gran medida del equilibrio redox en el músculo isquémico, o, más aún, que el crecimiento de los vasos sanguíneos dependía en gran medida del estrés redox, y que la GH, al corregir el estrés, estaba reduciendo las señales que estimulan la formación de eNOS. Por ello, sólo en el grupo placebo siguió habiendo un aumento significativo de eNOS, porque en este grupo el estrés persistía (Figura 16). Por tanto, el siguiente paso necesario fue buscar apoyo científico para estos resultados.

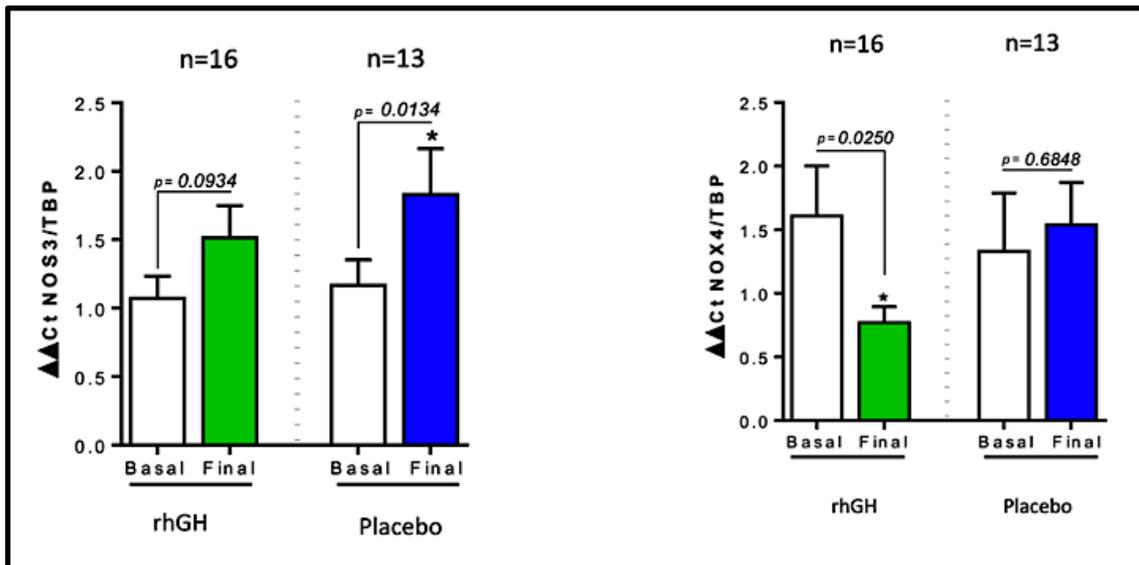


Figura 16. Gráfico de barras representativo de los niveles de ARNm de eNOS y NOX4 (NADPH oxidasa 4) detectados en muestras de músculo sóleo de la pierna isquémica en el estudio GHAS. Comparación entre los grupos tratamiento o rhGH y placebo. * $P < 0,05$; rhGH: recombinant human Growth Hormone. Basal: pretratamiento; Final: tras 8 semanas de tratamiento. NOS3: eNOS. La estadística realizada es el test de Wilcoxon para muestras pareadas y no paramétricas (test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov). (Imagen obtenida del estudio GHAS)

Tal y como se ha demostrado en un modelo de isquemia mesentérica en ratas, a medida que el flujo arteriogénico aumenta, eNOS se regula a la baja, y, además, este fenómeno es proporcional a la tasa de aumento del flujo. Esto significa que conforme el flujo se recupera, disminuyen la hipoxia y el distrés oxidativo, y estas señales dejan de estimular la producción de eNOS. Como primera hipótesis, la GH, estimulando la neoangiogénesis, estaría emulando la recuperación mediada por el flujo, y podría estar aumentando el flujo en las áreas musculares isquémicas, y, por tanto, disminuyendo eNOS porque se necesita menos (460). Sin embargo, esta hipótesis quedaba incompleta. (Figura 17)

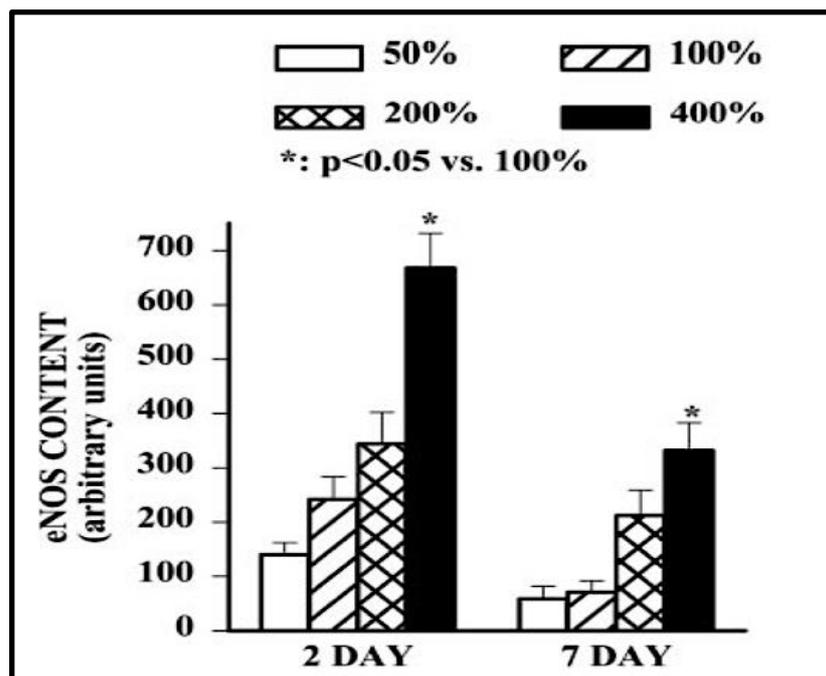


Figura 17. Representación del contenido medio de eNOS en arterias del mesenterio en un modelo animal de isquemia en el día 2 y 7 del proceso isquémico (n = 8 animales). La tinción específica de la eNOS se localiza en el endotelio dentro de las arterias mesentéricas. Se observó un aumento significativo del contenido de eNOS en la mayoría de los vasos, tanto a los 2 como a los 7 días postisquemia, lo cual fue confirmado con la tinción Western blot. Conforme el fenómeno isquémico disminuye y el flujo aumenta, es menos necesaria la eNOS, y, por tanto, disminuye su concentración respecto al día 2. *P<0,05; %: porcentaje de unidades de perfusión microvascular (número de microvasos estudiados). (Imagen obtenida con permiso de Unthank J, Haas TL, Miller S. Impact of shear level and cardiovascular risk factors on bioavailable nitric oxide and outward vascular remodeling in mesenteric arteries. In: Schaper W, Deindl E, editors. Arteriogenesis-Molecular Regulation, Pathophysiology and Therapeutics I. Aachen, Germany: Shaker Verlag Publishing; 2011. p. 89-119)

Echemos un vistazo, ahora, al siguiente estudio. La Figura 18 muestra como, en modelos de isquemia en ratas jóvenes y añosas, ambos tipos de animales responden de manera similar, pero con diferencias significativas en cuanto a la intensidad de la respuesta, lo que significa que, aunque no perdemos la capacidad de regeneración vascular con el envejecimiento, ésta disminuye a medida que envejecemos, lo que traduce una menor producción de factores de crecimiento esenciales para este proceso con la senescencia (460).

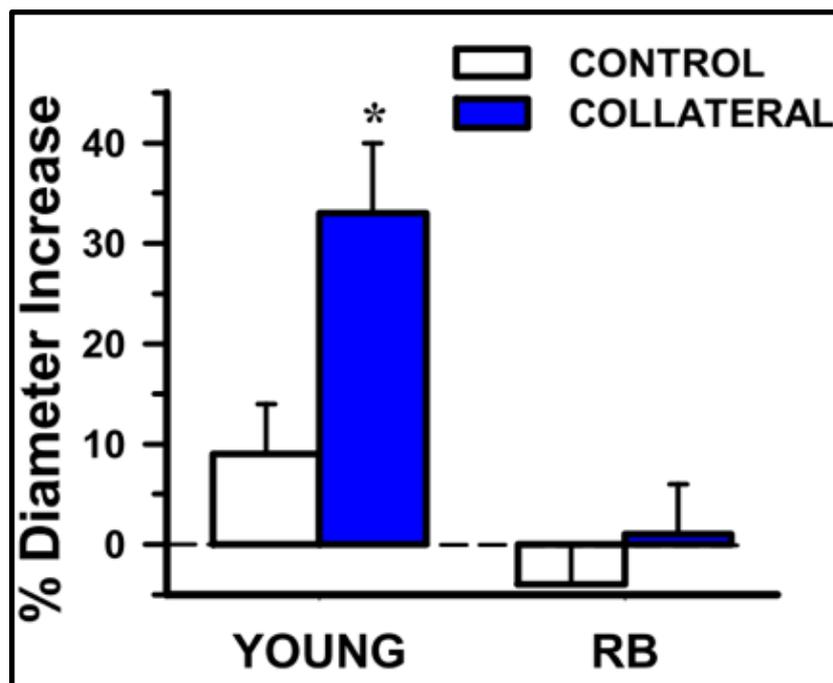


Figura 18. Porcentaje de cambio de diámetro en las arterias de control y colaterales de ratas Wistar jóvenes (Young) y añosas (RB) a los 7 días de la creación del modelo isquémico. RB: retired breeder. *P<0,05. (Imagen obtenida con permiso de Unthank J, Haas TL, Miller S. Impact of shear level and cardiovascular risk factors on bioavailable nitric oxide and outward vascular remodeling in mesenteric arteries. In: Schaper W, Deindl E, editors. Arteriogenesis- Molecular Regulation, Patophysiology and Therapeutics I. Aachen, Germany: Shaker Verlag Publishing; 2011. p. 89-119)

Por tanto, desde este punto de vista, se apoya el hecho de que la población anciana de pacientes del estudio GHAS, puede responder a la isquemia, pero de forma pobre.

En la siguiente, Figura 19, se muestra una interesante perspectiva sobre la producción de NO de forma secundaria al distrés oxidativo producido por peróxido. En ratas jóvenes (WKY) e hipertensas (SHR) podemos ver que la producción de NO está incrementada de forma basal en aquellas que sufren hipertensión, lo que significa que los factores de riesgo cardiovascular, y en concreto la hipertensión, aumentan la producción de NO desde las células vasculares, y, curiosamente, cuando aumentamos el estrés oxidativo añadiendo peróxido a estas células, el NO sólo se incrementa en ratas jóvenes y sanas de forma dosis-dependiente, pero no en las hipertensas. Esto apoya, por un lado, la importancia del estrés oxidativo en la homeostasis y la regeneración vascular, y por otro, el hecho de que dicho estrés está elevado en los pacientes isquémicos del estudio GHAS, añosos, sometidos a múltiples factores de riesgo cardiovascular, además del insulto hipoxémico (460). El otro elemento interesante es que estos pacientes parecen estar en el máximo de producción de NO debido a todas las circunstancias anteriores.

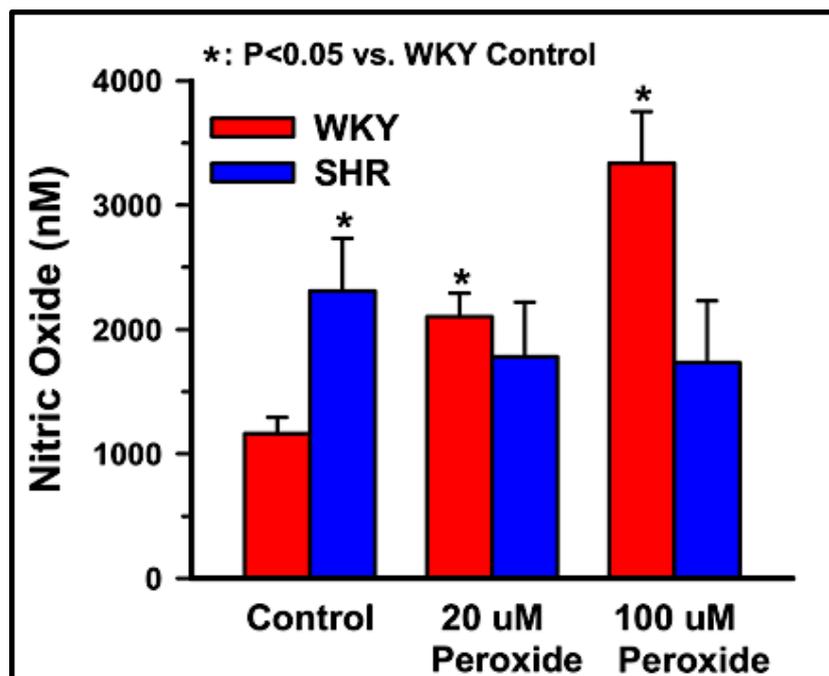


Figura 19. Efecto del H₂O₂ tópico en la concentración de NO periarterial bajo condiciones normales de flujo en ratas jóvenes (WKY) e hipertensas (SHR). El NO se incrementa en una concentración dependiente del H₂O₂ en la rata WKY pero no en la SHR. WKY (Wistar Kyoto Young); SHR (Spontaneously Hypertensive Rats). *P<0,05. (Imagen obtenida con permiso de Unthank J, Haas TL, Miller S. Impact of shear level and cardiovascular risk factors on bioavailable nitric oxide and outward vascular remodeling in mesenteric arteries. In: Schaper W, Deindl E, editors. Arteriogenesis- Molecular Regulation, Patophysiology and Therapeutics I. Aachen, Germany: Shaker Verlag Publishing; 2011. p. 89-119)

Efectivamente, si comparamos ratas jóvenes, hipertensas y de edad avanzada y observamos diferentes concentraciones de NO de forma basal, al añadir moléculas antioxidantes, curiosamente, esta concentración baja, incluso en ratas sanas, lo que significa que los sujetos sanos están sometidos a pequeñas cantidades de estrés oxidativo, y que este elemento tiene un papel crucial en la homeostasis vascular (460). Si medimos ahora el crecimiento vascular en ratas isquémicas, éste mejora simplemente administrando antioxidantes, mejor cuando los administramos antes de la isquemia, traduciendo un posible beneficio preventivo de la terapia antioxidante (460). Sin embargo, en los ensayos clínicos con estos fármacos, no se han obtenido los mismos resultados tan claros, aunque hay que considerar que las arterias ateroscleróticas de los pacientes isquémicos están muy afectadas, especialmente en pacientes diabéticos. Además, la dosis y el momento en que se deben administrar tienen que ser estudiados adecuadamente. No obstante, como se ha descrito, parece que el beneficio máximo se obtiene cuando se dan antes del proceso isquémico, no tras el mismo con la enfermedad ya instaurada. Luego, podemos concluir, que el beneficio de la terapia antioxidante es debido a la disminución de la oxidación, lo cual traduce un incremento del NO efectivo. Veamos ahora lo que pasa cuando administramos GH a CE en cultivo, con relación a la expresión del gen eNOS, y también su proteína. En la Figura 20 se evidencia cómo dichos elementos aumentan, también de manera dependiente de la dosis, pero con diferencias en

cuanto al patrón: cuanto más alta sea la dosis, más pronto se alcanza el pico de eNOS, pero más rápido desaparece el efecto. Este hecho vuelve a poner de manifiesto la importancia de la dosis en la acción de la GH (279), pero sobre todo nos demuestra que la GH puede tener una actividad neovascularizadora dependiente de contexto, lo cual apoya los datos del estudio GHAS.

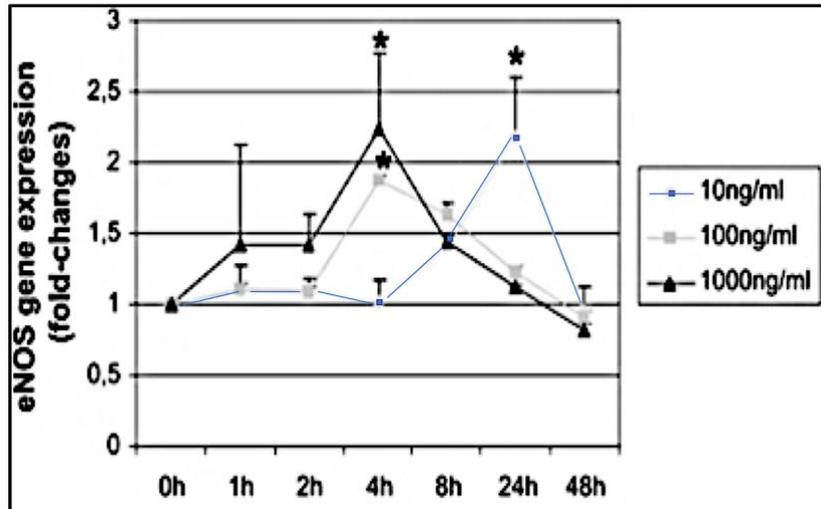


Figura 20. Análisis semicuantitativo de RT-PCR de la expresión génica de eNOS. Los datos representan el promedio \pm DE de n=3 cultivos diferentes con aproximadamente 2 millones de células por plato de cultivo. *P<0.05. (Imagen obtenida de Thum T, Tsikas D, Frölich JC, Borlak J. Growth hormone induces eNOS expression and nitric oxide release in a cultured human endothelial cell line. FEBS Lett. 2003;555(3):567-7. Open Access)

A continuación, analizaremos lo que sucede con las ROS y la GH. Como podemos ver en la Figura 21, después de la administración de la hormona, las ROS se reducen tanto a las 4h como a las 24h, pero sólo para dosis específicas de GH, en este caso para las dosis más altas utilizadas en este estudio (279). En CEs en cultivo, es curioso que pequeñas concentraciones de GH pueden elevar ligeramente los ROS, mientras que concentraciones más altas los disminuyen. Esto es consistente con diferentes efectos que puede producir la GH autocrina o local y la GH endocrina o exógena.

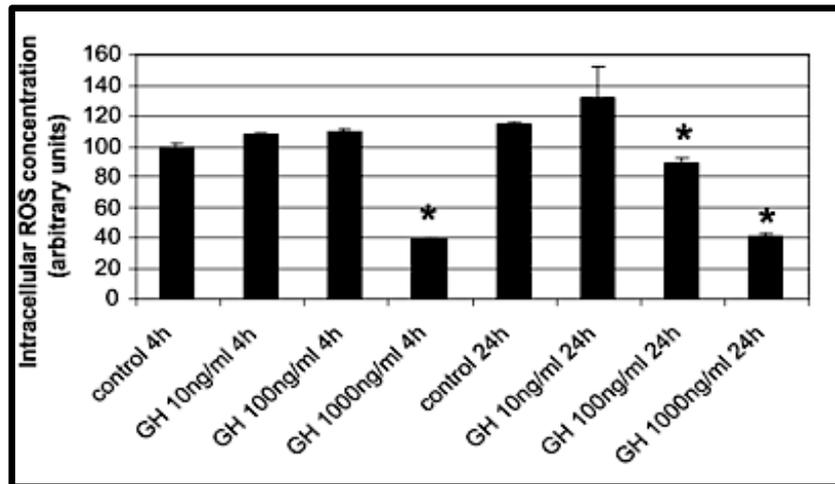


Figura 21. Producción de ROS intracelulares en CEs EAhy926 control y tratadas con GH (10 a 1000 ng/ml, a las 4 y 24 h). *P<0.05. (Imagen obtenida de Thum T, Tsikas D, Frölich JC, Borlak J. Growth hormone induces eNOS expression and nitric oxide release in a cultured human endothelial cell line. *FEBS Lett.* 2003;555(3):567-71. Open access)

Por tanto, la GH no sólo afecta a la concentración de eNOS y NO, sino también modifica la producción de ROS según el microambiente que encuentre y la dosis que se administre. Este fenómeno también se ha descrito a nivel clínico en adultos con deficiencia de GH, en los que se ha detectado un aumento del estrés oxidativo. Después de la terapia de reemplazo con GH, el nivel de radicales libres disminuye (409).

En resumen, el proceso isquémico promueve un aumento de ROS y NO, lo cual es consistente con lo publicado (461,462). Sin embargo, el problema es que este NO es rápidamente inactivado por el exceso de radicales libres secundarios al proceso isquémico, principalmente ión superóxido, produciendo lo que se ha venido denominando una insensibilidad al NO. Es decir, se produce NO, pero no es efectivo porque gran parte del mismo es inactivado para dar peroxinitritos (ver Figura 2). Este hecho es muy importante, ya que indica que hay una insensibilidad al NO en lugar de un agotamiento real del mismo o de la eNOS en pacientes con isquemia periférica (460), y este hallazgo coincide perfectamente con el alto distrés oxidativo encontrado por otros autores en humanos y animales con esta condición (463–465).

En el estudio GHAS, los pacientes bajo placebo mantuvieron un alto nivel de estrés oxidativo secundario al proceso isquémico, lo cual puede adivinarse por la elevación de la NOX4 en el tiempo, y, por ende, de eNOS, en sus músculos, tratando de compensar la disminución de la biodisponibilidad del NO rápidamente inactivado por las ROS. La administración de GH detuvo este círculo vicioso, disminuyendo el desequilibrio redox y también aumentando la biodisponibilidad del NO, sin la necesidad de un aumento significativo de eNOS ni de su actividad.

Efectivamente, se ha descrito cómo NOX4 está aumentada en situaciones de distrés celular, como cuando se incrementa el SS, ante hipoxemia, o cuando existe una elevación de citoquinas inflamatorias como el TNF- α (247). En este sentido, la GH tendría un efecto dual, actuando como antioxidante y antiinflamatorio. Aunque estos tipos de terapias no han sido convenientemente probadas de forma específica en los pacientes con EAP,

existen evidencias experimentales que sugieren que dicho tipo de estrategias podrían tener éxito en estos pacientes (462).

Sin embargo, GH, además de este posible efecto dual, también podría incrementar neovascularización, tal y como se ha expuesto, y trataremos de mostrarlo con otros hallazgos moleculares. Así es, curiosamente, en el grupo GH del estudio GHAS también encontramos un aumento significativo paralelo de los niveles de ARNm del receptor 2 de VEGF o VEGFR2, también llamado KDR o Flk-1, en comparación con el grupo placebo (Figura 22). ¿Qué significado tiene esto? Como será analizado, este hallazgo es un fuerte soporte a las acciones neovascularizadoras de la GH. Para entender la magnitud del hallazgo, deberemos explicar primero cuál es el papel o, mejor dicho, los papeles que juega este receptor trascendental para las acciones del VEGF.

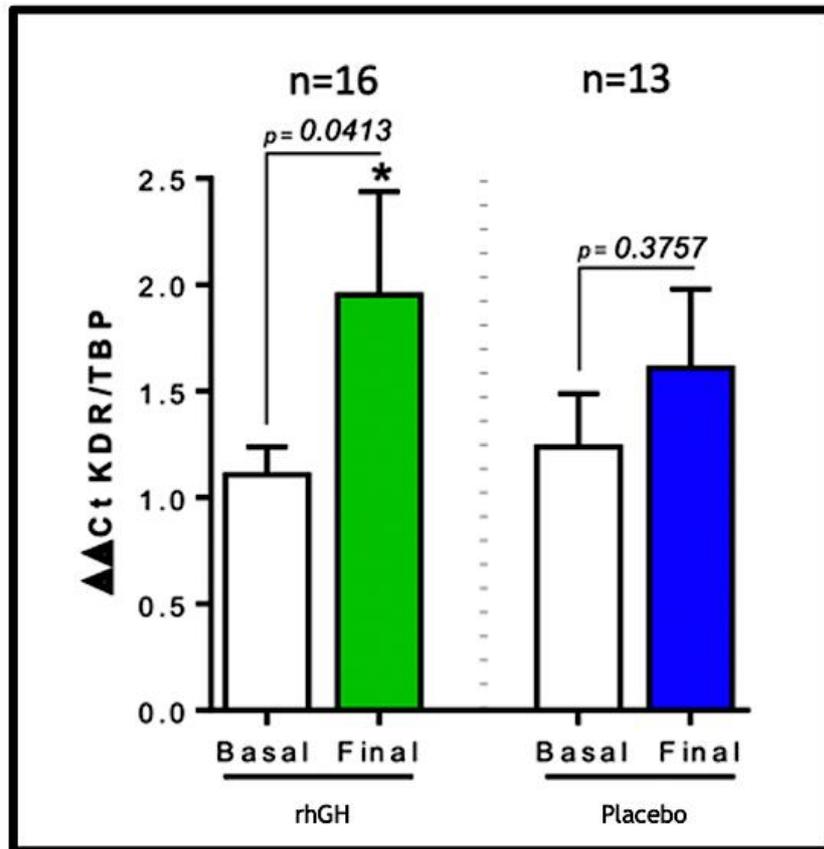


Figura 22. Gráfico de barras representativo de los niveles de ARNm del receptor 2 del VEGF o KDR detectados en muestras de músculo sóleo de la pierna isquémica en el estudio GHAS. Comparación entre el grupo tratamiento o rhGH y el grupo placebo. * $P < 0,05$; rhGH (recombinant human Growth Hormone). La estadística realizada es el test de Wilcoxon para muestras pareadas y no paramétricas (test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov). (Imagen obtenida del estudio GHAS)

En primer lugar, el receptor KDR es un receptor tipo tirosina-quinasa que media la mayoría de los efectos del VEGF relacionados con la permeabilidad celular, la supervivencia, la mitogénesis, o la activación de eNOS, siendo de crucial importancia, por tanto, en sus acciones neovascularizadoras.

Desde el punto de vista de la angiogénesis, este receptor se ha localizado principalmente en el endotelio vascular, tanto en células Tip como Stalk. La distinción de dichos fenotipos de CE es claro sólo cuando se produce angiogénesis. Tal y como se ha descrito en este trabajo, la integrina $\alpha v \beta 3$ tiene un papel clave en la dirección de migración de las CEs que migran para formar neovasos. Precisamente, esta integrina se une al KDR potenciando la acción del VEGF y diciéndole dónde tiene que actuar (139). Este receptor parece ser crucial para la generación de EPCs, las cuales portan el KDR en su superficie. En este sentido, también se ha visto un papel importante durante la vasculogénesis, pues el complejo formado por la unión del KDR y neutropina 1 (VEGFR2-NP-1) es el que permite dar la identidad a la CE, que se especializará en arterial o venosa según se asocie o no a la NP-1, respectivamente (238).

Por tanto, para la angiogénesis, KDR es un marcador indirecto de la presencia y acción de EPCs y VEGF. Como se comentó, la concentración de dicho receptor es fundamental para determinar las acciones de la CE Tip o Stalk, y, en consecuencia, la acción del VEGF (203).

Se ha descrito también cómo este receptor media la actividad de la molécula Klotho en la regulación de VEGF sobre la permeabilidad vascular, ya que klotho parece ser necesario para esta acción de VEGF, estando mediada por KDR (466).

Desde el punto de vista de la arteriogénesis, el KDR se ha relacionado con el proceso inflamatorio que facilita la remodelación vascular, encaminada a incrementar el tamaño del vaso colateral. Por un lado, participa en el aumento de la producción de factor Von Willebrand (VWF) por la CE, facilitando además su función reguladora del proceso inflamatorio arteriogénico. Por otro, media el reclutamiento de leucocitos por el ARN extracelular (ARNe) producido por la CE ante el incremento del SS. Por tanto, participa activamente en la mecanotransducción. De hecho, cuando se bloquea este receptor, el ARNe o el VWF disminuyen los agregados de plaquetas y neutrófilos esenciales para iniciar arteriogénesis. El ARNe secretado por la CE es un mediador crítico para la mecanotransducción, induciendo el VWF. Ambas acciones son mediadas por KDR (467). Efectivamente, ha sido descrito cómo el proceso inflamatorio arteriogénico es gobernado por el sistema inmune innato, destacando el papel de neutrófilos y mastocitos. Los primeros, una vez en la pared vascular, proceso facilitado por la liberación del factor SDF-1 por la plaqueta, liberan ROS, que activan a su vez a los mastocitos, también atraídos hacia la pared vascular por el SDF-1. Serán los mastocitos activados de la pared vascular los que favorezcan y promuevan el proceso inflamatorio que conduce al incremento del tamaño del vaso colateral (468). Como vemos, en todo este complejo proceso el KDR es una pieza clave, siendo además identificado en los propios mastocitos, los cuales secretan VEGF con actividad auto/paracrina (469).

Pero además de todo lo expuesto, el KDR participa también en un complejo junto a la PECAM-1 y la VE-cadherina a nivel de las uniones intercelulares, siendo de vital importancia para la activación de vías de señalización celular dependientes de SS, entre ellas la vía Pi3K/Akt y eNOS (2).

Por tanto, el KDR es fundamental para múltiples tareas del VEGF y para la mecanotransducción en relación con los procesos de neovascularización. Si GH aumenta este receptor de forma significativa, claramente estaría facilitando estos procesos. Además, como se describe en este artículo, GH también incrementa VEGF y SDF-1, por tanto, potenciando aún más su rol en el proceso neovascularizador. En estas circunstancias, es necesario preguntarse si ésta es una labor de simple ayuda al VEGF, o

si, por el contrario, podría tratarse de un efecto directo de la GH sobre el receptor KDR, algo que por el momento no ha sido probado. No obstante, no es descabellado pensarlo, ya que, como es sabido, GH no sólo estimula su receptor, sino también otros receptores como los de PRL.

En el estudio GHAS, sin embargo, no pudimos confirmar ningún cambio en los niveles de ARNm de VEGF en las muestras obtenidas. Como tampoco observamos ningún aumento significativo de niveles de ARNm de IGF-I a este nivel (Figura 23). ¿Tiene alguna explicación todo esto? Nosotros creemos que sí.

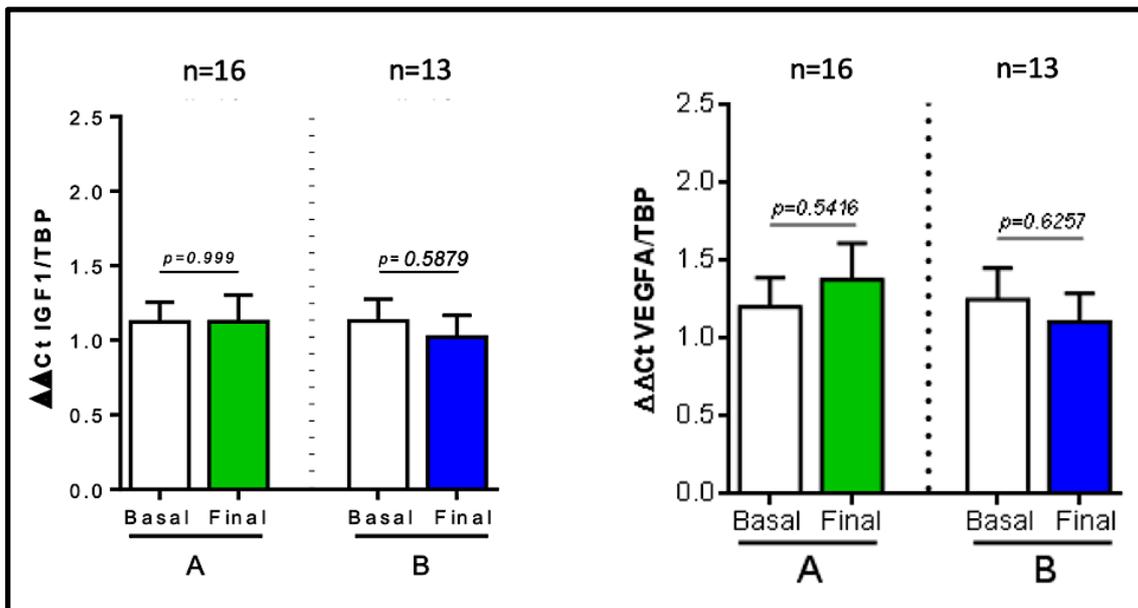


Figura 23. Gráfico de barras representativo de los niveles de ARNm de IGF-I y VEGF detectados en muestras de músculo esquelético isquémico. Comparación entre el grupo tratamiento o rhGH (A) y el grupo placebo (B). *P<0,05; rhGH (recombinant human Growth Hormone). La estadística realizada es el test de Wilcoxon para muestras pareadas y no paramétricas (test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov). (Imagen obtenida del estudio GHAS)

En el caso de IGF-I, como se ha venido defendiendo, no todas las acciones de GH están mediadas por este mediador. De hecho, la mayoría de las acciones de la GH en la CE son directas, sin ningún aumento en la expresión de IGF-I, aunque esta afirmación podría ser no del todo correcta, tal y como se ha discutido con anterioridad. En paralelo con esto, tampoco detectamos en nuestro estudio un aumento de niveles de IGF-I en plasma (29). Ha de se aclarado que, primero, tenemos una ventana de 2 meses en la que no sabemos qué ha pasado, ya que no hay mediciones intermedias. Además, se mide ARNm, y no proteína ni receptores de IGF-I. Por tanto, no se pueden establecer certezas absolutas sobre la hipótesis de que se trate de un efecto directo de la GH en la pared vascular. El caso de la ausencia de incremento del VEGF podría tener una explicación más lógica, y para ello, hay que mirar la Figura 24.

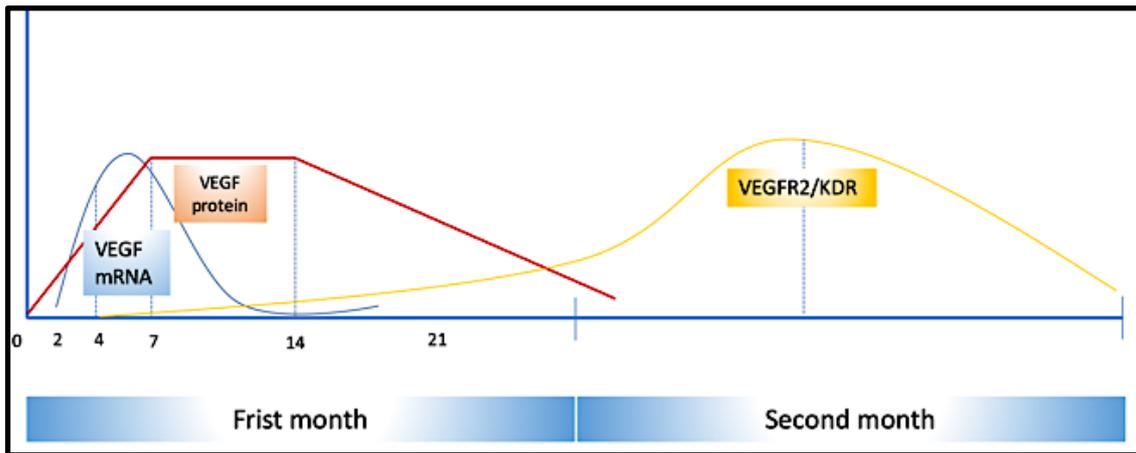


Figura 24. Representación ideal de la distribución del ARNm y proteína del VEGF y de su receptor VEGFR/KDR en función del tiempo, obtenida de la información de varios estudios experimentales tras estimulación con factores de crecimiento con conocida acción sobre esta molécula.

Esta es una figura que representa el patrón de secreción de VEGF en sus tres facciones: ARNm, proteína y receptor 2. Se trata de un gráfico ideal construido con la información publicada en múltiples estudios experimentales sobre el VEGF y su receptor (184,249,284,470,471). Como podemos ver, las primeras dos semanas de isquemia están dominadas por la producción del ARNm y la expresión de la proteína del VEGF, mientras que no es hasta el segundo mes cuando se incrementa de forma significativa su receptor. Por lo tanto, sabiendo que el ARNm de VEGF disminuye después de la estimulación, con niveles muy bajos dentro del primer mes (284,472), y dado el hecho de que, en el ensayo GHAS, se obtuvieron las muestras finales al final del segundo mes, es fácil entender que, simplemente, dichas muestras han sido tomadas cuando los niveles de este factor ya habían disminuido, pasando por alto cualquier posible elevación producida durante el mes anterior. Además, cabe señalar que, mientras que en la isquemia aguda tanto el VEGF como su receptor se expresan de manera difusa en el músculo afectado, en el entorno crónico ambos elementos se restringen a las zonas atróficas y de regeneración, lo que sugiere una vía autocrina que puede promover la supervivencia y la regeneración, pero que hace más difícil encontrar datos significativos. Este hecho podría ser el responsable de los resultados heterogéneos publicados en diferentes estudios clínicos hasta la fecha. Estos datos son consistentes con un estudio en ratas en colgajos cutáneos tratados con rhGH para comprobar su mayor viabilidad (471). En dicho estudio se muestra un incremento de flujo en el colgajo cutáneo en el grupo GH respecto a control, que es especialmente significativo a partir del día 7. En este estudio, también se midieron los niveles de ARNm y proteína de VEGF en el momento basal y a los 14 días, así como la IL-6 y TNF- α . Efectivamente, la administración de GH disminuyó los biomarcadores inflamatorios IL-6 y TNF- α a los 14 días, lo que es consistente con la disminución del TNF- α en el ensayo GHAS, mientras que aumentó los niveles de ARNm de VEGF y CD34 en el mismo período de tiempo, lo que también es consistente con la hipótesis antes mencionada sobre el posible aumento de GH y VEGF no detectado en el ensayo GHAS. Ambos cambios tradujeron el aumento del flujo sanguíneo comentado. Por tanto, estos datos apoyan una acción de GH en el contexto de la hipoxia isquémica dependiente de VEGF, mientras que la hipótesis de la acción directa de GH sobre KDR aún no está confirmada. Aunque en el ámbito de los pacientes con deficiencia de GH del adulto no se

ha observado una disminución significativa de IL-6 y TNF- α con la terapia de reemplazo hormonal (410), como se ha aclarado, no son exactamente los mismos procesos, y ha habido cambios en cuanto al manejo de dichos pacientes desde el punto de vista de la dosificación de la hormona que pueden influir en los resultados.

El paso siguiente en un ensayo clínico de estas características sería comprobar si estos resultados moleculares tienen alguna traducción clínica, y la respuesta es un sí rotundo, ya que en el estudio GHAS hemos podido ver una mejora significativa del flujo medido por presión en el tobillo, de la cicatrización de heridas y de la detección de neovasos en la arteriografía y SPECT- MIBI. Todos estos resultados se encuentran en fase de análisis y no han sido aún publicados. Sin embargo, ello no nos impide mostrar algunos datos. Algunos de ellos se mostrarán a continuación, y, otros, más adelante cuando hablemos de GH y cicatrización de heridas. En la Figura 25, podemos observar un SPECT-MIBI y la fotopletoptimografía (PPG) de un paciente diabético con isquemia crítica que ya fue publicado (12), donde se demuestra un incremento de flujo medido por dicha prueba, y confirmado por la PPG.

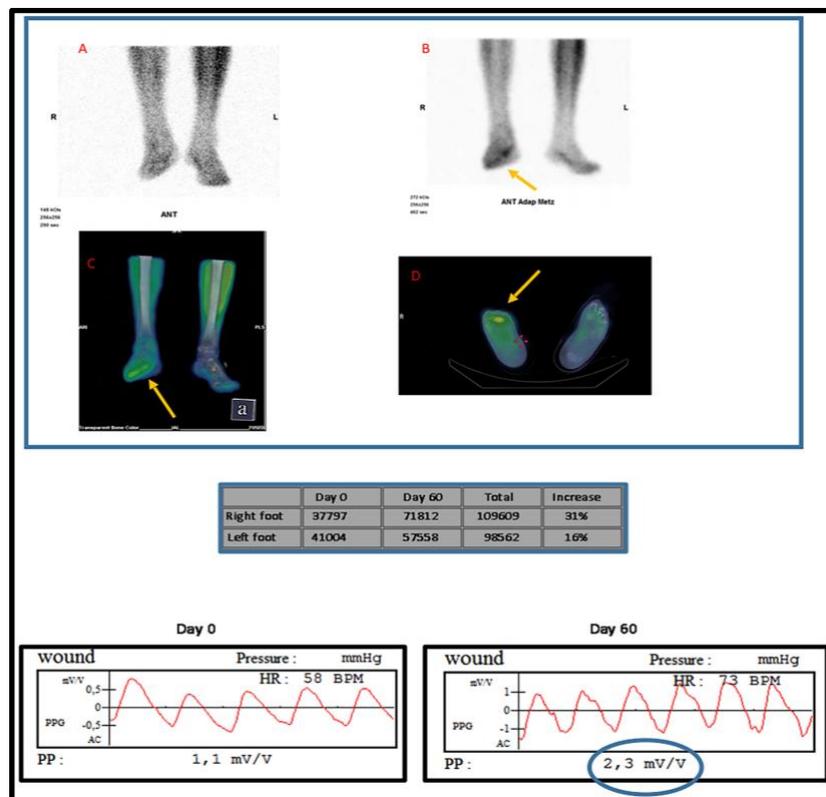


Figura 25. Arriba: Tomografía por emisión de fotones simples (SPECT) usando como radiotrazador el metoxi isobutil isonitrilo (MIBI) en un paciente con isquemia crítica de miembro inferior derecho bajo tratamiento con GH. A: estudio basal. B, C, D: estudio final tras tratamiento. Centro (E): Estudio cuantitativo del SPECT-MIBI en ambos miembros inferiores de forma pre y postratamiento. Abajo: estudio fotopletoptimográfico (PPG) en el mismo paciente de forma basal (F) y final (G). Obsérvese el incremento de flujo detectado por el radiotrazador (flechas), lo cual concuerda con el incremento detectado en el análisis cuantitativo (día 60) respecto al pie contralateral, y con el aumento del flujo capilar en la herida de dicho pie (imagen ovalada azul) detectado por PPG. (Imagen obtenida del estudio GHAS)

Por último, es importante señalar, tal y como se hace en este artículo, las principales limitaciones de este ensayo clínico. Aunque se trata de un estudio aleatorio y controlado por placebo, este es un estudio piloto, con un tamaño de muestra pequeño y sin doble ciego, aunque con enmascaramiento. La GH se usó a dosis bajas estandarizadas para pacientes de edad avanzada para disminuir en lo posible la posibilidad de efectos secundarios. Además, la administración sistémica de GH puede implicar una menor concentración en las áreas isquémicas, por lo que nos preguntamos si sería mejor la perfusión directa en el área isquémica (en este sentido hay estudios que hablan de un mayor efecto de la GH cuando se concentra en el foco problema, como parece ser el caso de la GH aplicada tópicamente en heridas para cicatrización). Finalmente, dos muestras de músculo separadas dos meses llevan a la pérdida de información en el intervalo de tiempo intermedio.

Como resumen de este trabajo diríamos que:

-El exceso de inflamación y ROS, característicos de los procesos de hipoxemia isquémica, inactivan las acciones del NO.

-El estrés redox es un regulador clave del crecimiento y remodelación vascular, y, por lo tanto, de la neovascularización. Sin embargo, en exceso o crónicamente elevado es deletéreo.

- La GH parece regular dinámicamente el balance redox y la inflamación en pacientes con isquemia periférica como se ha visto a través de sus acciones sobre NOX4 y TNF- α .

-El papel angiogénico de la GH parece estar mediado, al menos, por el receptor KDR.

Por otra parte, y en conclusión sobre este estudio, el estudio GHAS supone un salto del laboratorio al escenario clínico isquémico para la GH, y sus resultados deben ser confirmados en un ensayo clínico de mayor tamaño muestral. Este estudio es el primero llevado a cabo en el hombre para el uso clínico de la rhGH en pacientes que sufren isquemia crítica de las extremidades sin opción de revascularización y alto riesgo de pérdida de extremidad. Sin embargo, la dosis, los intervalos de tratamiento y la mejor forma de administración deben establecerse adecuadamente.

En este artículo, también publicamos información relevante sobre otros aspectos importantes, como el papel de GH e IGF-I en la mecanotransducción de señales SS; la relación de GH y MSCs; la estrecha relación de GH y Klotho; la relación de GH con la MEC, o el interesante papel que GH y midkine pueden jugar en la angiogénesis. Dado que algunas de estas relaciones serán analizadas en los artículos que se exponen más adelante, sólo comentaremos dos de los aspectos expuestos: el primero y el último.

Es interesante cómo muchos trabajos se han centrado en el papel del SS en el desarrollo de las colaterales en la isquemia de miembros inferiores. Desde el momento en que los investigadores fueron conscientes de que, a diferencia de la angiogénesis, donde el estímulo desencadenador era la hipoxia generada a nivel distal de la oclusión vascular, en la arteriogénesis, debía ser otro el estímulo desencadenador, ya que dichas colaterales se desarrollaban en el muslo donde no había hipoxia, todos los esfuerzos se dirigieron hacia comprender cómo actuaban los vasos ante la nueva situación en la que todo el flujo era redirigido hacia las colaterales, que, por tanto, eran ahora sometidas a una situación de mayor estrés de cizallamiento o fuerzas mecánicas, el fluid shear stress (FSS).

Mucho se ha publicado desde entonces sobre este tema, pero siempre ha quedado un poco en el aire, cuál o cuales eran los mitógenos implicados en este proceso activados por el FSS. Ciertamente, aunque algunos estudios experimentales realizados en animales con distintos modelos de hipertensión arterial o sobrecarga de volumen observaban un

incremento de IGF-I y de receptores de GH en la pared de los vasos sometidos a la presión, dichos trabajos han pasado desapercibidos. Efectivamente, algunas hormonas producidas localmente deben jugar y parecen jugar un papel crucial en la mecanotransducción, o conversión de señales mecánicas en biológicas. Como se ha comentado, tanto la GH como el IGF-I son producidos por las CEs y CMLs, además de estar asociadas a la MEC. Dichas hormonas parecen ser liberadas ante cambios de presión o sobrecarga de volumen, tanto en el sistema arterial como venoso. En su trabajo experimental, Wickman y colaboradores demostraron un incremento de la expresión génica tanto del GHR como de IGF-I en aorta y vena cava, incremento producido rápidamente ya en la primera semana, y paralelo al crecimiento muscular de la pared de dichos vasos (25). Hemos de recordar que en el endotelio vascular existe una concentración especialmente alta de receptores para GH e IGF-I (25,473,474), especialmente en aorta y grandes vasos, y que, por tanto, deben cumplir un importante papel. Estos datos también fueron consistentes con otro trabajo realizado en modelos animales de coartación aórtica, donde también se observó un incremento rápido e importante en la producción de IGF-I que acompañaba a un aumento de CMLs (475). Esto también está en consonancia con la variación de la producción de IGF-I ante distintas sobrecargas de la pared vascular de la arteria femoral (476), y con el hecho de que la producción de IGF-I en CMLs está mediada por otros factores de crecimiento, entre otros el PDGF, uno de los mitógeno más importantes conocidos de la pared vascular, y la GH (477).

En la aorta torácica de ratas jóvenes, Bruel y colaboradores demostraron cómo la administración de GH a dosis fisiológicas producía cambios en la pared arterial consistentes en un aumento de fibras de colágeno tipo I, aumentado el ratio de colágeno I/III, y aumentado su dureza, pero exclusivamente en zonas sometidas a alta carga (478). Sin embargo, no hallaron lo mismo en ratas añosas, en las que, aunque aumentó también el citado ratio, no se observaron cambios en las propiedades mecánicas de la aorta (479), probablemente debido a que no se usaron dosis fisiológicas sino dosis de GH muy altas y durante mucho tiempo (80 días) en esta población, o a que se produjeron anticuerpos anti-GH tras 3-4 semanas de tratamiento que pudieron afectar a su función.

Por tanto, los genes que se activan mediante SS ponen en marcha un mecanismo de respuesta de defensa, respuesta compuesta por un incremento de producción local de hormonas como GH e IGF-I, entre otros factores.

Por último, sólo subrayar la intrigante relación que se hipotetiza que puede haber entre midkine (MDK) y GH. MDK es un factor de crecimiento unido a heparina, descubierto por primera vez durante la embriogénesis de ratones (480), siendo expresado por las células madre embrionarias, con un papel bien documentado en su supervivencia (481). Esta proteína es también expresada por una variedad de células en condiciones fisiológicas y patológicas (especialmente en células tumorales). Por el contrario, en un estudio se sugirió que MDK se expresa sólo en líneas de células tumorales, pero no en células normales derivadas de la sangre (482).

Aunque MDK se ha estudiado principalmente en líneas de angiogénesis tumoral inducido por la hipoxia, también se ha demostrado que esta molécula está implicada en la angiogénesis inducida por la hipoxia en contextos no neoplásicos como la isquemia de los tejidos normales, ya que la hipoxia aumenta las concentraciones de dicha proteína principalmente en neutrófilos, monocitos y células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVECs). En un modelo de isquemia de miembros inferiores, la respuesta

angiogénica estuvo casi completamente ausente en ratones con deficiencia de MDK, mientras que los animales de control mostraron una respuesta angiogénica correcta. Estos resultados identificaron a las CEs como la fuente principal de MDK soluble en el sistema vascular durante la hipoxia, y definieron a MDK como un actor fundamental de la angiogénesis durante la isquemia en el tejido no maligno (483). MDK parece controlar la capacidad de biodistribución plasmática del VEGF, que a su vez está relacionada con la expresión de eNOS y, eventualmente, con la angiogénesis (484).

Esta molécula también se ha relacionado con la GH, ya que se ha detectado la expresión de MDK y sus receptores en células somatotropas de ratas, tanto embrionarias como adultas, favoreciendo el desarrollo de la glándula pituitaria y actuando como regulador de su función en los adultos (485). La relación entre ambas es, por el momento, meramente especulativa, basada en que ambas moléculas tienen efectos similares sobre eNOS y VEGF, ambas son segregadas por la CE, y MDK estimula GH en la pituitaria. Dado el hecho de que no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de MDK, se ha hipotetizado que dicho factor de crecimiento podría promover indirectamente la vasodilatación al aumentar la biodisponibilidad de GH en las CEs (484). Sin embargo, esta hipótesis aún no está probada y necesita confirmación.



**ESTUDIO 2. EFECTO DE LA GH SOBRE LA PERFUSIÓN DE
FLUJO MEDIDO POR FOTOPLETISMOGRAFÍA (PPG)
EN UN MODELO MURINO DE ISQUEMIA
DE MIEMBROS INFERIORES.
ANÁLISIS DE DISTINTOS MODELOS
DE ISQUEMIA ANIMAL**

Artículo 2. Caicedo Valdés D, Devesa Peleteiro P, Pazos González A, Romero Vázquez L, Martínez Pérez M, Arce Vázquez VM, et al. Evaluación de la reperfusión tras angiogénesis terapéutica con fotopletismografía en un modelo murino de isquemia de miembros inferiores. *Angiología*. 2019;71(4):127–34.DOI: 10.20960/angiologia.00002

URL: <https://www.revistaangiologia.es/articles/00002/show>

Este es otro artículo original que forma parte de una serie de experimentos dentro de esta tesis que intentan evaluar el efecto neovascularizador de la GH con distintos métodos, como la fotopletismografía (PPG), método sencillo y económico escasamente usado en estudios de experimentación en angiogénesis.

En este artículo, no sólo se evaluó la capacidad angiogénica de GH medida por PPG, sino también desde el punto de vista clínico, usando escalas de valoración clínica y funcional de la pata isquémica del animal similares a las previamente publicadas por otros autores (486,487). Este artículo es novedoso porque aporta el valor de la PPG como método indirecto de valoración de la reperfusión tras angiogénesis terapéutica en un modelo murino de isquemia periférica, comparando además dos modelos de isquemia diferentes, lo cual no ha sido previamente realizado desde el punto de vista del uso de la PPG.

En este trabajo experimental se usaron ratas Sprague Dawley (SD). Como puede verse en la Figura 26, primero se compararon modelos de isquemia para ver su repercusión con PPG y decidir cuál era el modelo más adecuado para usar. Esto es debido a que una gran variedad de los mismos es usada en la literatura, sin previamente haber testado su rentabilidad, facilitando así resultados heterogéneos e incomparables (488). Para ello, se establecieron dos modelos básicos de isquemia, uno simple (imagen B, Figura 26), o con ligadura-sección del sector fémoro-poplíteo-safeno, incluyendo colaterales (tronco pudiendo-epigástrico, circunfleja femoral y epigástrica superficial caudal), y otro doble (imagen A, Figura 26), con ligadura-sección del sector ilíaco-fémoro-poplíteo-safeno, incluyendo las mismas colaterales y, además, la arteria ilíaca interna.

Si miramos ahora las ondas PPG que aparecen debajo de los esquemas quirúrgicos, vemos que se observa un patrón normal de ondas en ambas patas (A1 y A2). En B, se observa una amortiguación de la onda, que aparece prácticamente plana (B2), por la isquemia, respecto a la pata contralateral no isquémica (B1), común a ambos modelos, ya que se trata del momento justo después de la creación isquémica. C y D representan la recuperación a los 30 días en ambos modelos de isquemia: modelo doble (C2) y simple (D2). Como se observa en dicha figura, la recuperación a los 30 días es mucho menor en el modelo doble, siendo este el elegido como modelo de isquemia para nuestro experimento, ya que el hecho de que dicha recuperación sea menor y más tardía nos aporta más tiempo para que la molécula angiogénica pueda ser correctamente evaluada frente a la recuperación fisiológica, que es muy rápida en la rata.

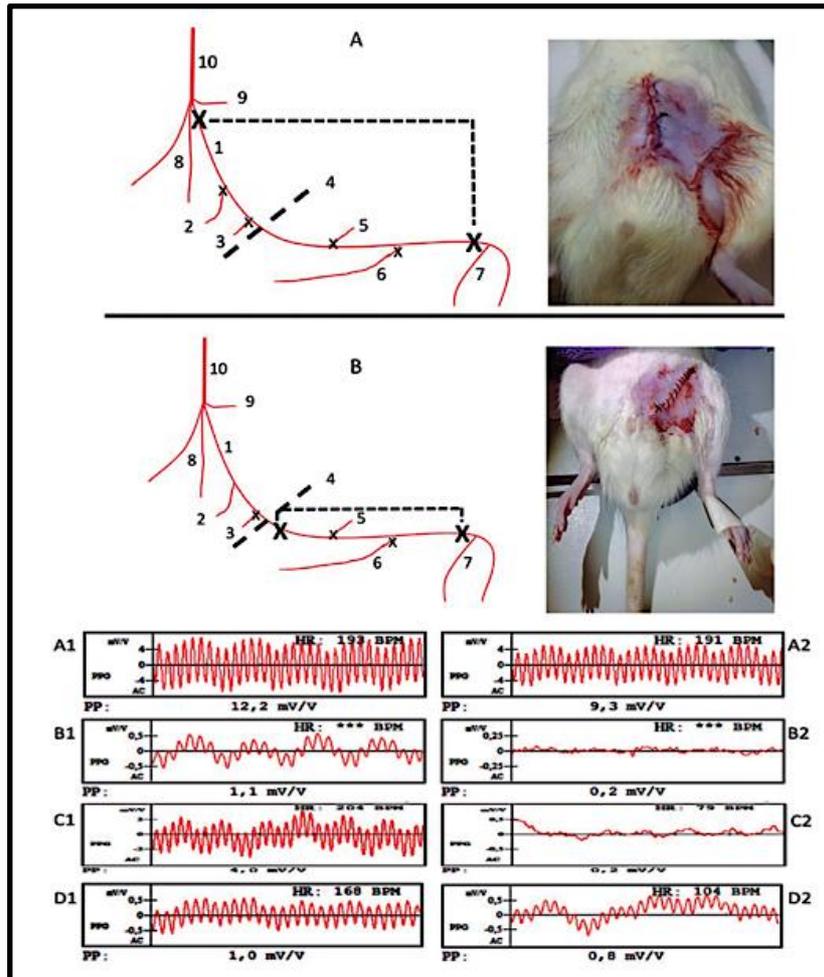


Figura 26. Arriba: Esquema quirúrgico de los modelos de isquemia animal. A. Modelo de isquemia doble. B. Modelo de isquemia simple. La línea discontinua larga representa el sector arterial extirpado. 1: a. iliaca común; 2: a. iliaca interna; 3: tronco epigástrico-pudendo; 4: ligamento inguinal; 5: a. circunfleja femoral lateral; 6: a. epigástrica superficial caudal; 7: aa. poplítea y safena; 8: a. caudal medial; 9: a. lumbar; 10: aorta. Abajo: Registro de ondas PPG y su recuperación en cada modelo en comparación con la pata contralateral. C2: recuperación en modelo de isquemia doble; D2: recuperación en el modelo de isquemia simple. (Imagen obtenida de Caicedo Valdés D, Devesa Peleteiro P, Pazos González A, Romero Vázquez L, Martínez Pérez M, Arce Vázquez VM, et al. Evaluación de la reperusión tras angiogénesis terapéutica con fotopletismografía en un modelo murino de isquemia de miembros inferiores. *Angiología*. 2019;71(4):127-34)

El siguiente paso, una vez elegido el modelo de isquemia, fue determinar la variabilidad de medidas PPG entre animales. Para ello, dichos valores se representaron en un gráfico de dispersión donde se compararon las medidas de pulsatilidad pata-pata sin isquemia en 16 animales del estudio. Este supone un paso importante para dar validez a dicho test diagnóstico, ya que la existencia de una dispersión significativa invalidaría su utilidad. Se pudo ver que la mayoría de las mediciones se concentraban en torno a la línea central, exceptuando algunos valores extremos o outliers. Se estudió el grado de correlación entre dichos valores basales de pulsatilidad aplicando el test de correlación de Pearson, mostrando una correlación significativa positiva de 0,9 (0,74-0,97, IC 95%, $p < 0,001$).

Por tanto, aunque existía variabilidad basal, el alto grado de correlación de valores pata-pata en los distintos animales, establecía que la prueba era fiable.

Así pues, ya teníamos una prueba fiable y un modelo de isquemia elegido. Ahora restaba ver si la PPG era capaz de mostrar diferencias de flujo, aunque fueran mínimas, entre animales con isquemia tratados con GH y aquellos tratados con placebo. Para ello se utilizó rhGH: Genotonorm miniquick 0,4 mg, Pfizer®, en un volumen total de 0,04 ml de una dilución 1/10 de dicho fármaco (dosis total 15 µg/día/30 días). La administración se hizo por vía s.c. a las 9:00 h para hacerla coincidir con el pico fisiológico del animal, que es el inverso al del ser humano. El suero salino se administró al mismo volumen. Lo que vimos fue lo siguiente (Figura 27):

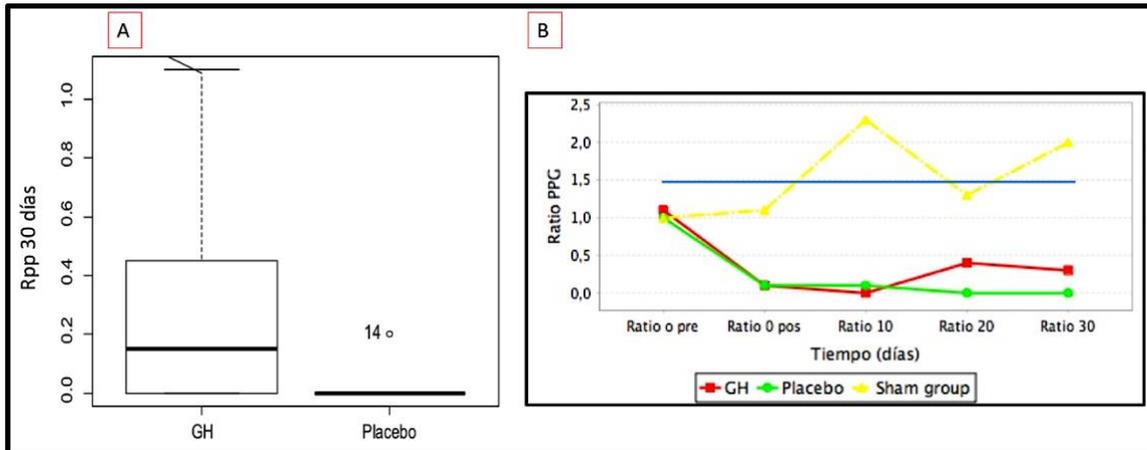


Figura 27. Izquierda(A): Diagrama de cajas que muestra el cociente pata/pata (rpp) medio alcanzado al final del tratamiento en el grupo GH y placebo. Derecha (B): Evolución gráfica durante en el periodo de 30 días de ambos grupos. La línea azul representa la media del rpp medio del grupo sham, con gran variabilidad. El test estadístico utilizado fue: para variables cualitativas, test Chi-cuadrado; para variables cuantitativas, mediante t de Student. (Imagen obtenida de Caicedo Valdés D, Devesa Peleteiro P, Pazos González A, Romero Vázquez L, Martínez Pérez M, Arce Vázquez VM, et al. Evaluación de la reperusión tras angiogénesis terapéutica con fotopletismografía en un modelo murino de isquemia de miembros inferiores. *Angiología*. 2019;71(4):127-34)

Como vemos en ambos gráficos, efectivamente parece que las ratas tratadas con la GH muestran una tendencia mayor a la recuperación medida mediante la PPG usando el valor del cociente pata-pata (rpp) como herramienta. Se midió dicho cociente en el momento basal, pre y poscirugía, así como a los 10, 20 y 30 días. Tal y como se observa en el gráfico de la derecha, las curvas comienzan a separarse a partir del día 10, con una recuperación mayor en las ratas GH. Observemos ahora el gráfico de la izquierda, que representa un diagrama de cajas donde se puede ver el mismo fenómeno, pero con la información añadida de la variabilidad de efectos en el grupo GH. Así pues, aunque la media de recuperación no es aparentemente muy elevada, sí que vemos animales con una recuperación muy importante. Por tanto, a pesar de ser los mismos animales, estos muestran variabilidad en la respuesta a GH. En este sentido, dos elementos deben ser destacados para explicar este fenómeno. Por un lado, el escaso número de animales usado, que repercute en la significación de la prueba; por otro, y el más importante bajo nuestro punto de vista, el modelo de isquemia utilizado no fue exactamente el mismo en todos los animales, ya que el grupo GH sufrió un modelo más agresivo por una mayor presencia de la ligadura de la arteria epigástrica superficial caudal (7/8 animales en el grupo GH vs 3/6

en el grupo placebo). Esto implica que el grupo de ratas bajo tratamiento con GH fue tratado en condiciones de mayor severidad de la isquemia.

El objetivo primario de este estudio fue realizar una evaluación de la PPG como método válido y fiable para valorar angiogénesis y recuperación angiogénica, no determinar si la GH producía o no un efecto significativo, que de hecho no alcanzó por las razones comentadas en el párrafo anterior. Por tanto, las deficiencias metodológicas detectadas, no afectan al objetivo primario de este trabajo, aunque sí a la valoración de la GH como angiogénico. El hecho de que tuviéramos que presentar este artículo con apremio por exigencias de la beca otorgada, y de quedarnos sin presupuesto para poder acabarlo con un mayor número de animales, hizo que, finalmente, renunciáramos a la segunda parte del objetivo. No obstante, dicho beneficio, también se intuyó en varios parámetros usados. La relación entre variables cualitativas fue evaluada por test Chi-cuadrado y la de las variables cuantitativas, mediante t de Student. Al final del tratamiento (T30), el 62,5% de las ratas tratadas con GH experimentaron una recuperación significativa de la perfusión medida por PPG, frente a un 20% en el grupo placebo ($p = 0,086$). Además, existieron diferencias en el grado de recuperación, ya que mientras en el grupo GH el porcentaje medio de recuperación de la onda fue de un 45%, en el grupo placebo fue de tan solo un 15,8%. También se compararon los valores de rpp basales poscirugía (T0-pos) y finales (T30) para cada uno de los grupos. Mientras que la recuperación media del rpp en los animales GH fue de 0,30 mv/v (0-1,1, $p = 0,097$), en el grupo placebo fue de 0,03 mv/v (0-0,2, $p = 0,81$).

Las escalas clínica y funcional de valoración del daño isquémico también mostraron una mayor tendencia a una respuesta positiva en el grupo GH. Así, el 87,5% de los animales con GH se quedaron en escalas clínicas del 1 al 4 frente a un 66,6% en el grupo placebo. Por otro lado, mientras que en el grupo GH el 12,5% padeció una afectación grave de la perfusión (grado 5), en el grupo placebo ello ocurrió en el 33,3% de los animales ($p = 0,35$). Según la escala funcional, el 71,4% de los animales que recibieron GH tuvieron un daño menos severo (escala 0-2), frente a un 25% de los que recibieron placebo, mientras que el daño funcional grave tan solo apareció en el 28,8% de los tratados con GH, y en el 75% de los tratados con placebo ($p = 0,24$). Las características de cada escala aparecen descritas en el artículo que presentamos.

Como conclusión, este estudio experimental presenta limitaciones metodológicas importantes que lo invalidan para estudiar el beneficio real de la GH en isquemia animal, pero no afectan al objetivo primario de validar la PPG. En la discusión se advierten varios elementos a tener en cuenta si se usa esta prueba, como es el revisar los registros para eliminar posibles fallos de determinación automática de pulsatilidad, típicos con frecuencias cardíacas lentas del animal y en la reperfusión, en la que el patrón oscilante de la misma hace calcular de forma errónea la pulsatilidad, por lo que siempre hay que observar las características de la onda. A diferencia de la onda de PPG en la práctica clínica en humanos, en el animal, debido a su alta frecuencia cardíaca en reposo, no se observa el dicrotismo con claridad, aunque se pueden apreciar el resto de características: presencia o no de la onda, simetría, altura o pulsatilidad. No obstante, el resultado de pulsatilidad no debe ser considerado como una medida objetiva de la cantidad de flujo, sino más bien como una medida relativa y sin unidades del estado de perfusión cutánea. En el animal, la morfología típica de la onda de PPG es en v invertida. El utilizar la pata contralateral como testigo de normalidad para la comparación es fundamental, debido a la gran variabilidad, tanto de pulsatilidad como de patrones normales de la onda.

En la revisión bibliográfica no se encontraron artículos recientes que valorasen el valor de la PPG en estas circunstancias, sin embargo, su validez ha sido previamente contrastada con la flujometría por láser doppler (489).

Por otra parte, no se debe obviar la posibilidad del efecto que puede tener la isquemia de la pata afecta en la pata normal por mecanismos no bien conocidos como el reflejo venoarteriolar (490). Aunque se aconseja realizar las pruebas hemodinámicas con vasodilatación máxima tras ejercicio en el treadmill (491,492), esta opción quedó descartada desde el inicio tras comprobar que había una gran influencia del comportamiento del animal a la hora de correr en la cinta, así como por el dolor de la cirugía misma, motivando que unos animales corrieran y otros no. En estas circunstancias, debe señalarse que la realización de la PPG en reposo podría pasar por alto la influencia sobre la perfusión del tono adrenérgico cuando se toman determinaciones seriadas (492). Por tanto, todas las pruebas que miden flujo microcirculatorio deben ser interpretadas en conjunto con otros datos, y no de forma aislada.



**ESTUDIO 3. REVISIÓN SISTEMÁTICA SOBRE LAS
ACCIONES DE LA GH EN EL SISTEMA
CARDIOVASCULAR. DATOS MOLECULARES
PRELIMINARES DEL ESTUDIO GHAS**

Artículo 3. Caicedo D, Díaz O, Devesa P, Devesa J. Growth Hormone (GH) and Cardiovascular System. Int J Mol Sci. 2018 Jan 18;19(1):290.DOI: 10.3390/ijms19010290

Url: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/1/290>



Este es un artículo íntegramente de revisión sobre GH y sistema cardiovascular. El objetivo con este trabajo era resaltar las evidencias de la acción de la GH en la homeostasis y en la enfermedad vascular, no sólo a nivel periférico, sino también a nivel cardíaco.

Gran parte de las ideas expresadas en este artículo, han sido resaltadas en la extensa introducción de esta tesis, por lo que intentaremos resaltar aquellos aspectos poco aclarados o novedosos.

En este trabajo, realizado antes de obtener los resultados del estudio GHAS y de haber terminado el estudio experimental, ya adelantábamos los posibles beneficios de la GH en los vasos sanguíneos mediante la acción de la hormona sobre el equilibrio redox y la disfunción endotelial asociados a los estados de hipoxia isquémica, algo de lo que hemos profundizado con anterioridad. Son de destacar algunos aspectos aquí señalados. Por ejemplo, que la disfunción endotelial no sólo se localiza en las arterias principales, sino también en la microcirculación del músculo esquelético (493). Los pacientes con EAP sufren un síndrome constante de isquemia-reperusión mientras caminan y descansan, generando ROS que afectan a las fibras musculares (494), y pueden perjudicar la función mitocondrial reduciendo la producción energética (495,496). De hecho, se han encontrado niveles más altos de carbonilo y de 4-hidroxi-2-nonenal, dos biomarcadores consolidados de estrés oxidativo, el primero procedente de las proteínas, y el segundo de los lípidos (497), en muestras de músculo de la pantorrilla de pacientes con claudicación, lo que indica el mayor estrés oxidativo (498). Estos ROS contribuyen a la disfunción endotelial y a la alteración de las proteínas en el músculo esquelético, y pueden conducir a una lesión del ADN mitocondrial a largo plazo (499). Esta lesión del ADN mitocondrial también se observa en las extremidades aparentemente sanas de los pacientes con EAP unilateral, lo que sugiere que la EAP no es sólo un problema local, sino más bien sistémico (500). Las vías mitocondriales son vulnerables a las lesiones de los radicales libres (501), y los pacientes con EAP muestran una reducción de actividades de los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial (502). Estas observaciones sugieren que la actividad de la cadena de transporte de electrones se ve afectada en la EAP, probablemente debido a la lesión de isquemia-reperusión y a la vejez, que favorece la lesión oxidativa y la disfunción metabólica. Los niveles de lactato están también elevados significativamente en el músculo esquelético que abarca el territorio de una arteria periférica ocluida, debido a la oxidación anaeróbica de la glucosa (503). En este punto, es interesante recordar que la GH es un protector mitocondrial (458,504), por lo que, en este artículo sugeríamos que la hormona podría desempeñar un papel positivo en los pacientes con EAP. Este papel se veía reforzado por los hallazgos del estudio GREAT, ensayo realizado en pacientes japoneses adultos con deficiencia de GH. Tras 6 meses de tratamiento con la hormona, ésta redujo significativamente los metabolitos plasmáticos de oxígeno diacrónico reactivo, otro biomarcador redox, y mejoró la función endotelial medida por el índice de hiperemia reactiva (505).

También informamos de cómo la GH podría actuar, igualmente, sobre la enfermedad arterial coronaria y la insuficiencia cardíaca, mejorando el rendimiento ventricular e induciendo un proceso de neovascularización que finalmente aumentase el flujo en los tejidos isquémicos. En relación al papel de la hormona en la insuficiencia cardíaca, tal y como se ha subrayado en esta tesis, existe una verdadera depleción hormonal múltiple en muchos de estos pacientes, especialmente del eje GH/IGF-I. Dichos pacientes con insuficiencia cardíaca y depleción hormonal parecen tener peor pronóstico, lo cual ha

originando una línea importante de investigación dentro del mundo de la cardiología que, actualmente viene representada por la escuela italiana de A. Cittadini y colaboradores, con una intensa labor de investigación, tanto experimental como clínica en este campo que llevó al desarrollo del registro TOSCA (Trattamento Ormonale dello Scompenso Cardiaco), una iniciativa multicéntrica italiana en la que participan diferentes hospitales con el objetivo de explorar el "modelo patofisiológico metabólico" de la insuficiencia cardíaca y mejorar la calidad de la atención de dichos pacientes mediante la investigación y la educación médica continua (506). Debido a que no es el foco de esta tesis, no comentaremos en profundidad el análisis relativo a este campo, remitiendo a los evaluadores de esta tesis a lo publicado dentro del artículo.

Resultan también curiosos algunos datos preliminares que se incluyeron del estudio GHAS. Estos datos preliminares, estaban formados por un cuerpo de muestras de los 16 primeros pacientes, donde parecía haber un incremento significativo de eNOS en el grupo tratamiento frente a placebo. Efectivamente, parecía existir un aumento de eNOS en el grupo GH frente a placebo, algo que no fue posible confirmar tras analizar muestras de 29 pacientes (Figura 28). Este es el ejemplo de la gran influencia del tamaño muestral en los resultados, y de cómo no tiene sentido analizar muestras antes de tiempo. No obstante, estos primeros resultados también sirvieron de aliento para continuar con un ensayo siempre dificultoso de llevar a cabo por sus características.

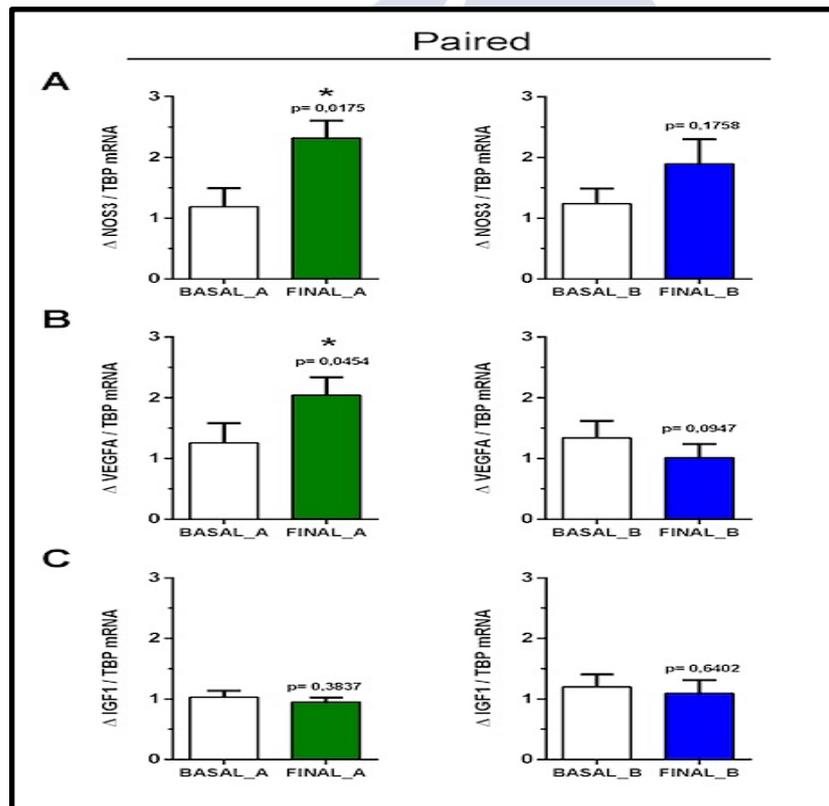


Figura 28. Gráfico de barras que muestra datos preliminares del estudio GHAS sobre niveles basales y finales de tres parámetros: ARNm de NOS3 o eNOS (A), VEGF (B) e IGF-I (C) en músculo esquelético isquémico en dos grupos: tratamiento A (GH) o B (placebo). La estadística realizada es el test de Wilcoxon para muestras pareadas y no paramétricas (test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov). (Imagen obtenida del estudio GHAS)

También analizamos el papel de Klotho, una interesante molécula fuertemente relacionada con la GH, tal y como se viene defendiendo en los últimos años. Dicha molécula es liberada por el endotelio dañado y estimula la secreción de GH pituitaria para reparar los daños (507). Efectivamente la regulación de la expresión de la GH pituitaria es muy compleja, y va más allá de los conceptos regulatorios clásicos (508). De forma relativamente reciente se han descrito numerosos factores que intervienen en dicha regulación, como son la grelina y el postulado factor antisenescencia Klotho, que es producido y liberado principalmente desde el riñón para actuar a distancia, aunque también es producido por las propias células somatotropas donde actuaría de manera auto/paracrina para regular directamente la secreción de GH (509). Klotho fue descrito por primera vez en 1997 como un producto de un gen que está involucrado en la supresión de varios fenotipos de envejecimiento en el ratón. El gen de Klotho da origen a dos transcripciones, una de ellas es una proteína de membrana, mientras que la otra es secretada y predomina sobre la primera, denominándose parte soluble o sKlotho (510,511). Los posibles efectos del Klotho en la fisiología del endotelio vascular humano se postularon por primera vez en 1998, indicando que protege el sistema cardiovascular al inducir la producción de NO endotelial (512), aunque todavía no se han aclarado los posibles mecanismos de acción (513), especulándose que es mediante GH/IGF-I. Estudios realizados en ratones demostraron que Klotho promovía un aumento del NO endotelial, tanto en aorta como en arteriolas (514), y que la administración de su gen a ratas OLETF (riesgo aterogénico múltiple) mejoraba la disfunción endotelial, aumentaba la producción de NO, reducía el aumento de la presión sanguínea y prevenía la hipertrofia de la capa media arterial, lo que significaba que Klotho es un claro regulador positivo de la función vascular (515). A pesar de estos datos, en humanos aún no hay datos claros sobre el papel fisiológico que esta hormona desempeña en el sistema cardiovascular (516). Los estudios in vitro también mostraron que Klotho suprime la expresión de TNF- α inducida por las moléculas ICAM-1 y VCAM-1 en células HUVEC, así como bloquea la fosforilación de la eNOS inducida por la administración de TNF- α (454), efectos coherentes con su papel previamente postulado en la modulación de la inflamación endotelial.

Dado que se ha demostrado que esta proteína juega un papel en la secreción de la GH de la pituitaria (509), y, probablemente, local a nivel de la CE, creemos que es importante tratar de establecer una relación entre la misma y la GH. Los ratones que no expresan Klotho mueren antes que los ratones normales, mostrando muchos síntomas de envejecimiento, la mayoría de ellos típicos de la deficiencia de GH (509). Los niveles de plasma de Klotho son bajos en los sujetos con deficiencia de GH, y los somatotropos de la pituitaria de los ratones con deficiencia de Klotho son hipotróficos (509), lo que sugiere que Klotho ejerce un efecto trófico sobre ellos. Además, Klotho inhibe fuertemente el feed-back negativo del IGF-I en la secreción de GH (517,518). Todos estos datos indican que Klotho es un regulador activo positivo de la secreción de GH, tanto en modelos animales como en humanos. Sin embargo, todavía se desconoce cómo interactúan ambas moléculas para reparar el endotelio vascular dañado. Esas supuestas relaciones entre las tres hormonas están esquematizadas en la Figura 29.

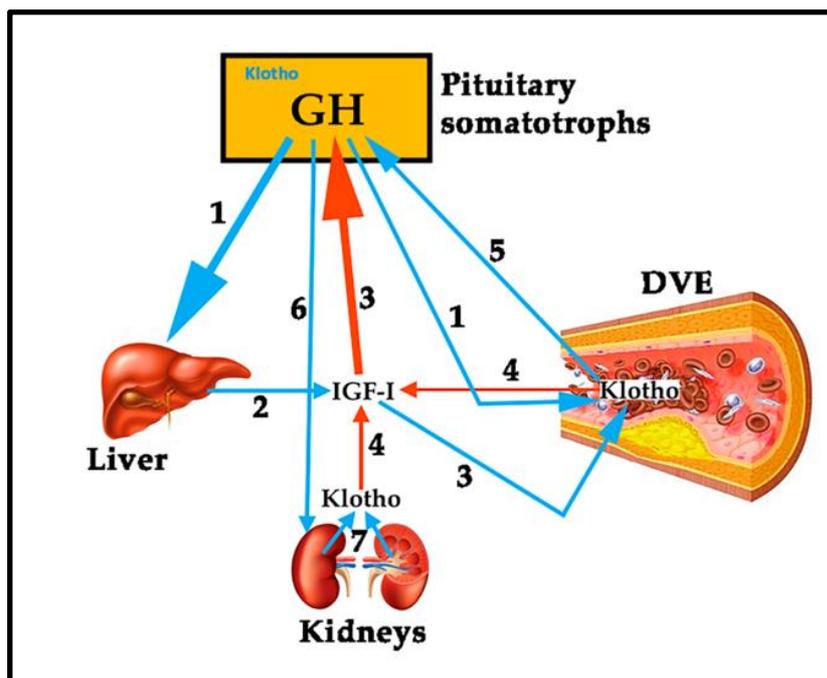


Figura 29. Esquema de regulación del eje GH/IGF-I que incluye la posible regulación por parte de Klotho (Imagen obtenida de Caicedo D, Díaz O, Devesa P, Devesa J. Growth Hormone (GH) and Cardiovascular System. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 18;19(1):290).

Se piensa que la falta de producción de Klotho en la insuficiencia renal crónica es la razón del envejecimiento y la calcificación de la pared de los vasos, incluso colaterales, y, en consecuencia, perjudica la aterosclerosis y la arteriogénesis. De hecho, los ratones que sobreexpresan Klotho tienen una mayor esperanza de vida debido, en parte, a su acción anti-IGF-I (519).

Pero también la GH parece ejercer influencias sobre los niveles de Klotho, ya que los pacientes con acromegalia muestran un aumento en los niveles de esta última molécula, los cuales disminuyen cuando se elimina el tumor (520).

Klotho parece ser necesario para el control de la acción del VEGF sobre la permeabilidad vascular de la CE, facilitando la asociación del VEGFR2/KDR y del receptor transitorio del canal 1 de calcio canónico (TRPC-1), promoviendo su cointernalización y regulando la entrada de calcio para mantener la homeostasis. Por tanto, el KDR es necesario para que Klotho lleve a cabo sus acciones (466). La GH, como se demostró anteriormente, aumenta KDR y podría colaborar con Klotho facilitando esta acción.

Para ver la complejidad de la acción de Klotho, se seleccionó un estudio en el que esta molécula parece producir diferentes respuestas de contracción o relajación de la pared vascular según la dosis y según se administre sólo o con un pretratamiento con FDG23 o fosfatos. No obstante, en ambas circunstancias, existe un aumento de ROS, por lo que el efecto vasodilatador debe estar mediado por una producción indirecta de NO procedente de eNOS y de iNOS (521). De hecho, cuando se elimina el endotelio, este efecto desaparece. Los datos anteriores apoyan nuevamente que el estrés redox contribuye a la regulación de la homeostasis vascular, y que eNOS es sensible a la producción de ROS, pero también a la concentración de Klotho. También apoya la compleja acción que tiene Klotho dependiendo de su entorno, como sucede con la GH. El otro mensaje importante

es el papel principal de las CEs en el control del tono vascular influyendo en las CMLs, y que Klotho y GH parecen colaborar en condiciones fisiológicas y patológicas como la isquemia, aunque este aspecto tiene que ser confirmado.

Otro aspecto que queríamos reseñar de este artículo es la relación de GH con las células madre mesenquimales (MSCs). Aunque las MSCs proceden en su mayoría de la médula ósea, donde fueron identificadas en el siglo pasado (522), localizadas en un nicho específico, actualmente sabemos que se pueden encontrar en prácticamente todos los tejidos adultos (523–525), en particular en el tejido adiposo, donde parecen estar ubicadas en una zona perivascular (526,527), y también en los vasos del adulto, llamándose, en este caso, células MSCs-like, con localización en la capa adventicia (528). Esto es muy importante porque dicha capa, considerada durante mucho tiempo como mero soporte del vaso por su alta resistencia, actualmente pasa a ser considerada como una parte activa del vaso, interviniendo en los procesos de regeneración vascular, ya que sus células pueden activarse en respuesta a lesiones (529–531), hipoxia (532) e hipertensión (533). En los adultos, las MSCs también se denominan células madre residentes, y constituyen una reserva de células progenitoras para reemplazar las células dañadas, ya que son capaces de diferenciarse en una amplia variedad de tipos celulares, por lo que su uso se ha defendido en las terapias de regeneración de tejidos (534).

A este respecto, debe reconocerse que el principal rol de las MSCs es la inmunomodulación hacia un microambiente más propicio para la reparación, la diferenciación real en tejido vascular y la liberación paracrina o sistémica de factores de estimulación vasculogénica, angiogénica y/o arteriogénica (528). Así es, aunque la activación de las progenitoras de la adventicia da lugar principalmente a la proliferación y diferenciación en miofibroblastos que migran a las capas internas de la pared vascular, también liberan factores paracrinos que regulan el proceso de remodelación vascular (535). Las MSCs tienen capacidad para diferenciarse en CEs en presencia del VEGF-A (536,537), un factor que desempeña un papel clave en la diferenciación y proliferación celular y en la neovascularización, como se ha señalado. Las relaciones entre la GH y el VEGF-A no se conocen bien, pero la GH desempeña un papel fundamental entre los factores que regulan la expresión génica de la familia del VEGF en los seres humanos (538). Además, la GH regula la expresión de diferentes genes implicados en la señalización Notch-1, al menos a nivel ovárico (538), y favorece el complejo Notch-1-Dll4- Jagged 1, que regula directamente la angiogénesis en el endotelio (539,540). Por lo tanto, dadas las relaciones existentes entre Notch-1, VEGF-A y GH, es presumible que la diferenciación de las MSCs en CEs para la neovascularización y la reparación del endotelio puede implicar la participación de GH.

Se ha demostrado en estudios preclínicos con células madre que, los resultados de eficacia dependen, no sólo del modelo elegido y de la capacidad de reparación endógena del tejido cardiovascular *in vivo*, sino también de la fuente de las células, la vía de administración, así como del momento de la inyección celular y de la dosis o número de células viables inyectadas (528). Las MSCs se han utilizado para tratar la isquemia de las extremidades, tanto en animales como en humanos, con un bajo nivel de beneficio hasta ahora (541–544). Para mejorar su potencial, algunos investigadores han defendido su combinación con la GH. En primer lugar, como se ha descrito, se han encontrado GHR en dichas células progenitoras (545), de tal forma que GH facilita la diferenciación y la secreción de factores de crecimiento de las mismas. Por ejemplo, se ha demostrado que las MSCs que sobreexpresan Akt mejoran sus funciones, aumentando el poder de reparación del

miocardio dañado a pesar de la infrecuente fusión o diferenciación celular (546). Las MSCs, más que producir factores de crecimiento, que también, parecen estimular la secreción de dichos factores por parte de los tejidos perilesionales (543). Este conocimiento confirma que lo más importante es estimular la secreción de factores y citoquinas desde los tejidos perilesionales, algo que parece mejorarse cuando facilitamos la sobreexpresión de la vía de Akt. La GH podría favorecer el estímulo de esta vía de señalización en las MSCs y tejidos periisquémicos. De hecho, los ratones knockout para el receptor de GH (GHRKO) han demostrado cómo las MSCs tienden a diferenciarse en adipocitos, perdiendo parcialmente su potencial, tanto en la médula ósea como en los tejidos periféricos. La vía de señalización de la catenina Wnt/ β parece aumentar cuando la GH está presente, lo que sugiere que tiene un papel en la modulación por parte de GH del destino de las MSCs (547). Este hecho también ha sido confirmado en las MSCs residentes en el hueso trabecular humano. Las MSCs medulares humanas expresan GHR y responden a la GH a través de la señalización intracelular JAK2/STAT5 (548). Estos hallazgos apoyan la idea de que la actividad de las MSCs podría ser modulada con independencia del origen de estas células y que la GH puede ser un verdadero estimulador para ellas. Así, dado que las MSCs son esenciales para la vasculogénesis, también podrían ser cruciales durante la arteriogénesis del adulto debido a la similitud entre ambos procesos, y la GH podría ser de ayuda para aumentar el potencial beneficio clínico de ambos por separado. No hay que olvidar que, además, las MSCs poseen un bajo efecto inmunogénico, incluso en modelos o pacientes con diferentes antígenos HLA, debido a los bajos niveles de expresión del HLA-I y los niveles de expresión nulos del HLA-II (549–551). Además, su utilización no parece plantear la preocupación ética que se asocia al uso de células madre embrionarias. Igualmente, los estudios de seguridad han demostrado la casi ausencia de efectos secundarios por parte de las MSCs.

**ESTUDIO 4. REVISIÓN SOBRE EL BENEFICIO DE LA GH
EN LA ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA (EAP)
PARA LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS Y LA
ARTERIOGÉNESIS**

Artículo 4. Caicedo D, Devesa P, Arce VM, Requena J, Devesa J. Chronic limb-threatening ischemia could benefit from growth hormone therapy for wound healing and limb salvage. Ther Adv Cardiovasc Dis. 2017 Dec 22;1–20.DOI: 10.1177/1753944717745494

Url: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1753944717745494>

Este artículo representa el primer estudio de revisión que pone las bases para el uso de la GH en la EAP, y que supuso los pilares del ensayo clínico y del estudio experimental. A partir de esta revisión, pusimos en marcha toda una idea que podía ser original en cuanto al manejo de los pacientes no revascularizables con isquemia crítica de las extremidades, desmarcándonos un poco del uso de la GH en corazón, y construyendo una línea pionera de investigación clínica en isquemia de miembros inferiores. Dado que algunos de los argumentos que se expresan en este artículo han sido ya comentados con anterioridad de forma pormenorizada, en este caso nos centraremos en aquellos aspectos diferenciales u originales de este artículo, como son la relación de la GH con el sistema nervioso simpático, su relación con la sustancia P, o el uso de la GH para la cicatrización de heridas, elemento muy importante en los pacientes que sufren isquemia crítica, pues la gran mayoría de ellos presentan ulceraciones difíciles de curar si no se revasculariza, especialmente la población diabética con neuropatía asociada.

Una de las ideas originales expuestas en el artículo propuesto, es que la GH también puede favorecer la acción vasodilatadora de los vasos sanguíneos actuando sobre el sistema nervioso autónomo. Esta idea nace de la observación en pacientes con deficiencia de GH, donde se ha visto un marcado aumento de la actividad simpática (552), la cual tiende a revertirse después de la terapia de reemplazo con la hormona (547). Este hecho sugiere que la GH puede regular la actividad simpática central, afectando a la resistencia periférica vascular. Se ha informado de cómo la denervación de una determinada zona vascular elimina el tono simpático constrictivo de las paredes arteriales, lo cual puede estimular el agrandamiento colateral mediado por flujo tras una obstrucción y, por consiguiente, facilitar la arteriogénesis, en particular en los pacientes diabéticos con neuropatía, que muestran un aumento del tono vasomotor en las arteriolas del músculo esquelético secundario a una elevada contracción inducida por noradrenalina (553). Por ejemplo, en estudios experimentales, el tono α -adrenérgico de la arteria ilíaca fue mayor en los animales diabéticos que en los no diabéticos (554). Sin embargo, el efecto de denervación en la vasoreactividad de la extremidad inferior puede no tener el mismo beneficio a todos los niveles, ya que por ejemplo, a nivel de las partes acras, donde existen abundantes shunts arteriovenosos, los cuales están habitualmente cerrados debido al predominio de la constricción simpática, la eliminación del efecto simpático con apertura de los mismos puede producir un fenómeno de redistribución de flujo y robo de sangre en dichas partes distales, especialmente en el pulpejo de los dedos de los pies, que podría favorecer, en teoría, la necrosis de los mismos (555). No obstante, este fenómeno sería sólo atribuible a las partes acras donde existen numerosos shunts, resaltando la gran capacidad de compensación debida a la comunicación intervascular a estos niveles. En el paciente diabético, no obstante, la neuropatía puede afectar de forma distinta a unas zonas y a otras, ya que el fenómeno neuropático suele ser parcheado, y no siempre es hacia la desaparición del tono simpático. Este daño dependerá del tipo de DM, de la presencia de comorbilidades, el modelo experimental utilizado y el lecho vascular, pero, en general, las arterias colaterales en DM son propensas a presentar una mayor constricción y una menor dilatación (553), lo que apoyaría la realización de la "simpatectomía química" por la GH, o, mejor dicho, una "reversión" de la función del nervio simpático dañado por la DM. En este sentido, se ha descrito también en estos pacientes que el nivel de expresión de varios factores de crecimiento, como los factores neurotróficos, los factores de crecimiento similares a la insulina, los factores de crecimiento similares a las citoquinas y el VEGF, están alterados como consecuencia de la neuropatía (556). Como se ha

descrito, la GH podría ayudar en estos pacientes aumentando la liberación de dichos factores desde las células no dañadas y ayudar a la reparación de aquellas dañadas.

La inervación simpática parece ser necesaria para estabilizar el tono de la pared vascular y el fenotipo celular, ya que en los vasos simpatectomizados o con ausencia del tono simpático basal, tanto las CMLs como los fibroblastos aumentan en número con alteraciones de la proporción de colágeno (aumento del colágeno III y disminución del colágeno IV) (557). Esto apoya la hipótesis de que el sistema autonómico participa en la homeostasis vascular. De forma contraria, cuando se incrementa la actividad simpática, las colaterales sufren un engrosamiento intimal que disminuye el SS, y, por tanto, la capacidad de adaptación tras la isquemia (557).

En un estudio microneurográfico de la actividad del nervio simpático muscular en humanos sanos en reposo, se ha descrito una activación simpática y una reconfiguración del reflejo baroreceptor tras la administración de GHRH, en comparación con el grupo placebo, mientras que la presión arterial y la frecuencia cardíaca no se alteraron (558). Por tanto, la GH está relacionada con el sistema simpático, no sólo durante estados patológicos, sino también durante estados fisiológicos. Estos hallazgos podrían ayudar a entender las conexiones de la GH con el sistema vascular.

Ha de ser también aclarado que la isquemia también daña los nervios de las extremidades inferiores en los pacientes con EAP, causando un empeoramiento funcional de los mismos. La observación de la denervación muscular en estos pacientes apoya la idea de que la insuficiencia del flujo arterial coexiste con la neuropatía de la motoneurona distal que empeora la función muscular (559). Sin embargo, los estudios transversales han mostrado resultados contradictorios, lo que probablemente se deba al pequeño tamaño de las muestras. El estudio WALCS II encontró un efecto sobre denervación muscular relacionado con el índice tobillo-brazo (ITB) en los nervios de los pacientes con EAP no diabéticos. Los pacientes con $ITB < 0,5$ se asociaron con una velocidad de conducción del nervio peroneo más pobre. Para aquellos que son diabéticos, la lesión de los nervios estaba simplemente relacionada con el hecho de sufrir o no de EAP (494). En este sentido, las acciones de la GH sobre la neurogénesis y la recuperación del nervio periférico tras escisión del mismo han sido descritas (560). Así pues, la administración de GH también puede ser útil en la afectación nerviosa de los pacientes con isquemia de miembros inferiores.

Sin embargo, los pacientes con EAP muestran muchos otros cambios en la musculatura esquelética de sus extremidades inferiores, con un incremento de la apoptosis y la atrofia muscular (561,562). Todos estos cambios perjudican la tolerancia y el rendimiento del ejercicio, y podrían ser secundarios a la mayor respuesta inflamatoria que presentan estos pacientes (494). En las muestras del músculo gastrocnemio de los pacientes con EAP, los niveles de caspasa 3 son dos veces más altos que en los pacientes control (562), lo que apoya el incremento oxidativo y la apoptosis de los miocitos. El papel de la GH en el aumento de la masa muscular esquelética ha sido ampliamente descrito. El eje GH-IGF-I constituye un importante mecanismo fisiológico de regulación para coordinar la expansión e hipertrofia del músculo esquelético en el período posnatal. La administración de GH, tanto a animales como a humanos con deficiencia de GH, mejora la fuerza muscular (563,564). Si se considera que la mayoría de los pacientes con EAP son personas de edad avanzada, que ya presentan una deficiencia fisiológica de GH (somatopausia), y que la sarcopenia aparece a lo largo del envejecimiento, la terapia de

GH también podría ser útil para recuperar parte de la masa y el rendimiento muscular (339).

Ha sido publicado cómo la GH activa la vía IGF-I-Akt-mTOR en el músculo esquelético, lo cual media tanto la diferenciación de mioblastos, como la hipertrofia de miotúbulos, e inhibe la señalización dependiente de la miostatina (565,566). Por tanto, en este sentido, la GH también podría ayudar en la recuperación de los pacientes con EAP. Sin embargo, como se ha expuesto, nuestro grupo no halló diferencias significativas en cuanto a los niveles de ARNm de IGF-I entre los grupos tratamiento y control, y esto es consistente con que tampoco encontramos diferencias en los niveles basales de ARNm de la miostatina en dichos pacientes, respecto a un pool comercial de control o respecto a muestras de pacientes no isquémicos (Figura 30). Esto es, de alguna manera, extraño, porque se ha descrito que esta molécula, aunque no ha sido adecuadamente estudiada en pacientes con isquemia de miembros inferiores, parece estar elevada en aquellos procesos o enfermedades que cursan con una pérdida de masa muscular, ya que cuando es inhibida, se produce una hipertrofia de la musculatura (567). No obstante, sí que ha sido estudiada en modelos de isquemia de corazón en animales, donde se ha visto que se incrementa de forma rápida (a los 10 minutos) tras infarto agudo de miocardio en el músculo cardíaco, mientras que en estos mismos animales, al analizar el músculo esquelético, hubo una ausencia de incremento local de miostatina, aunque sí se detectaron datos indirectos de activación de su vía de señalización (SMAD 2,3 signaling), lo cual sugiere efectos a distancia de la miostatina derivada del miocardio, o bien efectos auto/paracrinós más difíciles de demostrar (568). Es importante señalar que los pacientes del estudio GHAS presentaban una isquemia crónica de larga evolución y que, además, se determinaron niveles de ARNm y no de proteína. Estos elementos pueden determinar las diferencias respecto a lo publicado en la literatura.

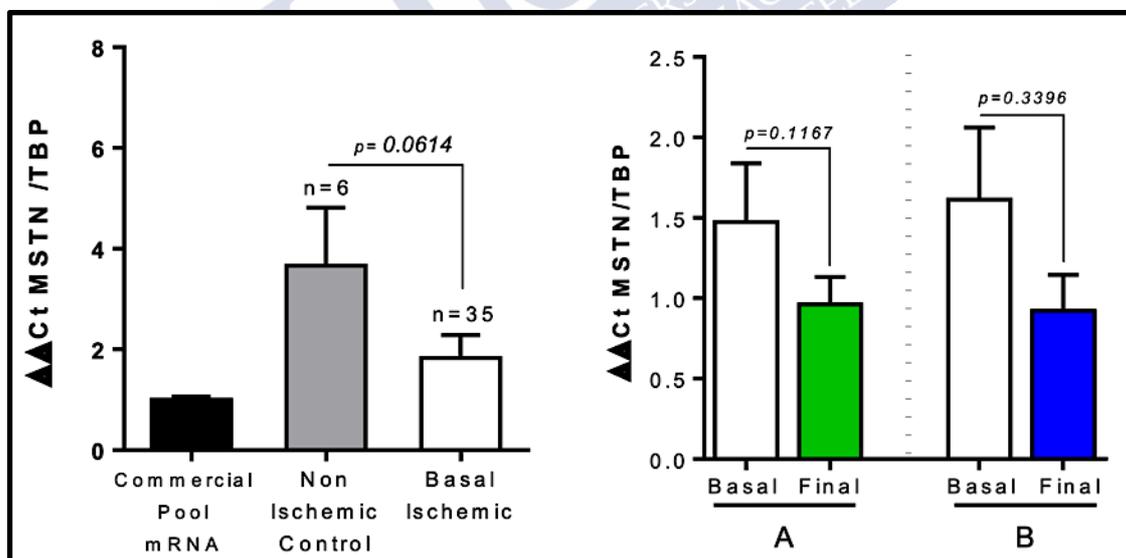


Figura 30. Gráfico de barras que muestra la ausencia de diferencias significativas de los niveles basales de miostatina (MSTN) en músculo esquelético isquémico y no isquémico o con un pool comercial de músculo normal (gráfico de la izquierda). Tampoco hubo diferencias asociadas al tratamiento A (GH) o B (placebo) (gráfico de la derecha). La estadística realizada es el test de Wilcoxon para muestras pareadas y no paramétricas (test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov). El “commercial pool mRNA” es una muestra comercial de RNA de músculo esquelético usada como control técnico para la normalización dentro del ensayo. (Imagen obtenida del estudio GHAS)

Otro elemento que apoya la ausencia de resultados positivos en cuanto a la miostatina, y la posibilidad de una regulación local y, posiblemente, localizada en zonas específicas del músculo, o la influencia del tipo de fibra muscular analizada en la biopsia, es que tampoco hallamos diferencias en cuanto a otro marcador importante muscular como es la miogenina (Figura 31).

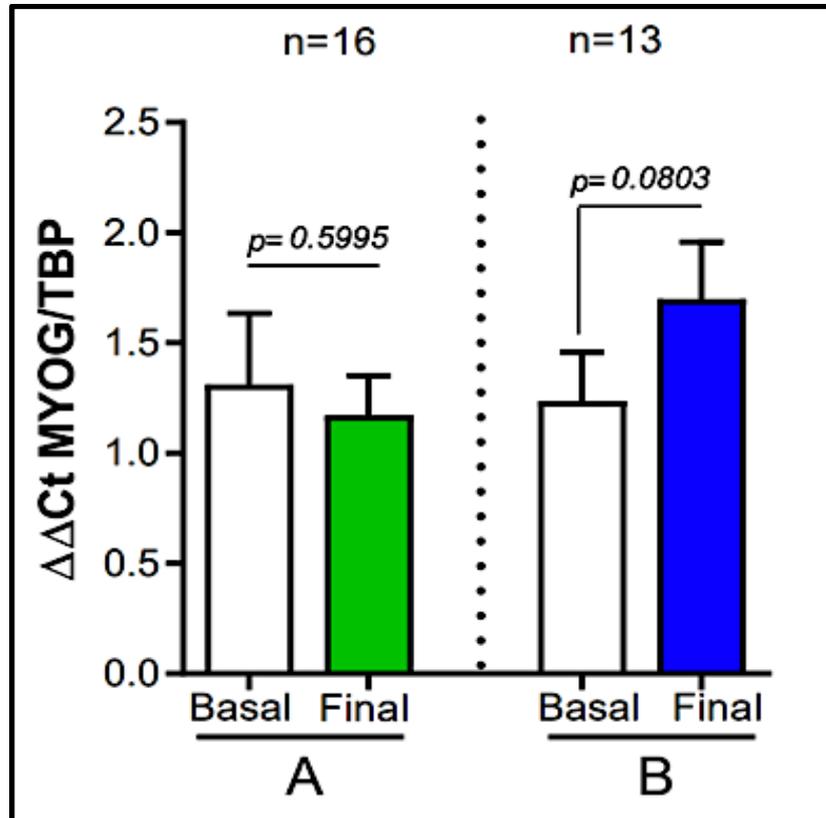


Figura 31. Gráfico de barras que muestra la ausencia de diferencias significativas de los niveles basales y finales de miogenina (MYOG) en músculo esquelético isquémico de pacientes bajo tratamiento con GH (A) y placebo (B). La estadística realizada es el test de Wilcoxon para muestras pareadas y no paramétricas (test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov). (Imagen obtenida del estudio GHAS)

En conjunto, todos estos datos puede que tengan que ver con un hecho importante. Las muestras fueron obtenidas de músculo sóleo, un músculo diferente al resto de los músculos de la pierna, ya que se trata de un músculo con fibras de tipo oxidativo, con mucha más resistencia a la isquemia y, por tanto, con menos afectación del patrón miostatina-miogenina, que se sabe que son mucho menos activas en este tipo de fibras musculares. En este sentido, si se hubieran obtenido muestras de otros grupos musculares de tipo glucolítico, más sensibles a la isquemia, como el gastrocnemio, puede que los resultados hubiesen sido diferentes.

La relación de la GH y la cicatrización de heridas es otro capítulo apasionante dentro de este artículo y dentro del capítulo que anexamos que ha formado parte de un libro sobre cicatrización.

La cicatrización de los pacientes con isquemia crítica es un tema complejo, pues puede no lograrse a pesar de la revascularización correcta. Este es el caso, por ejemplo, de los pacientes diabéticos, en los que, además de una correcta perfusión, también se necesita una correcta de la respuesta inflamatoria neurogénica, la cual actúa como director de orquesta durante la cicatrización. Tal y como ocurre en la mayoría de las neuropatías de cualquier origen que conllevan ulceración, más que un déficit de factores lo que ocurre es su alteración en la función. Esto se ve claramente en los pacientes con neuropatía secundaria a la tetraplejía, al alcohol o a un traumatismo, los cuales tienen una correcta perfusión, pero aparecen úlceras difíciles de curar. De hecho, existe cierto debate sobre si los pacientes diabéticos, incluso aunque padezcan de isquemia, siempre requieren revascularización, ya que se ha observado una tasa razonable de curación del 46% cuando no se puede lograr dicha revascularización (569). Esto. Lo que demuestra, no es que ahora digamos que la revascularización no es importante, sino que viene a resaltar que no es lo único. Por tanto, aunque el tiempo que tarda en cicatrizar una herida puede ser variable, las heridas pueden atascarse ya en la primera fase inflamatoria debido a la mala perfusión o al déficit o disfunción de los factores de crecimiento que se precisan. Esto último aparece típicamente en pacientes con neuropatía, que suele afectar a los pacientes diabéticos, que además pueden tener isquemia. La GH podría ayudar a mejorar la cicatrización, por un lado, incrementando el flujo en la herida, y por otro, incrementando la producción de factores de crecimiento necesarios para que la herida alcance dicha curación. Aunque están fuera del alcance de esta revisión, la infección y la necrosis tisular son también otros factores que influyen claramente en la curación, y que deben ser primariamente controlados. La neuropatía aparece típicamente en casi el 50-70% de los pacientes diabéticos, y puede afectar a su respuesta curativa de lesiones, tanto con déficit, lo más frecuente, como con exceso de tejido cicatricial. En ambos casos la cicatrización efectiva no se produce.

La respuesta neurogénica está mediada por fibras aferentes nociceptivas que liberan sustancia o neuropéptido P (SP). La SP es esencial para la activación de los macrófagos, la quimioatracción y la acción de las citoquinas, las células NK y los linfocitos T (570–574), todos ellos participando en los procesos arteriogénicos y angiogénicos, y en la curación de heridas. La SP aumenta la producción del factor de crecimiento nervioso (NGF) (575), que es estimulado por la GH, junto con su receptor (576). La SP media la interacción neurona-sistema inmune, modulando las tasas de proliferación de las células inmunitarias y la producción de citoquinas por las mismas (577). Estas relaciones se analizan en la figura 8 de la publicación que analizamos.

Aunque la relación entre la SP y la GH a nivel periférico no se ha estudiado adecuadamente, su relación a nivel del sistema nervioso central ha quedado bien establecida (578–580) y es tentador especular que deben participar en una respuesta reparadora común dirigida a la curación de las heridas.

Por otro lado, la GH es un fuerte inductor del sistema inmunológico. Actúa principalmente sobre los macrófagos y los linfocitos T, que desempeñan un papel clave en la cicatrización de las heridas (134,581,582). Se ha demostrado una relación bidireccional entre el sistema neuroendocrino y la función inmunológica (583). La presencia de receptores de GH en las membranas de los linfocitos (584) apoya las propiedades inmunomoduladoras de esta hormona.

Durante la fase inflamatoria de la curación, los macrófagos producen factores de crecimiento que atraen a los fibroblastos y facilitan la siguiente fase o fase proliferativa.

La GH promueve la liberación de algunos de estos factores, como el EGF, responsable de estimular los fibroblastos y sus acciones; el VEGF, que promueve la angiogénesis en la herida; y el FGF, que estimula los macrófagos, los mastocitos y los linfocitos T, y facilita la granulación y epitelización (585,586).

Efectivamente, la GH estimula la curación de las heridas en estudios experimentales con ratas y ratones diabéticos (286,587). Sorprendentemente, más que la concentración de GH, es la alteración previa del sistema inmunológico lo que realmente influye en el efecto final de la hormona en este sistema. Así es, por ejemplo, la respuesta tras administración de GH es diferente en personas sanas y en los que tienen alergias (583), lo que apoya la idea de que la GH puede desempeñar un papel importante cuando el sistema inmunológico está alterado, tal y como sucede en el caso de los pacientes con isquemia crítica, en particular en la población anciana y diabética. En la Figura 32 puede verse un resumen de los posibles efectos beneficiosos de la GH para la cicatrización de heridas.

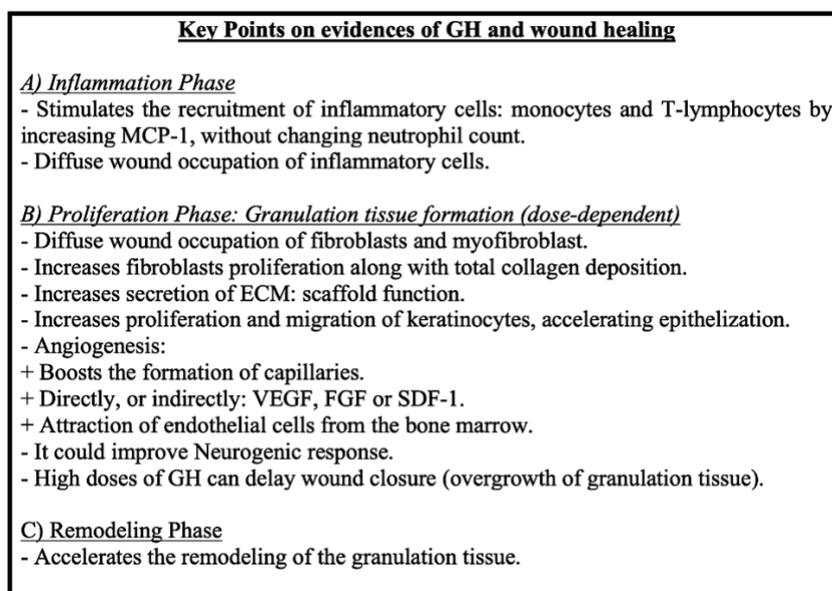


Figura 32. Resumen de los efectos de la GH sobre cicatrización. (Imagen obtenida de Caicedo D, Devesa J. Growth Hormone (GH) and Wound Healing. In: Wound Healing - Current Perspectives. IntechOpen; 2019. p. 116-24)

Aunque la forma tópica de administración de la GH se ha defendido como la más efectiva para ayudar en la cicatrización de heridas (588), también hemos visto en el estudio GHAS como la GH sistémica, inyectada por vía subcutánea, mejoraba la cicatrización de los pacientes isquémicos. Este hecho puede ser demostrado con un gráfico de superficie tras tomar fotografías evolutivas de una úlcera, como vemos en la Figura 33. En ella vemos como la zona central está ausente de tejido cicatricial antes de iniciar el tratamiento (A). Tras 4 semanas de tratamiento con la hormona, comienza a rellenarse dicha solución de continuidad o úlcera (B). Finalmente, el resultado es una cicatrización total, donde se muestra como el exceso de tejido cicatricial de las primeras 4 semanas es organizado por la propia contracción de la herida, con el objetivo de permitir la epitelización final (C).

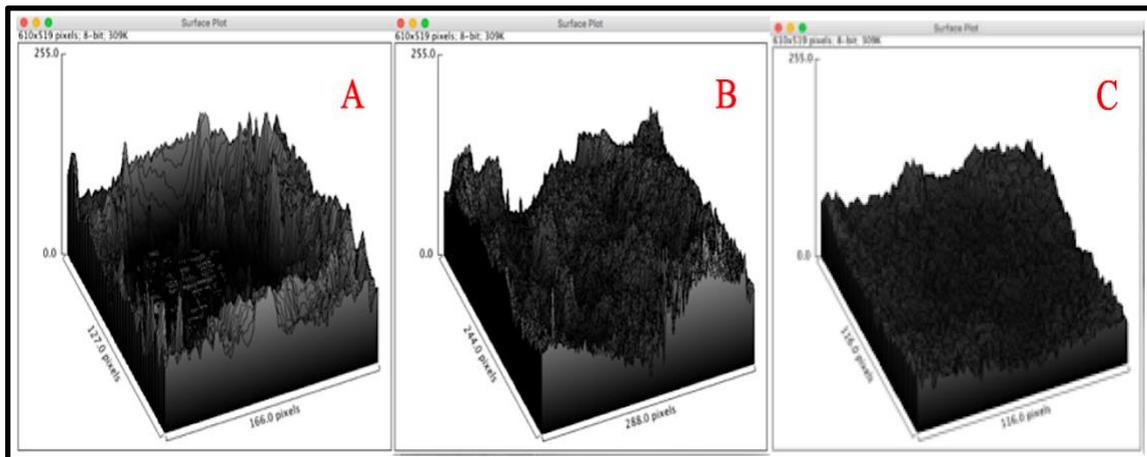


Figura 33. Gráfico de superficie realizado sobre fotos de seguimiento de un paciente con úlcera de naturaleza isquémica bajo tratamiento con GH. A: Basal; B: tras 4 semanas de tratamiento; C: tras 8 semanas de tratamiento. Nótese el crecimiento de tejido de granulación en la zona central y el relleno de la herida desde A hasta C. Programa utilizado: Image J. (Imagen obtenida del estudio GHAS)

Este beneficio, como se ha comentado, no parece sólo derivado del posible incremento de factores de crecimiento peri e intraulcerativos, sino que también es derivado de un incremento de flujo sanguíneo en la úlcera. La angiogénesis juega un papel clave durante la fase de granulación y remodelación del tejido, ya que se requieren nuevos vasos para la progresión de la curación de las heridas. Las CE expresan la GHR (288), y la participación de la GH en este último proceso ha quedado ampliamente demostrada en esta revisión. Además, los ratones transgénicos para GH muestran un aumento en los vasos sanguíneos durante reparación de tejidos (587).

Este último fenómeno angiogénico puede pasar desapercibido si no se aplica el test correcto. En el paciente comentado con anterioridad, sin mejora aparente del ITB, usamos una prueba de vasodilatación mediada por flujo mediante test de hiperemia reactiva. En la Figura 34 vemos la respuesta a la isquemia inducida artificialmente en una extremidad afectada con isquemia crítica. El miembro se comprime hasta que pierde el escaso flujo durante 5 minutos. Se observa el comportamiento de la respuesta vasodilatadora a lo largo del tratamiento con GH, y, por tanto, del flujo de la extremidad, sobre todo al final del tratamiento, a las 8 semanas.

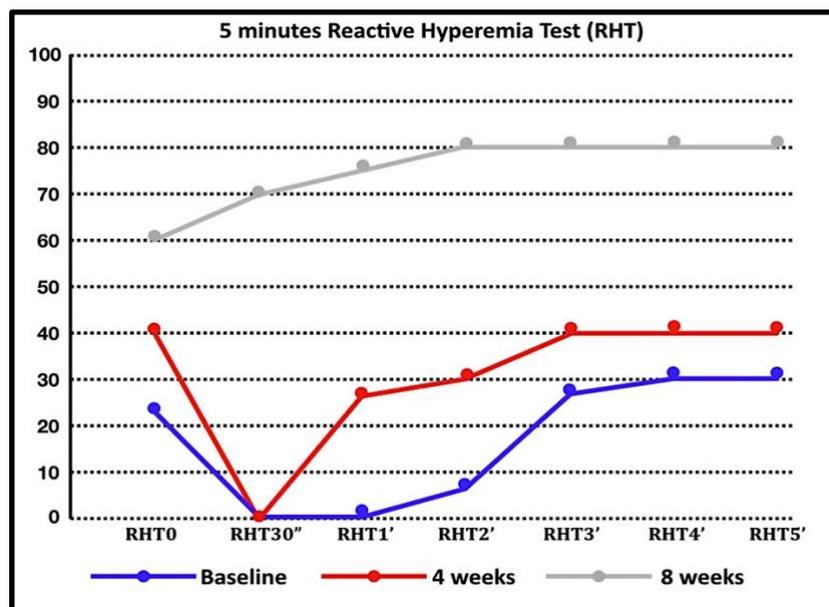


Figura 34. Gráfico que muestra la evolución del flujo en una pierna isquémica de un paciente bajo tratamiento con GH. Test de hiperemia reactiva (RHT) en los momentos basal (RHT0), a los 30 segundos (RHT30''), al minuto (RHT1'), y a los 2,3,4 y 5 minutos (RHT2,3,4,5) desde la oclusión arterial producida por el manguito de presión. (Imagen obtenida del estudio GHAS)

Otro hecho que apoya el posible papel de la GH en la vasculogénesis del embrión, y, por tanto, en la neovascularización del adulto, es la relación de GH con el SDF1 (Factor derivado de la célula estromal), también llamado CXC motif quimioquina ligando 12 (CXCL12), y con su receptor, el CXCR4. Durante la embriogénesis, el SDF-1 ha sido implicado en la migración de células hematopoyéticas del hígado fetal a la médula ósea y en la formación del sistema vascular (589). Durante la edad adulta, el SDF1 cumple una importante función en la neovascularización, al ayudar en el reclutamiento de EPCs desde la médula ósea para ser incorporadas en los tejidos con isquemia, a través del receptor comentado (590). También, realiza una importante labor recientemente descrita, al mediar la respuesta de mastocitos perivasculares que dirigen la arteriogénesis inducida por SS. Efectivamente, el SDF-1 secretado por las plaquetas atraídas hacia la zona de incremento de SS, favorece el reclutamiento de mastocitos que gobernarán la respuesta inmunitaria dirigida al incremento de la pared vascular de vasos colaterales o arteriogénesis (468). Pues bien, el SDF1 potencia el gen GH y la liberación de la hormona desde la glándula pituitaria anterior, tanto en situación normal como tumoral, efecto mediado a través de CXCR4, presente en las células somatotropas (591,592). La GH también parece estimular la producción de SDF1, porque esta citoquina está muy elevada en los ratones transgénicos para GH (593,594) y en los animales tratados con GH, en comparación con los controles (593). De hecho, ha sido descrito como el efecto de movilización de células EPCs desde la médula ósea que produce GH (287,288) parece ser indirecto, mediado por VEGF, SDF-1 o EPO (287).

La Figura 35 resalta qué vías de señalización puede potenciar la GH a nivel de la CE para estimular la angiogénesis y arteriogénesis. También se resalta el papel importante que puede jugar la GH autocrina/paracrina en dichas células, así como la inhibición de GH por vaso-inhibinas y SOCS. Todas estas vías han sido descritas a lo largo de este trabajo.

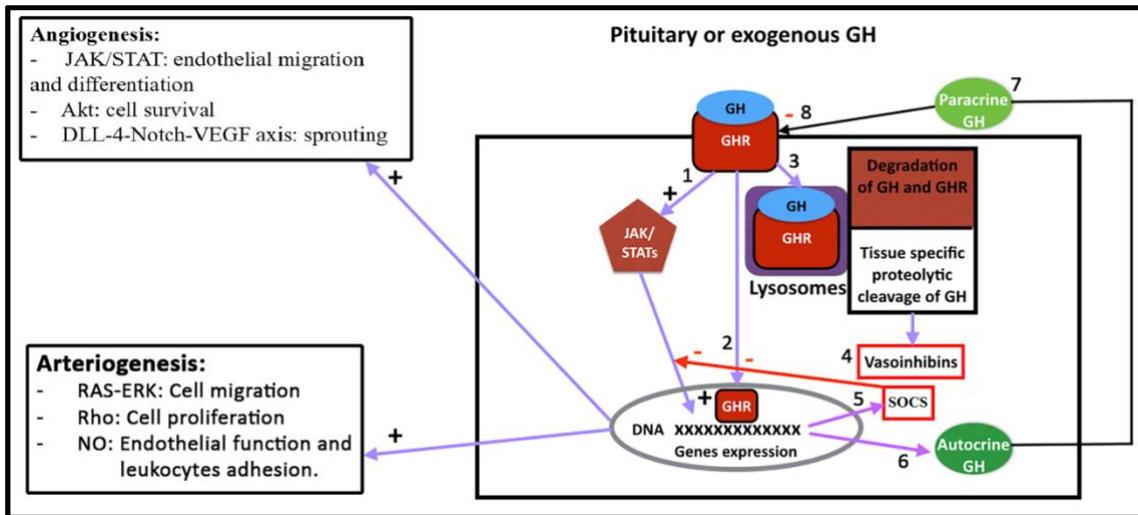
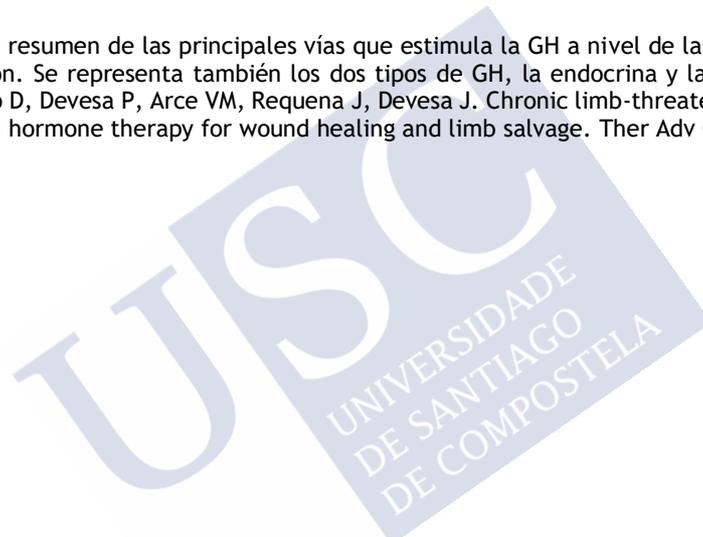


Figura 35. Esquema resumen de las principales vías que estimula la GH a nivel de las CE para favorecer la neovascularización. Se representa también los dos tipos de GH, la endocrina y la autocrina. (Imagen obtenida de Caicedo D, Devesa P, Arce VM, Requena J, Devesa J. Chronic limb-threatening ischemia could benefit from growth hormone therapy for wound healing and limb salvage. Ther Adv Cardiovasc Dis. 2017 Dec 22;1-20)





DISCUSIÓN GENERAL

A lo largo de este compendio de artículos hemos intentado resaltar, por encima de todo, la trascendental importancia del conocimiento de la homeostasis vascular, un elemento clave para entender la fisiopatología del sistema cardiovascular y por qué enferman nuestras arterias. Dicha homeostasis o equilibrio, clave ya desde la embriogénesis, dependerá del balance entre las agresiones a los vasos, sobre todo, a la célula endotelial, y del buen funcionamiento de los sistemas de defensa.

En el primer artículo de este compendio se analiza cómo el endotelio libera muchos factores para controlar el tono vascular, la adhesión de las células sanguíneas circulantes, la proliferación de células de músculo liso y la inflamación. Cualquier molécula destinada a una determinada acción tendrá su molécula de acción contraria. En ocasiones, como pasa con la GH, la misma molécula posee una acción y su contraria, y la determinación de una u otra dependerá de los procesos a los que es sometida la misma a nivel celular (escisión, etc). Muchas de estas moléculas tienen capacidad constitutiva, es decir, que presentan una actividad continua, como es el caso de la producción de NO, clave de bóveda del sistema vascular. El NO ejerce múltiples acciones, todas ellas de extraordinaria importancia. Conforme envejecemos, parte de esa producción se pierde, predominando también los sistemas que lo inactivan, provocando que las células se vuelvan senescentes o sean dañadas. El sistema eNOS/NO está interrelacionado perfectamente con el sistema redox, el cual está formado por múltiples enzimas cuya acción va destinada a protegernos de los efectos perniciosos del oxígeno en altas concentraciones a nivel celular. Es una relación curiosa la de la dependencia del oxígeno de gran parte de nuestras células, con su aspecto tan nocivo. Naturalmente, la respiración aeróbica tiene muchas ventajas, las cuales podemos aprovechar gracias al hecho de disponer de unas organelas adecuadas: las mitocondrias, con extraordinaria importancia porque llevan a cabo la respiración celular y de defensa de los productos tóxicos que genera la misma. En ellas encontramos varios complejos enzimáticos, entre los cuales hemos destacado el papel de la NOX4 o NADPH de tipo 4, integrada en el complejo I mitocondrial, con un papel destacado en la producción de ROS a partir de NO. Tal y como se defiende en este primer trabajo, en nuestro ensayo clínico hemos corroborado cómo puede ser más rentable actuar sobre aquellas moléculas que inactivan el NO, más que en esforzarse en estimular la producción del mismo. Y esto mismo es lo que parece hacer la GH en este ambiente tan hostil como es la isquemia crónica que amenaza la extremidad, en donde el problema, no es que no hay producción de NO para estimular la neovascularización, sino que, habiendo una gran cantidad del mismo, éste es rápidamente inactivado sin que pueda llevar a cabo sus acciones. Las mitocondrias, en este sentido, serán clave, no sólo para el buen funcionamiento homeostático, sino también para la regulación de los procesos fisiológicos destinados a la corrección de las alteraciones vasculares. Así, el papel que ejerce el equilibrio redox en los procesos de angiogénesis/arteriogénesis, y la forma en la que la GH podría ser de ayuda protegiendo del exceso de oxidación, han sido extensamente analizados, siendo de gran valor los datos clínicos expuestos. Si bien la mayoría de los datos analizados sobre el papel del balance redox provienen de estudios experimentales, el hecho de haber hallado datos paralelos y consistentes en el escenario clínico es sumamente importante. En este artículo se destaca cómo uno de los aspectos más importantes en dicho escenario bajo isquemia crónica crítica, es el control de enzimas relacionadas con la sobreproducción crónica de ROS, lo cual va a disminuir el daño celular, por un lado, e incrementar la cantidad de NO bioactivo, es decir, efectivo, por otro. Esto es fácil de entender bajo la premisa de que la

GH es una hormona de la vida o de supervivencia, la cual favorece el crecimiento celular y evita la apoptosis, activando diversas vías de señalización celular. El daño que generan las ROS viene representado por el incremento del estado inflamatorio, definido por el aumento de TNF- α secundario al aumento de NF- κ B. Así, aquellos pacientes con mayores concentraciones de parámetros de inflamación tienen mayor morbimortalidad y una mayor progresión de la enfermedad aterosclerótica. Esto ha sido descrito en múltiples estudios, destacando el estudio CANTOS por su especial relevancia. En dicho estudio se propone a la IL-6 como uno de los objetivos terapéuticos para la enfermedad cardíaca isquémica. Sin embargo, el TNF- α puede ocupar un lugar prominente. Los niveles basales de TNF- α , IL-6, CAMs o MMP-9 mostraron ser predictivos de futuros eventos cardiovasculares, incluso en la población sana. Mientras en el mencionado estudio CANTOS el papel relevante es para la IL-6 en pacientes con cardiopatía isquémica, Gardner y colaboradores demostraron que, en los pacientes con Enfermedad Arterial Periférica, estaban aumentados los niveles de TNF- α e IL-8, no la IL-6, lo cual apoya el hecho que defendemos aquí de que ambas enfermedades presentan diferencias, incluso en el patrón inflamatorio, y que TNF- α podría ser una mejor diana terapéutica para la isquemia periférica. En aquellos estudios observacionales donde se usaron inhibidores del TNF- α (ertanercept, adalimumab), principalmente en pacientes con artritis reumatoide, disminuyeron los eventos ateroscleróticos, y se produjo una mejora de la disfunción endotelial medida por la vasodilatación mediada por flujo detectada por el test de hiperemia reactiva en la arteria braquial, así como una mejora en la microcirculación cutánea medida por imagen láser-doppler, incluso ya desde épocas tempranas del desarrollo de la arteritis reumatoide. No obstante, la asociación causal entre éste u otros biomarcadores y la Enfermedad Arterial Periférica no ha sido establecida aún. Respecto al marcador que nos ocupa, el TNF- α , los estudios no son concluyentes, como pasa cuando se usa la randomización Mendeliana con la PCR. En nuestro estudio, como se ha analizado, el TNF- α ha sido una de las moléculas, junto con la PCR, que hemos hallado aumentada en el 70% de los pacientes con isquemia periférica de carácter crítico. El hecho de que la GH sea capaz de disminuir TNF- α y, probablemente, PCR, como se ha demostrado en estudios con pacientes GHD, nos pone en la pista de que dicha molécula, con múltiples acciones deletéreas cuando está sobreexpresada (favorece la respuesta inflamatoria y la inactivación de eNOS fosforilándola), pueda ser una diana terapéutica más acertada para los pacientes con isquemia amenazante de la extremidad. Como podemos ver, homeostasis vascular y balance redox parecen gobernar los estados de salud o enfermedad vascular, al menos, a nivel periférico. La traducción final, es un desbalance o disfunción endotelial manifestada por una alteración de la vasodilatación mediada por el endotelio, principalmente por el NO. Esto determinará un predominio de sustancias vasoconstrictoras como la endotelina, la cual se ha visto incrementada en la aterosclerosis, facilitando su desarrollo mediante distintos mecanismos. GH, incrementa sus niveles de forma fisiológica ante el incremento de niveles de endotelina. Como vemos, volvemos al aspecto trascendental de que GH, producida por las propias células endoteliales y a nivel pituitario, actúa como una molécula de compensación, de equilibrio. El papel trascendental del balance redox en el sistema vascular fue brillantemente expuesto y revisado por el doctor Bir, S. y colaboradores. Por otro lado, las posibles acciones de GH en la homeostasis vascular han sido analizadas por múltiples autores, entre los que se encuentran: Thum, Delafontaine, Bolamperti, Brooks, Carmen González, Carmen Clapp o J. Devesa, entre otros.

En este artículo primero, también se abordan temas totalmente novedosos de extraordinaria importancia. Así, nuestro grupo también propuso la hipótesis de que la GH y el IGF-I pudieran ser parte de esos factores mitogénicos secretados por las células endoteliales en respuesta a las fuerzas de cizallamiento o SSF. El gran número de conexiones que ambas moléculas tienen con citoquinas, hormonas y células involucradas en la neovascularización refuerzan su papel en este proceso. Este aspecto, aunque estudiado hace años, ha pasado casi desapercibido para los investigadores. La gran cantidad de receptores para GH (GHR) que presentan los grandes vasos sanguíneos del organismo, es un hecho que nos debe hacer reflexionar. Cuando un órgano tiene muchos receptores para una determinada sustancia es porque es una diana natural y de relevancia para la misma. Si la aorta o la vena cava tienen una gran concentración de GHR, es porque en ellos ejerce una acción destacada. Tal y como se recoge en este trabajo, un primer efecto a destacar sería el de defensa ante el exceso de presión o de volumen, produciendo una hiperplasia y un aumento de grosor de la capa muscular de dichos vasos sanguíneos. Por tanto, la célula endotelial, va a producir GH e IGF-I ante los incrementos de presión o volumen, es decir, es capaz de activar diversos genes, siendo algunos de ellos, específicos para la producción de ambas sustancias. Y de este aspecto fisiológico, nace también derivado un aspecto de gran relevancia para los especialistas que tratamos la enfermedad vascular y que luchamos contra la temida hiperplasia neointimal (HNI). Es en este proceso, consecuencia de un daño a la arteria secundario a la cirugía de revascularización o a la angioplastia y colocación de un stent, donde están puestos, actualmente, todos los esfuerzos. Debido al papel predominante que el IGF-I, junto con el TGF- β 1, parecen tener en la HNI, dicha molécula podría ser una diana terapéutica muy rentable en el futuro, y eso parecen apuntar las primeras investigaciones con fármacos que bloquean IGF-I. Esto es sólo un ejemplo de cómo una señal mecánica, presión o volumen, son capaces de provocar una respuesta química, siendo GH/IGF-I uno de los elementos destacados que participan en dicha respuesta de aumento del vaso. Traducido a los vasos colaterales, podríamos estar hablando de que ambas moléculas, mitógenos fisiológicos, sobre todo el IGF-I, podrían, y deberían, tener un papel en la arteriogénesis. Hay otro elemento en esta revisión que resalta por su utilidad clínica. Se trata de la relación que parece haber entre GH y células madre mesenquimales o MSCs. Se trata de células pluripotenciales productoras o facilitadoras de la producción de múltiples citoquinas en el entorno en el que se encuentran, estimulando los procesos regenerativos de reparación celular. Dichas células son especialmente activas en un entorno en el que la vía de señalización celular Akt esté sobreexpresada, y GH es capaz de llevarlo a cabo. Además, como se ha descrito, cuando estas células se ponen en contacto con GH, se bloquea su diferenciación natural hacia adipocitos y se aumenta su supervivencia. Estos hechos nos llevan a hipotetizar que, la combinación de ambos elementos, podría ser de ayuda. Cuando las MSCs se han usado de forma aislada en estudios con isquemia de miembros inferiores, su beneficio no ha sido el esperado, siendo más bien bajo. Por ello, nuestro grupo apuesta por dicha combinación como sinérgica. Así pasa, por ejemplo, cuando se combina GH con G-CSF, un potente inductor de la movilización de células progenitoras CD34+ desde la médula ósea a sangre periférica. No hay que olvidar que estas células progenitoras presentan receptores tanto para GH como para IGF-I, aunque el mecanismo por el cual GH estimula dichas células no ha sido aún aclarado. No obstante, más allá del efecto directo, se ha visto un aumento de SDF-1 y de G-CSF paralelos. Así es, GH potencia el efecto estimulador sobre la médula de G-CSF,

especialmente en individuos declarados como pobres movilizadores o con respuesta disminuida a esta última molécula, como puede ser la población senescente. Dado que los pacientes con isquemia que amenaza la extremidad suelen ser de edad avanzada, y dado que las MSCs se ven también afectadas por la senescencia en cuanto a su potencial, creemos que la administración de GH asociada a la terapia celular de forma temprana podría ayudar incrementando la viabilidad de dichas células y su potencialidad y beneficio. Este posible beneficio, aún no testado, es de una importancia capital para ayudar a conseguir un efecto clínico relevante en los estudios de angiogénesis con terapia celular.

Nuestro grupo ha descrito, también, cómo puede ser demostrado el posible efecto neovascularizador de la GH en ambos ambientes, experimental y clínico. A nivel experimental, en el artículo 2, fue usada una técnica sencilla y barata como la fotopletismografía (PPG) para el análisis de la reperfusión en un modelo animal de isquemia de miembros inferiores. Dicha técnica ha sido escasamente utilizada con este objetivo en experimentación animal. Sin embargo, aunque en la actualidad existen métodos de mayor sensibilidad, que aportan también información metabólica, como PET y SPECT, dicha prueba puede ofrecer un buen balance coste/beneficio para las determinaciones seriadas durante proceso isquémico, así como para testar terapias angiogénicas. A pesar de lo expuesto en nuestro estudio experimental, sería deseable un estudio de mayor tamaño para corroborar estos datos, comparándolos con los tests de referencia como el láser-doppler imagen o los tests de imagen molecular. No obstante, y teniendo en cuenta el escaso tamaño muestral del estudio, se pudo observar una tendencia a la mejora angiogénica, y a la protección en las escalas clínica y funcional, en aquellos animales tratados con GH, tal y como aparece reflejado en el artículo 2, aunque finalmente no se alcanzara la significación estadística. Desde el punto de vista de la PPG, el angiogénico comienza a ser efectivo desde el día 10 de tratamiento, alcanzando la fase de plateau para el día 20. Esto coincide con la respuesta fisiológica descrita por otros grupos, en la que a partir del día 3 de isquemia puede evidenciarse cierta actividad angiogénica muy leve, que comienza a ser más evidente entre los días 7 y 14, y que alcanza la fase plateau en el día 21. Por tanto, la GH no hace más que potenciar dicha respuesta fisiológica que ya es de por sí muy rápida en la rata. Hay que tener en cuenta, no obstante, que los grupos de animales (GH y placebo) no fueron comparables en su totalidad, ya que las ratas que recibieron GH tuvieron un modelo de isquemia más agresivo, con mayor número de ligaduras de arteria epigástrica, arteria fundamental de compensación ante la isquemia en la pata del animal. Aun así, se puede ver una clara tendencia a la mejoría. Nuestro grupo es pionero en usar una prueba sencilla y barata para testar angiogénesis. Creemos que queda parcialmente validada, a expensas de contrastarla con otras pruebas patrón, aunque esto ya ha sido realizado por otros grupos usando flujometría por láser-doppler. No obstante, su sensibilidad no es comparable a la de los tests de imagen molecular, y además, esta prueba se realizó siempre con el animal en reposo, lo que puede hacer pasar desapercibido beneficios que se sólo se observan con el ejercicio. Bajo nuestro punto de vista, dado que se trata de una prueba barata y fácil de realizar, podría ser de ayuda, siempre complementaria, y de interpretación conjunta con otras. Con este estudio, confirmamos los datos adelantados por el grupo de Leiden, encabezado por los doctores P. Quax y A. Hellingman, en el que parece que el modelo de isquemia triple (con ligadura de la arteria epigástrica), parece el más rentable para estudiar angiogénesis. Así pues, las variaciones en el proceso quirúrgico de creación de isquemia

en la pata del animal resultan en diferente desarrollo de colaterales, lo cual puede ser detectado con la PPG, tal y como se muestra en la Figura 26 (C1 y D2) de esta tesis. Este hecho es trascendental, ya que, si no se unifican los criterios sobre el mejor método de isquemia animal, los resultados seguirán siendo heterogéneos y no comparables, pudiendo ser la causa de la falta de efecto clínico de muchas moléculas que habían dado buen rendimiento en la fase experimental.

A nivel clínico, en el artículo 3, nuestro grupo ha sido también de los primeros en describir el posible efecto de GH en pacientes isquémicos diabéticos con la técnica de SPECT-MIBI. En esta técnica se usa un radiotrazador que da información de flujo. En la Figura 25 de este trabajo se muestra el incremento de flujo tanto cualitativo como cuantitativo en una extremidad con microangiopatía diabética respecto a la contralateral en un paciente sometido a tratamiento con GH. En dicho paciente, también se usó la PPG que muestra un incremento paralelo, lo cual es consistente con los datos de la prueba de imagen molecular.

En dicho artículo 3, abordamos de forma extensa numerosos aspectos de los posibles beneficios del uso clínico de la GH en el sistema cardiovascular. Es en este artículo donde analizamos algunos de los elementos más relevantes de la relación que mantiene GH con otras hormonas o péptidos como IGF-I, Grelina, GDF-15 o Klotho. Todos ellos han mostrado una estrecha relación con GH, sobre todo IGF-I, que llegó a denominarse como la verdadera hormona de crecimiento a nivel periférico. Sin embargo, la relación con IGF-I no es fácil de entender, ya que la GH ha demostrado tener múltiples acciones directas en la célula, entre ellas, el estímulo de eNOS a nivel endotelial. El papel de Grelina como secretagogo de GH está ampliamente documentado y cada vez tiene más relevancia. Pero, además, esta hormona tiene, a su vez, receptores en la aorta y en el ventrículo/aurícula izquierdos. Como hemos visto, la relación bidireccional de ambas hormonas es evidente, de tal forma que el aspecto defensivo que Grelina muestra frente a la inflamación a nivel visceral es dependiente de los correctos niveles de GH, como sucede en la colitis isquémica. GDF-15, producido por el corazón, es capaz de disminuir la producción de IGF-I hepática y aumentar la de GH de forma indirecta al bloquear el feed-back negativo de IGF-I sobre GH. Y más aún, la relación con Klotho, el péptido antisenescencia, aunque no totalmente comprendida, es de suma importancia en la homeostasis vascular, ya que Klotho, aunque puede tener efectos directos sobre los vasos, parece actuar predominantemente por medio de GH a este nivel. Dicha relación se ve más claramente en sujetos con deficiencia de GH, en los que los niveles plasmáticos de dicha molécula están también disminuidos de forma paralela a los de la GH, favoreciendo la morbimortalidad temprana de origen cardiovascular en estos pacientes si no se corrige su estado. Ambas moléculas parecen interactuar para reparar el endotelio dañado, aunque el mecanismo final es desconocido. Por tanto, vemos como órganos trascendentales para la vida como son el hígado, a través del IGF-I, los riñones, a través de Klotho, el estómago, a través de la Grelina, o el corazón, a través de GDF-15, tienen interacción con la GH y la regulan, resaltando así la suma importancia de esta hormona.

Los pacientes GHD siempre nos han ofrecido la pista para observar la relevancia que la GH tiene a nivel cardiovascular. Dichos pacientes muestran cambios en la composición corporal, con un aumento de la obesidad central y del colesterol LDL, así como disminución del HDL, lo que favorece la inflamación y la resistencia a la insulina que llevan a la aterosclerosis. Por otro lado, también se favorece un aumento de la actividad simpática que incrementa el tono vascular y una disminución de NO que favorece la

trombosis, completando así el cuadro aterotrombótico típico de la enfermedad cardiovascular.

Al igual que es de suma importancia comprender el estado patológico de la deficiencia de GH y sus consecuencias, es también relevante entender la deficiencia fisiológica de GH que acontece con la edad o somatopausia. Dicho estado de deficiencia y sus consecuencias han sido pormenorizadamente analizadas a lo largo de este trabajo y en las publicaciones, pero principalmente hay que entender que al disminuir la producción pituitaria de GH y perderse sus pulsos, se pierde uno de los elementos protectores frente a la inflamación y la disfunción endotelial, disminuyendo, de igual modo, la movilización de células progenitoras desde la médula ósea. Estos aspectos han dado origen a una corriente de autores que defiende el posible uso de la GH durante la senescencia para prevenir eventos asociados al envejecimiento. No obstante, siempre hay que baremar los pros y contras de esta afirmación. Aunque la relación de GH y cáncer es aún confusa, salvo en acromegalia, donde las cantidades de GH son altísimas, conviene conocer este doble filo de todas las moléculas implicadas en la regeneración tisular. Claramente, uno de los miedos de las moléculas regeneradoras es la posibilidad de inducir un tumor silente. No obstante, los datos del National Cooperative Growth Study (NCGS) y del Pfizer International Growth Database (KIGS) sobre más de 20 años tratando niños sometidos a terapia de larga duración con GH, y con más de 55.000 niños tratados, no muestran un incremento de la tasa de tumores (incluso la tasa de leucemia fue menor de lo esperado), salvo en aquellos que también estaban sometidos a factores de riesgo con exposición a la radiación o quimioterapia. En las conclusiones de ambos estudios se afirma que, a la vista del conocimiento actual y con las limitaciones de los estudios realizados hasta la fecha, la terapia con rhGH es segura, dado que no supone un riesgo añadido para la aparición de nuevas neoplasias ni leucemia en niños sin factores de riesgo y para los supervivientes de cáncer en cuanto a la recidiva de su tumor primario. Ello se hace extensible a la etapa adulta. Merecen especial atención aquellos pacientes con antecedentes de radiación, quimioterapia, inmunosupresión y trastornos genéticos (síndrome de Turner, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, retinoblastoma, etc.) donde el riesgo sí parece ser superior, así como la aparición de segundas neoplasias en aquellos pacientes con antecedentes de cáncer, fundamentalmente supervivientes de leucemia y tras radiación. Aunque dicho riesgo parece decaer con el tiempo, los datos en adultos apoyan un seguimiento cauteloso en pacientes de mediana edad en adelante.

En el artículo 4, primer artículo de la serie en el tiempo, se revisan los posibles beneficios clínicos específicos para la Enfermedad Arterial Periférica y para la cicatrización de heridas en los pacientes isquémicos. En este artículo se nos recuerdan las vías de compensación que se activan a nivel del miembro inferior cuando se produce la isquemia. La adaptación microvascular es una de las primeras en aparecer ante la hipoxia o la acidosis, con vasodilatación de las unidades microcirculatorias y apertura de los shunts arteriovenosos, en el corto plazo, o el desarrollo de angiogénesis o nuevos capilares, más a medio plazo. No obstante, aunque se trata de una medida de protección importante, el verdadero cambio es la adaptación de las arterias colaterales, primariamente con vasodilatación secundaria al NO y, más tarde, con su desarrollo que lleva a un incremento del diámetro de las mismas, arteriogénesis, lo cual aumenta la cantidad total de flujo. Este segundo mecanismo es fruto de la respuesta de estas colaterales al incremento de fuerzas shear stress tras la oclusión. Por tanto, angiogénesis y arteriogénesis son procesos que pueden darse de forma conjunta, pero que son distintos completamente. Aunque este

segundo proceso reparador o arteriogenesis es el más rentable y el que tenemos que esforzarnos por favorecer en las terapias neovascularizadoras, hay que subrayar el hecho de que muchos pacientes isquémicos no precisan verdaderamente de él, ya que las grandes arterias están preservadas. Así pasa, por ejemplo, en muchos pacientes diabéticos, con insuficiencia renal crónica o con vasculitis como la tromboangiitis obliterante. En este tipo de pacientes, que también desarrollan cuadros con dolor de reposo y ulceración, y, por tanto, riesgo de pérdida de extremidad, debe predominar el estímulo de la angiogenesis. Por ello, en los estudios con pacientes con vasculitis, el VEGF ha dado mejores resultados clínicos, ya que su potencial es principalmente angiogénico, no arteriogénico. GH podría potenciar ambos procesos reparadores, directa o indirectamente, a través del estímulo del VEGF y su receptor 2, SDF-1, células progenitoras, NO, neutrófilos liberadores de citoquinas, EGF, FGF, EPO, etc. Vemos, por tanto, cómo GH puede tener un papel destacado durante la neovascularización en la etapa adulta, como lo tiene durante la vasculogenesis embrionaria.

Un aumento del tono vasomotor por incremento de la actividad simpática ha sido demostrado en pacientes diabéticos. Este aumento del simpático, como se ha descrito, tendrá efectos negativos sobre la capacidad de vasodilatación en estos pacientes, además de la propensión a la calcificación masiva de la pared arterial. Por tanto, el simpático, en esencia, también podría ser una diana terapéutica para estos pacientes, y GH podría ayudar a disminuir dicha hiperactividad. Así, en pacientes con GHD, se ha visto un aumento del tono vasomotor por incremento de actividad simpática que desaparece tras el tratamiento con GH. Además, la actividad de regulación neuronal de GH ha sido ampliamente documentada, especialmente a nivel central.

Finalmente, la GH ha sido propuesta como un elemento de ayuda en la cicatrización de heridas, mediante uso tanto tópico como sistémico. En nuestro anexo sobre cicatrización y GH, se expone ampliamente cómo puede ayudar la GH en este ámbito, y mostramos resultados clínicos de alguno de los pacientes del estudio GHAS tratados con GH. Mediante la realización de gráficos de superficie sobre fotografías evolutivas de dichos pacientes pudimos demostrar el crecimiento del tejido de granulación.

Curiosa es, también, la estrecha relación de GH con el sistema inmune o con la sustancia P (SP), una de las moléculas más interesantes para tratar la neuropatía asociada a los pacientes diabéticos. Dicha neuropatía afecta, no sólo al tono vascular, sino que también puede afectar a la función muscular. Aunque la relación GH/SP no ha sido bien establecida a nivel periférico, sí que se ha establecida a nivel central, por lo que es tentativo especular que ambas moléculas deben colaborar de alguna forma a nivel de las heridas para su reparación.

A partir de los datos aquí expuestos, preconizamos que la administración intermitente de GH durante cortos períodos de tiempo puede ser una buena estrategia para mejorar la disfunción endotelial que conduce al desarrollo de la aterosclerosis o para tratar la isquemia evitando su potencial oncogénico. La GH mejora el desequilibrio redox, la aparición de los vasos colaterales después de una oclusión arterial importante, mejora la cicatrización de las heridas y el rendimiento cardíaco después de un infarto de miocardio o una insuficiencia cardíaca, principalmente en aquellos pacientes con síndrome de deficiencia hormonal múltiple y aquellos en los que se alcanza un mayor nivel de IGF-I. El tratamiento con GH a corto plazo puede administrarse con seguridad a los pacientes ancianos que sufren enfermedades cardiovasculares, siempre que no exista una contraindicación como la presencia de una neoplasia o neumonía activas. Aunque la

asociación de GH y otros factores de crecimiento podría ser aconsejable, también debería realizarse en cortos períodos de tiempo.

Basándose en el conocimiento actual de la arteriogénesis y angiogénesis, un punto clave para las extremidades inferiores es la búsqueda de moléculas que mejoren dichos procesos defensivos. Los antioxidantes podrían desempeñar un papel importante en el futuro, dada la gran implicación del balance redox.

El conocimiento del proceso de curación de las heridas y de la respuesta neurogénica podría mejorar los resultados mediante el uso de factores de crecimiento específicos y, por tanto, disminuir la probabilidad de fallo para alcanzar los objetivos primarios de los ensayos clínicos.

La GH es una hormona pleiotrópica por su principal acción: promocionar la supervivencia celular. Por ello, sus acciones dependen del microambiente que encuentra en los tejidos. Así, por ejemplo, tras una oclusión arterial, la hormona puede ser capaz de potenciar las respuestas neovascularizadoras estimulada por la hipoxemia y el incremento de las fuerzas de cizallamiento en las colaterales, principalmente a nivel local. Cuanto más grave sea la isquemia, más señales habrá para que la hormona sea segregada y más eficaz será. No obstante, es poco probable que un solo factor sea suficiente para mejorar los mecanismos fisiológicos necesarios para la recuperación. La combinación de factores de crecimiento y células madre dará como resultado el mayor beneficio en este tipo de pacientes. Los ensayos clínicos con mayores tamaños muestrales permitirán determinar, finalmente, si la GH es útil para tratar a pacientes con isquemia, mitigando síntomas y ayudando a disminuir las amputaciones.

Las heridas en personas sanas nunca son un problema. Es en los pacientes con una condición mórbida cuando nos deben de preocupar. Cuando se habla de pacientes con enfermedad arterial periférica, no se debe perder la dimensión de que no sólo debemos tratar sus heridas, sino que se debe tratar todo el paciente. Por tanto, un enfoque global será más beneficioso, no sólo para acelerar el proceso de curación, sino también para disminuir la posibilidad de una nueva recaída.

Los pacientes con deficiencia de GH tienen un alto riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, y la terapia de reemplazo mejora significativamente el sistema cardiovascular de estos pacientes. Tanto los trabajos experimentales como clínicos sugieren un incremento en la biodisponibilidad del NO como responsable de dicha mejoría. Sin embargo, los mecanismos exactos de la regulación de la eNOS por la GH aún no se conocen completamente. Según defendemos en esta tesis, podrían derivar más hacia el control de la sobreproducción de ROS, más que incrementar eNOS.

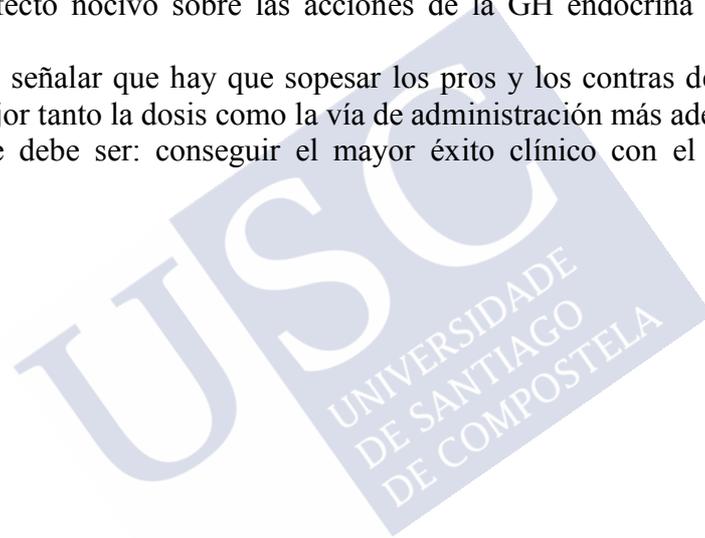
¿Por qué debería considerarse la GH como un agente terapéutico prometedor para la neovascularización en pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores?

La respuesta es sencilla. Tras exponer todas las evidencias sobre el papel que la GH, tanto endocrina como autocrina, acomete en el endotelio, directa o indirectamente, y entendiendo el papel que dicha hormona juega durante la vasculogénesis embriológica, así como en los procesos fisiológicos de neovascularización, es fácil responder que el eje GH/IGF-I es uno de los grandes olvidados en los estudios de neovascularización, y que debería tenerse en cuenta como una herramienta más a considerar. La familia GH/PRL/PL regula el crecimiento fisiológico y la regresión de los vasos sanguíneos en los órganos reproductivos femeninos, y este hecho apoya fuertemente su papel vascular en la neovascularización. No cabe duda de que el eje GH/IGF-I tiene que desempeñar un papel importante en este proceso de defensa del organismo tras la oclusión de un vaso. Sin

embargo, se ha expuesto cómo este eje sufre un importante declive con el envejecimiento. Teniendo en cuenta que la mayoría de los pacientes con lesiones isquémicas de miembros inferiores son de edad avanzada, la terapia con GH podría considerarse una ayuda para mejorar la vascularización y mitigar los síntomas de la falta de flujo sanguíneo a nivel del pie, aunque nunca como terapia aislada ni puntual, sino repetida en el tiempo y combinada con otros factores/células.

Sin embargo, la información relativa a la regulación de la neovascularización por las hormonas proangiogénicas como la GH es aún insuficiente, ya que se han estudiado a fondo pocas condiciones fisiológicas o patológicas, comunicándose excepciones en cuanto a resultados beneficiosos. Este hecho podría explicarse por el uso de diferentes modelos animales de isquemia, tipos de tejido analizados, estado de la enfermedad, dosis de la hormona o tiempos de seguimiento. Estos efectos dependerán, también, de la contribución de la producción local de hormona o de la escisión hormonal por proteasas, o del aclaramiento de GH a nivel renal. Sorprendentemente, los datos también son limitados en cuanto a las sustancias antiangiogénicas producidas endógenamente que podrían estar sobreexpresadas en estados crónicos como la isquemia crítica, y que podrían actuar con un efecto nocivo sobre las acciones de la GH endocrina o exógenamente administrada.

Por último, cabe señalar que hay que sopesar los pros y los contras del uso de la GH, investigando mejor tanto la dosis como la vía de administración más adecuada, ya que el objetivo siempre debe ser: conseguir el mayor éxito clínico con el menor perjuicio posible.





CONCLUSIONES

- La Hormona de Crecimiento (GH) y el eje GH/IGF-I tienen un papel clave en la regulación de la homeostasis vascular.
- La GH, aplicada de forma sistémica, parece disminuir el estado proinflamatorio de los pacientes con isquemia crítica de las extremidades inferiores medido por el TNF- α .
- La GH, aplicada de forma sistémica, parece disminuir el desbalance redox de los pacientes con isquemia crítica de las extremidades inferiores medido por la NOX4.
- La GH, aplicada sistémica o localmente, parece incrementar la cicatrización de las lesiones tróficas asociadas a la isquemia de miembros inferiores, así como disminuir el dolor de reposo, medidos por escalas visuales.
- La GH, aplicada sistémicamente, podría incrementar el flujo, tanto capilar (angiogénesis) como de colaterales (arteriogénesis) en pacientes con isquemia de miembros inferiores, medido mediante SPECT-MIBI y fotopleletismografía.
- Por tanto, la GH, aplicada sistémicamente, podría ser útil para el tratamiento de la enfermedad vascular periférica en su estado crítico, especialmente en pacientes sin posibilidades de revascularización.



BIBLIOGRAFÍA

1. Owens C, Conte M. Atherosclerosis. In: Saunder, editor. Rutherford's Vascular surgery. 7th ed. Philadelphia; 2010. p. 53.
2. Krüger-Genge, Blocki, Franke, Jung. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep 7;20(18):4411.
3. Lipowsky HH. Microvascular rheology and hemodynamics. *Microcirculation*. 2005;12(1):5–15.
4. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch*. 2007 Jun;454(3):345–59.
5. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch*. 2000 Sep;440(5):653–66.
6. Curry FE, Adamson RH. Endothelial glycocalyx: permeability barrier and mechanosensor. *Ann Biomed Eng*. 2012 Apr;40(4):828–39.
7. Becker BF, Chappell D, Bruegger D, Annecke T, Jacob M. Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovasc Res*. 2010 Jul 15;87(2):300–10.
8. Michel CC, Curry FE. Microvascular permeability. *Physiol Rev*. 1999 Jul;79(3):703–61.
9. Crone C. Permeability of single capillaries compared with results from whole-organ studies. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1979;463:75–80.
10. Schwartz SM, Gajdusek CM, Reidy MA, Selden SC, Haudenschild CC. Maintenance of integrity in aortic endothelium. *Fed Proc*. 1980 Jul;39(9):2618–25.
11. Levy BI, Tedgui A. Morphologic Aspects of the Large Artery Vascular Wall. In: Levy B.I. TA, editor. *Biology of the Arterial Wall Basic Science for the Cardiologist* Vol1. Boston, MA: Springer; 1999. p. 3–12.
12. Caicedo D, Díaz O, Devesa P, Devesa J. Growth Hormone (GH) and Cardiovascular System. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 18;19(1):290.
13. Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Selwyn AP, Ganz P, Yeung AC, et al. Flow-induced vasodilation of the human brachial artery is impaired in patients <40 years of age with coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1996 Dec 1;78(11):1210–4.
14. Limaye V, Vadas M. The vascular endothelium: structure and function. In: Robert Fitridge, Thompson M, editors. *Mechanisms of Vascular Disease: a textbook for vascular surgeons*. 1st ed. New York: Cambridge University Press; 2007. p. 1–10.
15. Camejo G, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Bondjers G. Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis*. 1998 Aug;139(2):205–22.
16. Camejo G, Fager G, Rosengren B, Hurt-Camejo E, Bondjers G. Binding of low density lipoproteins by proteoglycans synthesized by proliferating and quiescent human arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1993 Jul 5;268(19):14131–7.
17. Chan P. Vascular smooth muscle cells: structure and function. In: Cambridge University Press, editor. *Mechanisms of Vascular Disease A Textbook for Vascular Surgeons*. New York; 2007. p. 14.
18. Gadson PF, Rossignol C, McCoy J, Rosenquist TH. Expression of elastin, smooth

- muscle alpha-actin, and c-jun as a function of the embryonic lineage of vascular smooth muscle cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1993 Oct;29A(10):773–81.
19. Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 May;28(5):812–9.
 20. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004 Jul;84(3):767–801.
 21. Ang AH, Tachas G, Campbell JH, Bateman JF, Campbell GR. Collagen synthesis by cultured rabbit aortic smooth-muscle cells. Alteration with phenotype. *Biochem J.* 1990 Jan 15;265(2):461–9.
 22. Campbell GR, Campbell JH. The phenotypes of smooth muscle expressed in human atheroma. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;598(1):143–58.
 23. Majesky MW, Giachelli CM, Reidy MA, Schwartz SM. Rat carotid neointimal smooth muscle cells reexpress a developmentally regulated mRNA phenotype during repair of arterial injury. *Circ Res.* 1992 Oct;71(4):759–68.
 24. Chan P, Patel M, Betteridge L, Munro E, Schachter M, Wolfe J, et al. Abnormal growth regulation of vascular smooth muscle cells by heparin in patients with restenosis. *Lancet (London, England).* 1993 Feb 6;341(8841):341–2.
 25. Wickman A, Friberg P, Adams MA, Matejka GL, Brantsing C, Guron G, et al. Induction of Growth Hormone Receptor and Insulin-Like Growth Factor-I mRNA in Aorta and Caval Vein During Hemodynamic Challenge. *Hypertension.* 1997 Jan;29(1):123–30.
 26. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993 Apr 29;362(6423):801–9.
 27. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med.* 2002 Nov;8(11):1249–56.
 28. Grant MB, Wargovich TJ, Bush DM, Player DW, Caballero S, Foegh M, et al. Expression of IGF-I, IGF-I receptor and TGF- β following balloon angioplasty in atherosclerotic and normal rabbit iliac arteries: An immunocytochemical study. *Regul Pept.* 1999 Jan 1;79(1):47–53.
 29. Caicedo D, Devesa P, Alvarez C V., Devesa J. Why Should Growth Hormone (GH) Be Considered a Promising Therapeutic Agent for Arteriogenesis? Insights from the GHAS Trial. *Cells.* 2020 Mar 27;9(4):807.
 30. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000 Apr;6(4):389–95.
 31. Zalewski A, Shi Y. Vascular myofibroblasts. Lessons from coronary repair and remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Mar;17(3):417–22.
 32. Sumpio B, Chin J. Vessel Wall Biology. In: J.Cronenwentt and K. Johnston, editor. *Rutherford's Vascular surgery: Vascular Biology and Pathophysiology.* 1st ed. Philadelphia: Elsevier; 2015. p. 37.
 33. Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol.* 2003 Sep;196(3):430–43.
 34. Nawroth PP, Stern DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1986 Mar 1;163(3):740–5.
 35. Colucci M, Balconi G, Lorenzet R, Pietra A, Locati D, Donati MB, et al. Cultured human endothelial cells generate tissue factor in response to endotoxin. *J Clin*

- Invest. 1983 Jun 1;71(6):1893–6.
36. Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Cotran RS, Gimbrone MA. Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J Exp Med*. 1984 Aug 1;160(2):618–23.
 37. Galdal KS, Lyberg T, Evensen SA, Nilsen E, Prydz H. Thrombin induces thromboplastin synthesis in cultured vascular endothelial cells. *Thromb Haemost*. 1985 Aug 30;54(2):373–6.
 38. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*. 1992 Dec 18;258(5090):1898–902.
 39. Majano P, Lara-Pezzi E, López-Cabrera M, Apolinario A, Moreno-Otero R, García-Monzón C. Hepatitis B virus X protein transactivates inducible nitric oxide synthase gene promoter through the proximal nuclear factor kappaB-binding site: evidence that cytoplasmic location of X protein is essential for gene transactivation. *Hepatology*. 2001 Dec;34(6):1218–24.
 40. Taylor BS, Kim YM, Wang Q, Shapiro RA, Billiar TR, Geller DA. Nitric oxide down-regulates hepatocyte-inducible nitric oxide synthase gene expression. *Arch Surg*. 1997 Nov;132(11):1177–83.
 41. Gilkeson GS, Mudgett JS, Seldin MF, Ruiz P, Alexander AA, Misukonis MA, et al. Clinical and serologic manifestations of autoimmune disease in MRL-lpr/lpr mice lacking nitric oxide synthase type 2. *J Exp Med*. 1997 Aug 4;186(3):365–73.
 42. Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 17;93(19):10417–22.
 43. Mees B, Wagner S, Ninci E, Tribulova S, Martin S, van Haperen R, et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity Is Essential for Vasodilation During Blood Flow Recovery but not for Arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Sep;27(9):1926–33.
 44. Schaper W. Multiple Pathways converge in the Development of a Collateral Circulation (Arteriogenesis). In: Deindl E, Schaper W, editors. *Arteriogenesis – Molecular Regulation, Pathophysiology and Therapeutics I*. Aachen (Germany): Shaker Verlag; 2011. p. 67–71.
 45. Caicedo D, Devesa J. Growth Hormone (GH) and Wound Healing. In: *Wound Healing - Current Perspectives*. IntechOpen; 2019. p. 116–24.
 46. Caicedo D, Devesa P, Arce VM, Requena J, Devesa J. Chronic limb-threatening ischemia could benefit from growth hormone therapy for wound healing and limb salvage. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2018 Feb 22;12(2):53–72.
 47. Venema RC, Nishida K, Alexander RW, Harrison DG, Murphy TJ. Organization of the bovine gene encoding the endothelial nitric oxide synthase. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Aug 2;1218(3):413–20.
 48. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Physiol*. 2001 Feb 1;280(2):F193–206.
 49. Walford G, Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost*. 2003 Oct;1(10):2112–8.
 50. Mendelsohn ME, O'Neill S, George D, Loscalzo J. Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine. *J Biol Chem*. 1990 Nov

- 5;265(31):19028–34.
51. Michelson AD, Benoit SE, Furman MI, Breckwoldt WL, Rohrer MJ, Barnard MR, et al. Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *Am J Physiol*. 1996 May;270(5 Pt 2):H1640-8.
 52. Pigazzi A, Heydrick S, Folli F, Benoit S, Michelson A, Loscalzo J. Nitric oxide inhibits thrombin receptor-activating peptide-induced phosphoinositide 3-kinase activity in human platelets. *J Biol Chem*. 1999 May 14;274(20):14368–75.
 53. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*. 1995 Jul;96(1):60–8.
 54. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jun 1;88(11):4651–5.
 55. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1989 May;83(5):1774–7.
 56. Marks DS, Vita JA, Folts JD, Keaney JF, Welch GN, Loscalzo J. Inhibition of neointimal proliferation in rabbits after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide. *J Clin Invest*. 1995 Dec;96(6):2630–8.
 57. Fleming I, Bauersachs J, Busse R. Paracrine functions of the coronary vascular endothelium. *Mol Cell Biochem*. 1996;157(1–2):137–45.
 58. Moncada S, Higgs EA, Vane JR. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin x), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet* (London, England). 1977 Jan 1;1(8001):18–20.
 59. Ahmad A, Dempsey S, Daneva Z, Azam M, Li N, Li P-L, et al. Role of Nitric Oxide in the Cardiovascular and Renal Systems. *Int J Mol Sci*. 2018 Sep 3;19(9):2605.
 60. Komori K, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Blood Vessels*. 1990;27(2–5):238–45.
 61. Wang H, Lin L, Jiang J, Wang Y, Lu ZY, Bradbury JA, et al. Up-regulation of endothelial nitric-oxide synthase by endothelium-derived hyperpolarizing factor involves mitogen-activated protein kinase and protein kinase C signaling pathways. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Nov;307(2):753–64.
 62. Tomioka H, Hattori Y, Fukao M, Sato A, Liu M, Sakuma I, et al. Relaxation in different-sized rat blood vessels mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor: importance of processes mediating precontractions. *J Vasc Res*. 1999;36(4):311–20.
 63. Chien S. Effects of disturbed flow on endothelial cells. *Ann Biomed Eng*. 2008 Apr;36(4):554–62.
 64. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1988 Mar;93(3):515–24.
 65. Garland CJ, Dora KA. EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017;219(1):152–61.
 66. Vanhoutte PM, Tang EHC. Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad! *J Physiol*. 2008 Nov 15;586(22):5295–304.
 67. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.

- Nature. 1988 Mar 31;332(6163):411–5.
68. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:851–76.
 69. Rubanyi GM, Botelho LHP. Endothelins 1. *FASEB J.* 1991 Sep;5(12):2713–20.
 70. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med.* 1995 Aug 10;333(6):356–63.
 71. de Nucci G, Thomas R, D’Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, et al. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Dec;85(24):9797–800.
 72. Yoshimoto S, Ishizaki Y, Sasaki T, Murota S. Effect of carbon dioxide and oxygen on endothelin production by cultured porcine cerebral endothelial cells. *Stroke.* 1991 Mar;22(3):378–83.
 73. Hu RM, Levin ER, Pedram A, Frank HJL. Atrial natriuretic peptide inhibits the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. Mediation through the C receptor. *J Biol Chem.* 1992 Aug 25;267(24):17384–9.
 74. Hu RM, Chuang MY, Prins B, Kashyap ML, Frank HJL, Pedram A, et al. High density lipoproteins stimulate the production and secretion of endothelin-1 from cultured bovine aortic endothelial cells. *J Clin Invest.* 1994 Mar;93(3):1056–62.
 75. Boulanger C, Lüscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest.* 1990 Feb;85(2):587–90.
 76. Prins BA, Hu RM, Nazario B, Pedram A, Frank HJL, Weber MA, et al. Prostaglandin E2 and prostacyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. *J Biol Chem.* 1994 Apr 22;269(16):11938–44.
 77. Aird WC. Endothelial cell heterogeneity. *Crit Care Med.* 2003 Apr;31(4 Suppl):S221–30.
 78. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 2007 Feb 2;100(2):158–73.
 79. Pries AR, Kuebler WM. Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(176 Pt 1):1–40.
 80. Lin F-J, Tsai M-J, Tsai SY. Artery and vein formation: a tug of war between different forces. *EMBO Rep.* 2007 Oct;8(10):920–4.
 81. Carver LA, Schnitzer JE. Proteomic Mapping of Endothelium and Vascular Targeting in Vivo. In: Aird WC, editor. *Endothelial Biomedicine.* Cambridge: Cambridge University Press; 2007. p. 881–97.
 82. Franke R-P, Fuhrmann R, Hiebl B, Jung F. Influence of various radiographic contrast media on the buckling of endothelial cells. *Microvasc Res.* 2008 Aug;76(2):110–3.
 83. Freudenberg N, Riese KH, Freudenberg MA. The vascular endothelial system. Structure--function--pathology--reaction to endotoxin shock--methods of investigation. *Veroff Pathol.* 1983;120:1–114.
 84. Gebrane-Younès J, Drouet L, Caen JP, Orcel L. Heterogeneous distribution of Weibel-Palade bodies and von Willebrand factor along the porcine vascular tree. *Am J Pathol.* 1991 Dec;139(6):1471–84.
 85. Gerritsen ME, Printz MP. Sites of prostaglandin synthesis in the bovine heart and isolated bovine coronary microvessels. *Circ Res.* 1981 Nov;49(5):1152–63.
 86. Johnson AR. Human pulmonary endothelial cells in culture. Activities of cells

- from arteries and cells from veins. *J Clin Invest*. 1980 Apr;65(4):841–50.
87. van den Berg BM, Nieuwdorp M, Stroes ESG, Vink H. Glycocalyx and endothelial (dys) function: from mice to men. *Pharmacol Rep*. 2006;58 Suppl:75–80.
 88. Mackie K, Lai Y, Nairn AC, Greengard P, Pitt BR, Lazo JS. Protein phosphorylation in cultured endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1986 Sep;128(3):367–74.
 89. Snopko R, Guffy T, Rafelson M, Hall E. Serum stimulation of prostacyclin synthesis in aortically, venously and microvascularly derived endothelial cells. *Clin Physiol Biochem*. 1987;5(2):70–6.
 90. Franke RP, Fuhrmann R, Mrowietz C, Hiebl B, Jung F. Do radiographic contrast media (Iodixanol or Iomeprol) induce a perturbation of human arterial and/or venous endothelial cells in vitro on extracellular matrix? *Clin Hemorheol Microcirc*. 2012;50(1–2):49–54.
 91. Defilippi P, van Hinsbergh V, Bertolotto A, Rossino P, Silengo L, Tarone G. Differential distribution and modulation of expression of alpha 1/beta 1 integrin on human endothelial cells. *J Cell Biol*. 1991 Aug;114(4):855–63.
 92. Hauser S, Jung F, Pietzsch J. Human Endothelial Cell Models in Biomaterial Research. *Trends Biotechnol*. 2017;35(3):265–77.
 93. Hecker M, Mülsch A, Bassenge E, Förstermann U, Busse R. Subcellular localization and characterization of nitric oxide synthase(s) in endothelial cells: physiological implications. *Biochem J*. 1994 Apr 1;299 (Pt 1):247–52.
 94. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993 Dec 30;329(27):2002–12.
 95. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*. 1994 May 13;269(19):13725–8.
 96. Gaston B, Drazen JM, Loscalzo J, Stamler JS. The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Feb;149(2 Pt 1):538–51.
 97. Barnes PJ. Nitric oxide and airway disease. *Ann Med*. 1995 Jun;27(3):389–93.
 98. Anderson RGW, Kamen BA, Rothberg KG, Lacey SW. Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science*. 1992 Jan 24;255(5043):410–1.
 99. Conrad PA, Smart EJ, Ying YS, Anderson RGW, Bloom GS. Caveolin cycles between plasma membrane caveolae and the Golgi complex by microtubule-dependent and microtubule-independent steps. *J Cell Biol*. 1995 Dec;131(6 Pt 1):1421–33.
 100. Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, et al. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem*. 1996 Mar 15;271(11):6518–22.
 101. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jul 15;89(14):6348–52.
 102. Robinson LJ, Michel T. Mutagenesis of palmitoylation sites in endothelial nitric oxide synthase identifies a novel motif for dual acylation and subcellular targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 5;92(25):11776–80.
 103. Liu J, García-Cardena G, Sessa WC. Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization. *Biochemistry*. 1996 Oct 15;35(41):13277–81.

104. Sowa G, Liu J, Papapetropoulos A, Rex-Haffner M, Hughes TE, Sessa WC. Trafficking of endothelial nitric-oxide synthase in living cells. Quantitative evidence supporting the role of palmitoylation as a kinetic trapping mechanism limiting membrane diffusion. *J Biol Chem*. 1999 Aug 6;274(32):22524–31.
105. Plane F, Jacobs M, McManus D, Bruckdorfer KR. Probucol and other antioxidants prevent the inhibition of endothelium-dependent relaxation by low density lipoproteins. *Atherosclerosis*. 1993 Oct;103(1):73–9.
106. Blair A, Shaul PW, Yuhanna IS, Conrad PA, Smart EJ. Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J Biol Chem*. 1999 Nov 5;274(45):32512–9.
107. Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem*. 1994 Aug 19;269(33):21003–9.
108. Rigotti A, Trigatti BL, Penman M, Rayburn H, Herz J, Krieger M. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Nov 11;94(23):12610–5.
109. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, et al. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med*. 2001 Jul;7(7):853–7.
110. García-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, et al. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem*. 1997 Oct 10;272(41):25437–40.
111. Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem*. 1997 Jul 25;272(30):18522–5.
112. Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem*. 1997 Jun 20;272(25):15583–6.
113. Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T. Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1997 Oct 10;272(41):25907–12.
114. García-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, et al. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*. 1998 Apr 23;392(6678):821–4.
115. Goetz RM, Thatte HS, Prabhakar P, Cho MR, Michel T, Golan DE. Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 16;96(6):2788–93.
116. Gosink EC, Forsberg EJ. Effects of ATP and bradykinin on endothelial cell Ca²⁺ homeostasis and formation of cGMP and prostacyclin. *Am J Physiol*. 1993 Dec;265(6 Pt 1):C1620-9.
117. Papapetropoulos A, García-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1997 Dec 15;100(12):3131–9.
118. Ayajiki K, Kindermann M, Hecker M, Fleming I, Busse R. Intracellular pH and

- tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ Res.* 1996 May;78(5):750–8.
119. Fleming I, Bauersachs J, Schäfer A, Scholz D, Aldershvile J, Busse R. Isometric contraction induces the Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Feb 2;96(3):1123–8.
 120. Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest.* 1999 Feb;103(3):401–6.
 121. Bernier SG, Haldar S, Michel T. Bradykinin-regulated interactions of the mitogen-activated protein kinase pathway with the endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2000 Sep 29;275(39):30707–15.
 122. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 1999 Jun 10;340(23):1801–11.
 123. Chambliss KL, Yuhanna IS, Mineo C, Liu P, German Z, Sherman TS, et al. Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circ Res.* 2000 Nov 24;87(11):E44–52.
 124. Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H, Hayakawa J, Kanda Y, Nishio Y, et al. Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2001 Feb 2;276(5):3459–67.
 125. Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, et al. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res.* 2000 Oct 13;87(8):677–82.
 126. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999 Jun;399(6736):601–5.
 127. Gallis B, Corthals GL, Goodlett DR, Ueba H, Kim F, Presnell SR, et al. Identification of flow-dependent endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *J Biol Chem.* 1999 Oct 15;274(42):30101–8.
 128. Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, Rodriguez-Crespo I, Tiganis T, Bozinovski S, et al. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr Biol.* 1999;9(15):845–8.
 129. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 1999 Jun 10;399(6736):597–601.
 130. Gonzalez C, Rosas-Hernandez H, Jurado-Manzano B, Ramirez-Lee MA, Salazar-Garcia S, Martinez-Cuevas PP, et al. The prolactin family hormones regulate vascular tone through NO and prostacyclin production in isolated rat aortic rings. *Acta Pharmacol Sin.* 2015 May 1;36(5):572–86.
 131. Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, et al. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett.* 1999 Jan 29;443(3):285–9.
 132. Michell BJ, Chen ZP, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, et al. Coordinated Control of Endothelial Nitric-oxide Synthase Phosphorylation by Protein Kinase C and the cAMP-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem.* 2001;

133. Deindl E, Quax PHA. Arteriogenesis and Therapeutic Angiogenesis in Its Multiple Aspects. *Cells*. 2020 Jun 10;9(6):1439.
134. Heil M, Schaper W. Insights into Pathways of Arteriogenesis. *Curr Pharm Biotechnol*. 2007;8(1):35–42.
135. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997 Feb 14;275(5302):964–7.
136. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28;97(7):3422–7.
137. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki KI, Eguchi H, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 2000 Jun;105(11):1527–36.
138. Boger DL, Goldberg J, Silletti S, Kessler T, Cheresh DA. Identification of a novel class of small-molecule antiangiogenic agents through the screening of combinatorial libraries which function by inhibiting the binding and localization of proteinase MMP2 to integrin alpha(V)beta(3). *J Am Chem Soc*. 2001 Feb 21;123(7):1280–8.
139. Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F. Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J*. 1999 Feb 15;18(4):882–92.
140. Horenstein AL, Stockinger H, Imhof BA, Malavasi F. CD38 binding to human myeloid cells is mediated by mouse and human CD31. *Biochem J*. 1998 Mar 15;330 (Pt 3)(3):1129–35.
141. Nguyen M, Strubel NA, Bischoff J. A role for sialyl Lewis-X/A glycoconjugates in capillary morphogenesis. *Nature*. 1993 Sep 16;365(6443):267–9.
142. Koch AE, Halloran MM, Haskell CJ, Shah MR, Polverini PJ. Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature*. 1995 Aug 10;376(6540):517–9.
143. Pyne S, Pyne NJ. Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J*. 2000 Jul 15;349(Pt 2):385–402.
144. Spiegel S, Milstien S. Functions of a new family of sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Apr 12;1484(2–3):107–16.
145. English D, Welch Z, Kovalica AT, Harvey K, Volpert O V., Brindley DN, et al. Sphingosine 1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis. *FASEB J*. 2000 Nov;14(14):2255–65.
146. Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, et al. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell*. 1999 Oct 29;99(3):301–12.
147. Wang F, Van Brocklyn JR, Hobson JP, Movafagh S, Zukowska-Grojec Z, Milstien S, et al. Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *J Biol Chem*. 1999 Dec 10;274(50):35343–50.
148. Boguslawski G, Grogg JR, Welch Z, Ciechanowicz S, Sliva D, Kovalica AT, et al. Migration of vascular smooth muscle cells induced by sphingosine 1-phosphate and related lipids: potential role in the angiogenic response. *Exp Cell Res*. 2002

- Apr 1;274(2):264–74.
149. Hobson JP, Rosenfeldt HM, Barak LS, Olivera A, Poulton S, Caron MG, et al. Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science*. 2001 Mar 2;291(5509):1800–3.
 150. Alderton F, Rakhit S, Kong KC, Palmer T, Sambhi B, Pyne S, et al. Tethering of the platelet-derived growth factor beta receptor to G-protein-coupled receptors. A novel platform for integrative signaling by these receptor classes in mammalian cells. *J Biol Chem*. 2001 Jul 27;276(30):28578–85.
 151. Rosenfeldt HM, Hobson JP, Maceyka M, Olivera A, Nava VE, Milstien S, et al. EDG-1 links the PDGF receptor to Src and focal adhesion kinase activation leading to lamellipodia formation and cell migration. *FASEB J*. 2001 Dec;15(14):2649–59.
 152. Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, et al. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest*. 2000 Oct;106(8):951–61.
 153. Davis GE, Senger DR. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res*. 2005 Nov 25;97(11):1093–107.
 154. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*. 1995 Jan;1(1):27–31.
 155. Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*. 2004 Feb;16(1):42–7.
 156. Ushio-Fukai M. VEGF signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxid Redox Signal*. 2007 Jun;9(6):731–9.
 157. Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, et al. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation*. 2004 Jan 20;109(2):227–33.
 158. Van Buul JD, Fernandez-Borja M, Anthony EC, Hordijk PL. Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(3–4):308–17.
 159. Montezano AC, Touyz RM. Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012 Jan;110(1):87–94.
 160. Fernandes DC, Manoel AHO, Wosniak J, Laurindo FR. Protein disulfide isomerase overexpression in vascular smooth muscle cells induces spontaneous preemptive NADPH oxidase activation and Nox1 mRNA expression: effects of nitrosothiol exposure. *Arch Biochem Biophys*. 2009 Apr 15;484(2):197–204.
 161. Chen J-X, Zeng H, Tuo Q-H, Yu H, Meyrick B, Aschner JL. NADPH oxidase modulates myocardial Akt, ERK1/2 activation, and angiogenesis after hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Apr;292(4):H1664-74.
 162. Xia C, Meng Q, Liu L-Z, Rojanasakul Y, Wang X-R, Jiang B-H. Reactive Oxygen Species Regulate Angiogenesis and Tumor Growth through Vascular Endothelial Growth Factor. *Cancer Res*. 2007 Nov 15;67(22):10823–30.
 163. Kim YM, Kim KE, Koh GY, Ho Y-S, Lee K-J. Hydrogen peroxide produced by angiopoietin-1 mediates angiogenesis. *Cancer Res*. 2006 Jun 15;66(12):6167–74.
 164. Zhang DX, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007

- May;292(5):H2023-31.
165. von Löhneysen K, Noack D, Wood MR, Friedman JS, Knaus UG. Structural insights into Nox4 and Nox2: motifs involved in function and cellular localization. *Mol Cell Biol*. 2010 Feb;30(4):961–75.
 166. Coso S, Harrison I, Harrison CB, Vinh A, Sobey CG, Drummond GR, et al. NADPH oxidases as regulators of tumor angiogenesis: current and emerging concepts. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Jun 1;16(11):1229–47.
 167. Yasuda M, Ohzeki Y, Shimizu S, Naito S, Ohtsuru A, Yamamoto T, et al. Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. *Life Sci*. 1999;64(4):249–58.
 168. Craig SM, Chen K, Pei Y, Li C, Huang X, Chen C, et al. NADPH oxidase 4 promotes endothelial angiogenesis through endothelial nitric oxide synthase activation. *Circulation*. 2011 Aug 9;124(6):731–40.
 169. Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Waltenberger J, et al. Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *J Biol Chem*. 2002 Feb 1;277(5):3101–8.
 170. Zhuang J, Jiang T, Lu D, Luo Y, Zheng C, Feng J, et al. NADPH oxidase 4 mediates reactive oxygen species induction of CD146 dimerization in VEGF signal transduction. *Free Radic Biol Med*. 2010 Jul 15;49(2):227–36.
 171. Peshavariya H, Dusting GJ, Jiang F, Halmos LR, Sobey CG, Drummond GR, et al. NADPH oxidase isoform selective regulation of endothelial cell proliferation and survival. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2009 Aug;380(2):193–204.
 172. Chua CC, Hamdy RC, Chua BH. Upregulation of vascular endothelial growth factor by H₂O₂ in rat heart endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 1998 Nov 15;25(8):891–7.
 173. Maulik N, Das DK. Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radic Biol Med*. 2002 Oct 15;33(8):1047–60.
 174. Kuroki M, Voest EE, Amano S, Beerepoot L V, Takashima S, Tolentino M, et al. Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 1996 Oct 1;98(7):1667–75.
 175. Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, Dikalov SI, Ma Y, Fujimoto M, et al. Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res*. 2002 Dec 13;91(12):1160–7.
 176. Tojo T, Ushio-Fukai M, Yamaoka-Tojo M, Ikeda S, Patrushev N, Alexander RW. Role of gp91phox (Nox2)-containing NAD(P)H oxidase in angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Circulation*. 2005 May 10;111(18):2347–55.
 177. Nijmeh J, Moldobaeva A, Wagner EM. Role of ROS in ischemia-induced lung angiogenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010 Oct;299(4):L535-41.
 178. Judkins CP, Diep H, Broughton BRS, Mast AE, Hooker EU, Miller AA, et al. Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Jan;298(1):H24-32.
 179. Haddad P, Dussault S, Groleau J, Turgeon J, Michaud S-E, Ménard C, et al. Nox2-containing NADPH oxidase deficiency confers protection from hindlimb ischemia in conditions of increased oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Oct;29(10):1522–8.

180. Pattillo CB, Pardue S, Shen X, Fang K, Langston W, Jourdeuil D, et al. ICAM-1 cytoplasmic tail regulates endothelial glutathione synthesis through a NOX4/PI3-kinase-dependent pathway. *Free Radic Biol Med*. 2010 Sep 15;49(6):1119–28.
181. Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*. 2001 Dec 11;2001(112):re21.
182. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*. 2003;9(6):677–84.
183. Chavakis E, Dimmeler S. Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Jun 1;22(6):887–93.
184. Wahlberg E. Angiogenesis and arteriogenesis in limb ischemia. *J Vasc Surg*. 2003 Jul;38(1):198–203.
185. Li F, Sawada J, Komatsu M. R-Ras-Akt axis induces endothelial lumenogenesis and regulates the patency of regenerating vasculature. *Nat Commun*. 2017 Dec 23;8(1):1720.
186. Parker LH, Schmidt M, Jin S-W, Gray AM, Beis D, Pham T, et al. The endothelial-cell-derived secreted factor Egfl7 regulates vascular tube formation. *Nature*. 2004 Apr 15;428(6984):754–8.
187. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jun;8(6):464–78.
188. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9(6):653–60.
189. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):685–93.
190. Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res*. 2007;100(6):782–94.
191. Ashrafpour H, Huang N, Neligan PC, Forrest CR, Addison PD, Moses MA, et al. Vasodilator effect and mechanism of action of vascular endothelial growth factor in skin vasculature. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 2004;286(3):H946–54.
192. Gridley T. Notch signaling in vascular development and physiology. *Development*. 2007;134(15):2709–18.
193. Kamei M, Saunders WB, Bayless KJ, Dye L, Davis GE, Weinstein BM. Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature*. 2006 Jul 27;442(7101):453–6.
194. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res*. 2005 May 15;65(10):3967–79.
195. Ribatti D, Crivellato E. “Sprouting angiogenesis”, a reappraisal. *Dev Biol*. 2012 Dec 15;372(2):157–65.
196. De Spiegelaere W, Casteleyn C, Van den Broeck W, Plendl J, Bahramsoltani M, Simoons P, et al. Intussusceptive angiogenesis: a biologically relevant form of angiogenesis. *J Vasc Res*. 2012;49(5):390–404.
197. Eilken HM, Adams RH. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol*. 2010 Oct;22(5):617–25.
198. Geudens I, Gerhardt H. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development*. 2011 Nov;138(21):4569–83.
199. Tung JJ, Tattersall IW, Kitajewski J. Tips, stalks, tubes: notch-mediated cell fate determination and mechanisms of tubulogenesis during angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Feb;2(2):a006601.
200. Wacker A, Gerhardt H. Endothelial development taking shape. *Curr Opin Cell*

- Biol. 2011 Dec;23(6):676–85.
201. De Smet F, Segura I, De Bock K, Hohensinner PJ, Carmeliet P. Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 May;29(5):639–49.
 202. Napp L, Limbourg F. Notch signaling in arteries: from embryological development to postnatal homeostasis and growth. In: W.Schaper, E.Deindl, editors. *Arteriogenesis – Molecular Regulation, Pathophysiology and Therapeutics I.* Aachen, Germany: Shaker Verlag Publishing; 2011. p. 39–65.
 203. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol.* 2003;161(6):1163–77.
 204. Mazzone M, Dettori D, de Oliveira RL, Loges S, Schmidt T, Jonckx B, et al. Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. *Cell.* 2009 Mar 6;136(5):839–51.
 205. Burri PH, Tarek MR. A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat Rec.* 1990 Sep;228(1):35–45.
 206. Caduff JH, Fischer LC, Burri PH. Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *Anat Rec.* 1986 Oct;216(2):154–64.
 207. Djonov V, Baum O, Burri PH. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 2003 Oct;314(1):107–17.
 208. Djonov V, Schmid M, Tschanz SA, Burri PH. Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. *Circ Res.* 2000 Feb 18;86(3):286–92.
 209. Burri PH, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis--the alternative to capillary sprouting. *Mol Aspects Med.* 2002 Dec;23(6S):S1-27.
 210. Makanya AN, Hlushchuk R, Djonov VG. Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis.* 2009;12(2):113–23.
 211. Djonov VG, Kurz H, Burri PH. Optimality in the developing vascular system: branching remodeling by means of intussusception as an efficient adaptation mechanism. *Dev Dyn.* 2002 Aug;224(4):391–402.
 212. Strilić B, Kucera T, Eglinger J, Hughes MR, McNagny KM, Tsukita S, et al. The molecular basis of vascular lumen formation in the developing mouse aorta. *Dev Cell.* 2009 Oct;17(4):505–15.
 213. Lampugnani MG, Orsenigo F, Rudini N, Maddaluno L, Boulday G, Chapon F, et al. CCM1 regulates vascular-lumen organization by inducing endothelial polarity. *J Cell Sci.* 2010 Apr 1;123(Pt 7):1073–80.
 214. Suchting S, Freitas C, le Noble F, Benedito R, Bréant C, Duarte A, et al. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 27;104(9):3225–30.
 215. Blanco R, Gerhardt H. VEGF and Notch in Tip and Stalk Cell Selection. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Jan 1;3(1):a006569–a006569.
 216. Funahashi Y, Shawber CJ, Vorontchikhina M, Sharma A, Outtz HH, Kitajewski J. Notch regulates the angiogenic response via induction of VEGFR-1. *J Angiogenesis Res.* 2010 Jan 26;2(1):3.
 217. Hellström M, Phng L-K, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, Lindblom P, et al.

- Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*. 2007;445(7129):776–80.
218. Leslie JD, Ariza-McNaughton L, Bermange AL, McAdow R, Johnson SL, Lewis J. Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis. *Development*. 2007;134(5):839–44.
 219. Lobov IB, Renard RA, Papadopoulos N, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, et al. Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 27;104(9):3219–24.
 220. Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, Murtomäki A, Suchting S, Wirzenius M, et al. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature*. 2008 Jul 31;454(7204):656–60.
 221. Siekmann AF, Lawson ND. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature*. 2007;445(7129):781–4.
 222. Patel-Hett S, D'Amore PA. Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *Int J Dev Biol*. 2011;55(4–5):353–69.
 223. Kume T. Novel insights into the differential functions of Notch ligands in vascular formation. *J Angiogenes Res*. 2009 Nov 16;1:8.
 224. Holderfield MT, Hughes CCW. Crosstalk between vascular endothelial growth factor, notch, and transforming growth factor-beta in vascular morphogenesis. *Circ Res*. 2008 Mar 28;102(6):637–52.
 225. Benedito R, Roca C, Sörensen I, Adams S, Gossler A, Fruttiger M, et al. The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell*. 2009 Jun 12;137(6):1124–35.
 226. Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Jul 1;23(7):1143–51.
 227. Yamaguchi S, Yamaguchi M, Yatsuyanagi E, Yun S-S, Nakajima N, Madri JA, et al. Cyclic strain stimulates early growth response gene product 1-mediated expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium. *Lab Invest*. 2002 Jul;82(7):949–56.
 228. 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 Jan 1;101(1):40–50.
 229. Buschmann I, Schaper W. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol*. 2000 Feb;190(3):338–42.
 230. Peirce SM, Skalak TC. Microvascular remodeling: a complex continuum spanning angiogenesis to arteriogenesis. *Microcirculation*. 2003 Jan;10(1):99–111.
 231. Schaper W. Collateral circulation: past and present. *Basic Res Cardiol*. 2009 Jan;104(1):5–21.
 232. Hellingman A, Seghers L, Quax P, Van Weel V. Bone Marrow Derived Cells in Arteriogenesis: a Crucial Role for Leukocytes. In: Deindl E, Schaper W, editors. *Arteriogenesis – Molecular Regulation, Pathophysiology and Therapeutics I*. Aachen (Germany): Shaker Verlag; 2011. p. 145–50.
 233. Lamb K, Dimuzio P. Arteriogenesis and Angiogenesis. In: Cronenwett JL, Johnston K, editors. *Rutherford's Vascular surgery: Vascular Biology and Pathophysiology*. 1st ed. Philadelphia: Elsevier Inc.; 2014. p. 99-112.e4.
 234. Arkins S, Rebeiz N, Biragyn A, Reese DL, Kelley KW. Murine macrophages express abundant insulin-like growth factor-I class I Ea and Eb transcripts.

- Endocrinology. 1993 Nov;133(5):2334–43.
235. Baxter J, Blalock J, Weigent D. Characterization of Immunoreactive Insulin-Like Growth Factor-I from Leukocytes and Its Regulation by Growth Hormone*. Endocrinology. 1991 Oct;129(4):1727–34.
 236. Gow DJ, Sester DP, Hume DA. CSF-1, IGF-I, and the control of postnatal growth and development. J Leukoc Biol. 2010 Sep;88(3):475–81.
 237. Scholz D, Ito W, Fleming I, Deindl E, Sauer A, Wiesnet M, et al. Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). Virchows Arch. 2000 Mar 10;436(3):257–70.
 238. Endean ED, Maley BE. Embriology. In: Cronenwett JL, Johnston KW, editors. Rutherford's Vascular surgery: Vascular Biology and Pathophysiology. 1st ed. Philadelphia: Elsevier; 2015. p. 15–21.
 239. Carlson BM. Part.II.Developmento of the body systems. Cardiovascular System. In: Carlson B, editor. Human Embryology and Developmental Biology. 6th ed. St Louis, Missouri: Elsevier; 2019. p. 496.
 240. Byrd N, Grabel L. Hedgehog signaling in murine vasculogenesis and angiogenesis. Trends Cardiovasc Med. 2004 Nov;14(8):308–13.
 241. Zhang W, Yatskievych TA, Baker RK, Antin PB. Regulation of Hex gene expression and initial stages of avian hepatogenesis by Bmp and Fgf signaling. Dev Biol. 2004 Apr 15;268(2):312–26.
 242. Red-Horse K, Crawford Y, Shojaei F, Ferrara N. Endothelium-microenvironment interactions in the developing embryo and in the adult. Dev Cell. 2007 Feb;12(2):181–94.
 243. Senior HD. The development of the arteries of the human lower extremity. Am J Anat. 1919 Jan;25(1):54–95.
 244. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. Lancet. 2002;360(9331):427–35.
 245. Luo F, Wariaro D, Lundberg G, Blegen H, Wahlberg E. Vascular growth factor expression in a rat model of severe limb ischemia. J Surg Res. 2002;108(2):258–67.
 246. Yang Y, Tang G, Yan J, Park B, Hoffman A, Tie G, et al. Cellular and Molecular Mechanism Regulating Blood Flow Recovery in Acute versus Gradual Femoral Artery Occlusion Are Distinct in the Mouse. J Vasc Surg. 2009;48(6):1546–58.
 247. Gardner AW, Parker DE, Montgomery PS, Sosnowska D, Casanegra AI, Esponda OL, et al. Impaired Vascular Endothelial Growth Factor A and Inflammation in Patients With Peripheral Artery Disease. Angiology. 2014 Feb;165(8):683–90.
 248. 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 Mar;39(3):621–8.
 249. Rissanen TT, Vajanto I, Hiltunen MO, Rutanen J, Kettunen MI, Niemi M, 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 Apr;160(4):1393–403.
 250. Chou E, Suzuma I, Way KJ, Opland D, Clermont AC, Naruse K, et al. Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in

- insulin-resistant and diabetic States: a possible explanation for impaired collateral formation in cardiac tissue. *Circulation*. 2002 Jan 22;105(3):373–9.
251. Villablanca AC. Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro. *J Appl Physiol*. 1998 Jun;84(6):2089–98.
 252. Gardner AW, Katzel LI, Sorkin JD, Bradham DD, Hochberg MC, Flinn WR, et al. Exercise rehabilitation improves functional outcomes and peripheral circulation in patients with intermittent claudication: a randomized controlled trial. *J Am Geriatr Soc*. 2001 Jun;49(6):755–62.
 253. Hiatt WR, Regensteiner JG, Wolfel EE, Carry MR, Brass EP. Effect of exercise training on skeletal muscle histology and metabolism in peripheral arterial disease. *J Appl Physiol*. 1996 Aug;81(2):780–8.
 254. Bresler A, Vogel J, Niederer D, Gray D, Schmitz-Rixen T, Troidl K. Development of an Exercise Training Protocol to Investigate Arteriogenesis in a Murine Model of Peripheral Artery Disease. *Int J Mol Sci*. 2019 Aug 14;20(16):3956.
 255. Haas TL, Lloyd PG, Yang H-T, Terjung RL. Exercise Training and Peripheral Arterial Disease. *Compr Physiol*. 2012 Oct;2(4):2933–3017.
 256. Nickolay T, Nichols S, Ingle L, Hoyer A. Exercise Training as a Mediator for Enhancing Coronary Collateral Circulation: A Review of the Evidence. *Curr Cardiol Rev*. 2020 Sep 10;16(3):212–20.
 257. Ranjbar K, Rahmani-Nia F, Shahabpour E. Aerobic training and l-arginine supplementation promotes rat heart and hindleg muscles arteriogenesis after myocardial infarction. *J Physiol Biochem*. 2016 Sep 27;72(3):393–404.
 258. Vogel J, Niederer D, Jung G, Troidl K. Exercise-Induced Vascular Adaptations under Artificially Versus Pathologically Reduced Blood Flow: A Focus Review with Special Emphasis on Arteriogenesis. *Cells*. 2020 Jan 31;9(2):333.
 259. Abaci A, Oğuzhan A, Kahraman S, Eryol NK, Unal S, Arinç H, et al. Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels. *Circulation*. 1999 May 4;99(17):2239–42.
 260. Cai W-J, Koltai S, Kocsis E, Scholz D, Kostin S, Luo X, et al. Remodeling of the adventitia during coronary arteriogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Jan;284(1):H31-40.
 261. Bern HA. The “New Endocrinology”: Its Scope and Its Impact. *Am Zool*. 1990 Nov 1;30(4):877–85.
 262. Bern HA. The development of the role of hormones in development--a double remembrance. *Endocrinology*. 1992 Nov;131(5):2037–8.
 263. de Pablo F, Roth J. Endocrinization of the early embryo: an emerging role for hormones and hormone-like factors. *Trends Biochem Sci*. 1990 Sep;15(9):339–42.
 264. Sanders EJ, Harvey S. Peptide hormones as developmental growth and differentiation factors. *Dev Dyn*. 2008;237(6):1537–52.
 265. Kolka CM, Bergman RN. The Barrier Within: Endothelial Transport of Hormones. *Physiology*. 2012 Aug;27(4):237–47.
 266. Jang JY, Choi SY, Park I, Park DY, Choe K, Kim P, et al. VEGFR2 but not VEGFR3 governs integrity and remodeling of thyroid angiofollicular unit in normal state and during goitrogenesis. *EMBO Mol Med*. 2017 Jun 24;9(6):750–69.
 267. Cooke NE, Coit D, Shine J, Baxter JD, Martial JA. Human prolactin. cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *J Biol Chem*.

- 1981;256(8):4007–16.
268. Miller WL, Eberhardt NL. Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr Rev.* 1983;4(2):97–130.
 269. Walker W, Fitzpatrick S, Barrera-Saldana H, Resendez-Perez D, Saunders G. The Human Placental Lactogen Genes: Structure, Function, Evolution and Transcriptional Regulation. *Endocr Rev.* 1991;12(4):316–28.
 270. Goffin V, Shiverick KT, Kelly PA, Martial JA. Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals. *Endocr Rev.* 1996 Aug;17(4):385–410.
 271. Nicoll CS, Mayer GL, Russell SM. Structural features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties. *Endocr Rev.* 1986 May;7(2):169–203.
 272. Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev.* 2001 Feb;22(1):53–74.
 273. Li G, Del Rincon JP, Jahn LA, Wu Y, Gaylinn B, Thorner MO, et al. Growth hormone exerts acute vascular effects independent of systemic or muscle insulin-like growth factor I. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1379–85.
 274. Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martínez De La Escalera G. Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis. *Physiol Rev.* 2009 Oct;89(4):1177–215.
 275. Kölle S, Sinowatz F, Boie G, Lincoln D. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. *Biol Reprod.* 1998;59(4):836–42.
 276. Lobie PE, Breipohl W, Aragón JG, Waters MJ. Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the male and female reproductive systems. *Endocrinology.* 1990 Apr;126(4):2214–21.
 277. Sharara FI, Nieman LK. Identification and cellular localization of growth hormone receptor gene expression in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;79(2):670–2.
 278. Werther GA, Haynes K, Waters MJ. Growth hormone (GH) receptors are expressed on human fetal mesenchymal tissues--identification of messenger ribonucleic acid and GH-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;76(6):1638–46.
 279. Thum T, Tsikas D, Frölich JC, Borlak J. Growth hormone induces eNOS expression and nitric oxide release in a cultured human endothelial cell line. *FEBS Lett.* 2003 Dec 18;555(3):567–71.
 280. Rymaszewski Z, Cohen RM, Chomczynski P. Human growth hormone stimulates proliferation of human retinal microvascular endothelial cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jan 15;88(2):617–21.
 281. Frerich B, Kurtz-Hoffmann J, Lindemann N. Influence of growth hormone on maintenance of capillary-like structures in an in vitro model of stromal vascular tissue--results from morphometric analysis. *Artif Organs.* 2005 Apr;29(4):338–41.
 282. Brunet-Dunand SE, Vouyovitch C, Araneda S, Pandey V, Vidal LJP, Print C, et al. Autocrine human growth hormone promotes tumor angiogenesis in mammary carcinoma. *Endocrinology.* 2009;150(3):1341–52.
 283. Sonntag WE, Lynch CD, Cooney PT, Hutchins PM. Decreases in Cerebral Microvasculature with Age Are Associated with the Decline in Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor 1. *Endocrinology.* 1997 Aug 1;138(8):3515–20.

284. Kusano K, Tsutsumi Y, Dean J, Gavin M, Ma H, Silver M, et al. Long-term stable expression of human growth hormone by rAAV promotes myocardial protection post-myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2007 Feb;42(2):390–9.
285. Rong S, Lu Y, Liao Y, Wang X, Wang Y, Chang C, et al. Effects of transplanted myoblasts transfected with human growth hormone gene on improvement of ventricular function of rats. *Chin Med J (Engl).* 2008;121(30470457):347–54.
286. García-Esteo F, Pascual G, Gallardo A, San-Román J, Buján J, Bellón JM. A biodegradable copolymer for the slow release of growth hormone expedites scarring in diabetic rats. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2007 May;81B(2):291–304.
287. Devin JK, Vaughan DE, Blevins LS, Chen Q, Covington J, Verity DK, et al. Low-dose growth hormone administration mobilizes endothelial progenitor cells in healthy adults. *Growth Horm IGF Res.* 2008;18(3):253–63.
288. Thum T, Hoerber S, Froese S, Klink I, Stichtenoth DO, Galuppo P, et al. Age-Dependent Impairment of Endothelial Progenitor Cells Is Corrected by Growth Hormone Mediated Increase of Insulin-Like Growth Factor-1. *Circ Res.* 2007 Feb 16;100(3):434–43.
289. Oomen PHN, Beentjes JAM, Bosma E, Smit AJ, Reitsma WD, Dullaart RPF. Reduced capillary permeability and capillary density in the skin of GH-deficient adults: improvement after 12 months GH replacement. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2002 Apr;56(4):519–24.
290. Frystyk J. The Growth Hormone Hypothesis - 2005 Revision. *Horm Metab Res.* 2005 Apr;37:44–8.
291. Merimee TJ. A follow-up study of vascular disease in growth-hormone-deficient dwarfs with diabetes. *N Engl J Med.* 1978;298(22):1217–22.
292. Delafontaine P, Song YH, Li Y. Expression, Regulation, and Function of IGF-I, IGF-IR, and IGF-I Binding Proteins in Blood Vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(3):435–44.
293. Napoli R, Guardasole V, Angelini V, D'Amico F, Zarra E, Matarazzo M, et al. Acute effects of growth hormone on vascular function in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(6):2817–20.
294. Gola M, Bonadonna S, Doga M, Giustina A. Growth Hormone and Cardiovascular Risk Factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Mar;90(3):1864–70.
295. Napoli R, Guardasole V, Matarazzo M, Palmieri EA, Oliviero U, Fazio S, et al. Growth hormone corrects vascular dysfunction in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(1):90–5.
296. Molinari C, Battaglia A, Bona G, Grossini E, Mary DASG, Vacca G. The Role of Nitric Oxide in the Coronary Vasoconstriction Caused by Growth Hormone in Anaesthetized Pigs. *Exp Physiol.* 2000 Mar;85(2):203–8.
297. Corbacho AM, Martínez De La Escalera G, Clapp C. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J Endocrinol.* 2002 May;173(2):219–38.
298. Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, et al. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Feb 16;96(4):1246–51.
299. Drake CJ. Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Res C Embryo*

- Today. 2003 Feb;69(1):73–82.
300. Groothuis PG. Angiogenesis and vascular remodelling in female reproductive organs. *Angiogenesis*. 2005 Apr 17;8(2):87–8.
 301. Frohman LA, Burek L, Stachura MA. Characterization of growth hormone of different molecular weights in rat, dog and human pituitaries. *Endocrinology*. 1972 Jul;91(1):262–9.
 302. Geffner ME. The growth without growth hormone syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1996 Sep;25(3):649–63.
 303. Harvey S, Hull KL. Growth hormone. A paracrine growth factor? *Endocrine*. 1997 Dec;7(3):267–79.
 304. Sanders EJ, Harvey S. Growth hormone as an early embryonic growth and differentiation factor. *Anat Embryol (Berl)*. 2004;209(1):1–9.
 305. Diaz-Casares A, Leon Y, de la Rosa EJ, Varela-Nieto I. Regulation of vertebrate sensory organ development: a scenario for growth hormone and insulin-like growth factors action. *Adv Exp Med Biol*. 2005;567:221–42.
 306. Sanders EJ, Walter MA, Parker E, Arámburo C, Harvey S. Opticin binds retinal growth hormone in the embryonic vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Dec;44(12):5404–9.
 307. Baudet M-L, Sanders EJ, Harvey S. Retinal Growth Hormone in the Chick Embryo. *Endocrinology*. 2003 Dec;144(12):5459–68.
 308. Tripathi BJ, Tripathi RC, Livingston AM, Borisuth NSC. The role of growth factors in the embryogenesis and differentiation of the eye. *Am J Anat*. 1991 Dec;192(4):442–71.
 309. Izadyar F, Van Tol HTA, Hage WG, Bevers MM. Preimplantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during in vitro development. *Mol Reprod Dev*. 2000 Nov;57(3):247–55.
 310. Kölle S, Stojkovic M, Prella K, Waters M, Wolf E, Sinowatz F. Growth hormone (GH)/GH receptor expression and GH-mediated effects during early bovine embryogenesis. *Biol Reprod*. 2001 Jun 1;64(6):1826–34.
 311. Re RN. The intracrine hypothesis and intracellular peptide hormone action. *BioEssays*. 2003 Apr;25(4):401–9.
 312. Gould J, Aramburo C, Capdevielle M, Scanes CG. Angiogenic activity of anterior pituitary tissue and growth hormone on the chick embryo chorio-allantoic membrane: a novel action of GH. *Life Sci*. 1995 Jan;56(8):587–94.
 313. Ikeo S, Yamauchi K, Shigematsu S, Nakajima K, Aizawa T, Hashizume K. Differential effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on human endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 May;280(5):C1255–61.
 314. Sanders EJ, Wride MA. Programmed cell death in development. *Int Rev Cytol*. 1995;163:105–73.
 315. Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival. *Philos Trans R Soc London Ser B Biol Sci*. 1994 Aug 30;345(1313):265–8.
 316. Mylonas PG, Matsouka PT, Papandoniou E V., Vagianos C, Kalfarentzos F, Alexandrides TK. Growth hormone and insulin-like growth factor I protect intestinal cells from radiation induced apoptosis. *Mol Cell Endocrinol*. 2000 Feb 25;160(1–2):115–22.

317. Dalla Libera L, Ravara B, Volterrani M, Gobbo V, Della Barbera M, Angelini A, et al. Beneficial effects of GH/IGF-I on skeletal muscle atrophy and function in experimental heart failure. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 Jan;286(1):C138-44.
318. González-Juanatey JR, Piñeiro R, Iglesias MJ, Gualillo O, Kelly PA, Diéguez C, et al. GH prevents apoptosis in cardiomyocytes cultured in vitro through a calcineurin-dependent mechanism. *J Endocrinol*. 2004 Feb;180(2):325–35.
319. Sirotkin A V., Makarevich A V. GH regulates secretory activity and apoptosis in cultured bovine granulosa cells through the activation of the cAMP/protein kinase A system. *J Endocrinol*. 1999 Nov;163(2):317–27.
320. Kölle S, Stojkovic M, Boie G, Wolf E, Sinowatz F. Growth Hormone-Related Effects on Apoptosis, Mitosis, and Expression of Connexin 43 in Bovine In Vitro Maturation Cumulus-Oocyte Complexes I. *Biol Reprod*. 2003 May 1;68(5):1584–9.
321. Gu Y, Zou Y, Aikawa R, Hayashi D, Kudoh S, Yamauchi T, et al. Growth hormone signalling and apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* Gu, Y; Zou, Y; Aikawa, R; Hayashi, D; Kudoh, S; Yamauchi, T; Uozumi, H; Zhu, W; Kadowaki, T; Yazaki, Y; Komuro, I Growth Horm Signal apoptosis neonatal rat cardiomyocytes *Mol Cell Biochem* . 2001;223(1/2):35–46.
322. Shin DH, Lee E, Kim J-W, Kwon B-S, Jung MK, Jee YH, et al. Protective effect of growth hormone on neuronal apoptosis after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Neurosci Lett*. 2004 Jan 2;354(1):64–8.
323. Scheepens A, Sirimanne E., Breier B., Clark R., Gluckman P., Williams C. Growth hormone as a neuronal rescue factor during recovery from CNS injury. *Neuroscience*. 2001 Jun;104(3):677–87.
324. Kölle S, Stojkovic M, Boie G, Wolf E, Sinowatz F. Growth hormone inhibits apoptosis in in vitro produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev*. 2002 Feb;61(2):180–6.
325. Costoya JA, Finidori J, Moutoussamy S, Seãris R, Devesa J, Arce VM. Activation of growth hormone receptor delivers an antiapoptotic signal: evidence for a role of Akt in this pathway. *Endocrinology*. 1999 Dec;140(12):5937–43.
326. Jeay S, Sonenshein GE, Postel-Vinay M-C, Kelly PA, Baixeras E. Growth hormone can act as a cytokine controlling survival and proliferation of immune cells: new insights into signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol*. 2002 Feb;188(1–2):1–7.
327. Jeay S. Growth Hormone Prevents Apoptosis through Activation of Nuclear Factor- B in Interleukin-3-Dependent Ba/F3 Cell Line. *Mol Endocrinol*. 2000 May 1;14(5):650–61.
328. Jeay S, Sonenshein GE, Kelly PA, Postel-Vinay MC, Baixeras E. Growth hormone exerts antiapoptotic and proliferative effects through two different pathways involving nuclear factor-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase. *Endocrinology*. 2001 Jan 1;142(1):147–56.
329. Vincent AM, Feldman EL. Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth Horm IGF Res*. 2002 Aug;12(4):193–7.
330. Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*. 2001 Oct;13(5):555–62.
331. Goh ELK, Pircher TJ, Wood TJJ, Norstedt G, Graichen R, Lobie PE. Growth Hormone-Induced Reorganization of the Actin Cytoskeleton Is Not Required for

- STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription-5)-Mediated Transcription*. *Endocrinology*. 1997 Aug 1;138(8):3207–15.
332. Herrington J, Diakonova M, Rui L, Gunter DR, Carter-Su C. SH2-B Is Required for Growth Hormone-induced Actin Reorganization. *J Biol Chem*. 2000 Apr 28;275(17):13126–33.
333. Zhu T, Lobie PE. Janus Kinase 2-dependent Activation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase by Growth Hormone. *J Biol Chem*. 2000 Jan 21;275(3):2103–14.
334. Goh EL, Pircher TJ, Lobie PE. Growth hormone promotion of tubulin polymerization stabilizes the microtubule network and protects against colchicine-induced apoptosis. *Endocrinology*. 1998 Oct 1;139(10):4364–72.
335. Hansen TK, Fisker S, Dall R, Ledet T, Jørgensen JOL, Rasmussen LM. Growth hormone increases vascular cell adhesion molecule 1 expression: in vivo and in vitro evidence. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(2):909–16.
336. Zhu T, Goh ELK, Lobie PE. Growth Hormone Stimulates the Tyrosine Phosphorylation and Association of p125 Focal Adhesion Kinase (FAK) with JAK2. *J Biol Chem*. 1998 Apr 24;273(17):10682–9.
337. Cooke NE, Ray J, Watson MA, Estes PA, Kuo BA, Liebhaber SA. Human growth hormone gene and the highly homologous growth hormone variant gene display different splicing patterns. *J Clin Invest*. 1988 Jul;82(1):270–5.
338. Lewis UJ, Dunn JT, Bonewald LF, Seavey BK, Vanderlaan WP. A naturally occurring structural variant of human growth hormone. *J Biol Chem*. 1978 Apr 25;253(8):2679–87.
339. Devesa J, Almengló C, Devesa P. Multiple Effects of Growth Hormone in the Body: Is it Really the Hormone for Growth? *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes*. 2016;9:47–71.
340. Frankenne F, Closset J, Gomez F, Scippo ML, Smal J, Hennen G. The physiology of growth hormones (GHs) in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988 Jun;66(6):1171–80.
341. Diaz MJ, Dominguez F, Haro LS, Ling N, Devesa J. A 12-kilodalton N-glycosylated growth hormone-related peptide is present in human pituitary extracts. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 Jul;77(1):134–8.
342. García-Barros M, Costoya J, Ríos R, Arce V, Devesa J. N-Glycosylated Variants of Growth Hormone in Human Pituitary Extracts. *Horm Res Paediatr*. 2000;53(1):40–5.
343. Mayo KE, Miller T, DeAlmeida V, Godfrey P, Zheng J, Cunha SR. Regulation of the pituitary somatotroph cell by GHRH and its receptor. *Recent Prog Horm Res*. 2000;55:237–66; discussion 266-7.
344. Shimon I, Taylor JE, Dong JZ, Bitonte RA, Kim S, Morgan B, et al. Somatostatin receptor subtype specificity in human fetal pituitary cultures. Differential role of SSTR2 and SSTR5 for growth hormone, thyroid-stimulating hormone, and prolactin regulation. *J Clin Invest*. 1997 Feb 15;99(4):789–98.
345. Shimon I, Yan X, Taylor JE, Weiss MH, Culler MD, Melmed S. Somatostatin receptor (SSTR) subtype-selective analogues differentially suppress in vitro growth hormone and prolactin in human pituitary adenomas. Novel potential therapy for functional pituitary tumors. *J Clin Invest*. 1997 Nov 1;100(9):2386–92.
346. Barinaga M, Yamamoto G, Rivier C, Vale W, Evans R, Rosenfeld MG. Transcriptional regulation of growth hormone gene expression by growth

- hormone-releasing factor. *Nature*. 1983 Nov;306(5938):84–5.
347. Thorner MO, Frohman LA, Leong DA, Thominet J, Downs T, Hellmann P, et al. Extrahypothalamic growth-hormone-releasing factor (GRF) secretion is a rare cause of acromegaly: plasma GRF levels in 177 acromegalic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984 Nov;59(5):846–9.
 348. Gelato MC, Pescovitz O, Cassorla F, Loriaux DL, Merriam GR. Effects of a growth hormone releasing factor in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1983 Sep;57(3):674–6.
 349. Arce VM, Devesa J, Fernández-Tresguerres JA. Hormona de crecimiento. In: Fernández-Tresguerres JA, editor. *Fisiología Humana*. 4th ed. Madrid, Spain: McGraw-Hill Medical; 2019. p. 1–36.
 350. Hindmarsh P. Hormonal levels in the human fetus between 14 and 22 weeks gestation. *Early Hum Dev*. 1987 Jul;15(4):253–4.
 351. Kaplan SL, Grumbach MM, Aubert ML. The ontogenesis of pituitary hormones and hypothalamic factors in the human fetus: maturation of central nervous system regulation of anterior pituitary function. *Recent Prog Horm Res*. 1976;32:161–243.
 352. Martha PM, Rogol AD, Veldhuis JD, Kerrigan JR, Goodman DW, Blizzard RM. Alterations in the pulsatile properties of circulating growth hormone concentrations during puberty in boys. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989 Sep;69(3):563–70.
 353. Martha PM, Gorman KM, Blizzard RM, Rogol AD, Veldhuis JD. Endogenous growth hormone secretion and clearance rates in normal boys, as determined by deconvolution analysis: relationship to age, pubertal status, and body mass. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992 Feb;74(2):336–44.
 354. Ho KY, Evans WS, Blizzard RM, Veldhuis JD, Merriam GR, Samojlik E, et al. Effects of sex and age on the 24-hour profile of growth hormone secretion in man: importance of endogenous estradiol concentrations. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987 Jan;64(1):51–8.
 355. Dudl RJ, Ensink JW, Palmer HE, Williams RH. Effect of age on growth hormone secretion in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1973 Jul;37(1):11–6.
 356. Rudman D, Kutner MH, Rogers CM, Lubin MF, Fleming GA, Bain RP. Impaired growth hormone secretion in the adult population: relation to age and adiposity. *J Clin Invest*. 1981 May 1;67(5):1361–9.
 357. Veldhuis JD, Iranmanesh A, Ho KK, Waters MJ, Johnson ML, Lizarralde G. Dual defects in pulsatile growth hormone secretion and clearance subserve the hyposomatotropism of obesity in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991 Jan;72(1):51–9.
 358. Argente J. Multiple Endocrine Abnormalities of the Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor Axis in Prepubertal Children with Exogenous Obesity: Effect of Short- and Long-Term Weight Reduction. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Jul 1;82(7):2076–83.
 359. Attia N. The Metabolic Syndrome and Insulin-Like Growth Factor I Regulation in Adolescent Obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 May 1;83(5):1467–71.
 360. Veldhuis JD, Liem AY, South S, Weltman A, Weltman J, Clemmons DA, et al. Differential impact of age, sex steroid hormones, and obesity on basal versus pulsatile growth hormone secretion in men as assessed in an ultrasensitive chemiluminescence assay. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Nov;80(11):3209–22.

361. Van Cauter E, Caufriez A, Kerkhofs M, Van Onderbergen A, Thorner MO, Copinschi G. Sleep, awakenings, and insulin-like growth factor-I modulate the growth hormone (GH) secretory response to GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992 Jun;74(6):1451–9.
362. Sassin JF, Parker DC, Mace JW, Gotlin RW, Johnson LC, Rossman LG. Human growth hormone release: relation to slow-wave sleep and sleep-walking cycles. *Sci.* 1969 Aug 1;165(3892):513–5.
363. Schalch DS. The influence of physical stress and exercise on growth hormone and insulin secretion in man. *J Lab Clin Med.* 1967 Feb;69(2):256–69.
364. Deller JJ, Plunket DC, Forsham PH. Growth hormone studies in growth retardation. Therapeutic response to administration of androgen. *Calif Med.* 1966 May;104(5):359–62.
365. Ram PA, Park S-H, Choi HK, Waxman DJ. Growth Hormone Activation of Stat 1, Stat 3, and Stat 5 in Rat Liver. *J Biol Chem.* 1996 Mar 8;271(10):5929–40.
366. Khan AS, Sane DC, Wannenburg T, Sonntag WE. Growth hormone, insulin-like growth factor-1 and the aging cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 2002 Apr;54(1):25–35.
367. Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev.* 1991 Aug;12(3):235–51.
368. Low MJ, Otero-Corchon V, Parlow AF, Ramirez JL, Kumar U, Patel YC, et al. Somatostatin is required for masculinization of growth hormone–regulated hepatic gene expression but not of somatic growth. *J Clin Invest.* 2001 Jun 15;107(12):1571–80.
369. Leung KC, Waters MJ, Markus I, Baumbach WR, Ho KKY. Insulin and insulin-like growth factor-I acutely inhibit surface translocation of growth hormone receptors in osteoblasts: a novel mechanism of growth hormone receptor regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Oct 14;94(21):11381–6.
370. Rosenfeld RG. Circulating Growth Hormone Binding Proteins. *Horm Res.* 1994;42(4–5):129–32.
371. Herington AC, Ymer S, Stevenson J. Identification and characterization of specific binding proteins for growth hormone in normal human sera. *J Clin Invest.* 1986 Jun 1;77(6):1817–23.
372. Leung DW, Spencer SA, Cachianes G, Hammonds RG, Collins C, Henzel WJ, et al. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature.* 1987;330(6148):537–43.
373. Baumann G, Shaw MA, Amburn K. Circulating growth hormone binding proteins. *J Endocrinol Invest.* 1994 Jan;17(1):67–81.
374. Baumann G. Growth hormone binding to a circulating receptor fragment — the concept of receptor shedding and receptor splicing. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2009 Jul 15;103(01):2–6.
375. Baumann G, Shaw MA, Amburn K. Regulation of plasma growth hormone-binding proteins in health and disease. *Metabolism.* 1989 Jul;38(7):683–9.
376. Hansen JA, Lindberg K, Hilton DJ, Nielsen JH, Billestrup N. Mechanism of Inhibition of Growth Hormone Receptor Signaling by Suppressor of Cytokine Signaling Proteins. *Mol Endocrinol.* 1999 Nov;13(11):1832–43.
377. Metcalf D, Greenhalgh CJ, Viney E, Willson TA, Starr R, Nicola NA, et al. Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. *Nature.* 2000 Jun

- 29;405(6790):1069–73.
378. Colson A, Le Cam A, Maiter D, Edery M, Thissen JP. Potentiation of growth hormone-induced liver suppressors of cytokine signaling messenger ribonucleic acid by cytokines. *Endocrinology*. 2000 Oct;141(10):3687–95.
 379. Mao Y, Ling P-R, Fitzgibbons TP, McCowen KC, Frick GP, Bistran BR, et al. Endotoxin-Induced Inhibition of Growth Hormone Receptor Signaling in Rat Liver in Vivo. *Endocrinology*. 1999 Dec 1;140(12):5505–15.
 380. Takala J, Ruokonen E, Webster NR, Nielsen MS, Zandstra DF, Vundelinckx G, et al. Increased Mortality Associated with Growth Hormone Treatment in Critically Ill Adults. *N Engl J Med*. 1999;341(11):785–92.
 381. Lobie PE, Sadir R, Graichen R, Mertani HC, Morel G. Caveolar internalization of growth hormone. *Exp Cell Res*. 1999 Jan 10;246(1):47–55.
 382. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999 Dec 9;402(6762):656–60.
 383. Pinkney J, Williams G. Ghrelin gets hungry. *Lancet*. 2002 Apr;359(9315):1360–1.
 384. Popovic V, Leal A, Micic D, Koppeschaar HPF, Torres E, Paramo C, et al. GH-releasing hormone and GH-releasing peptide-6 for diagnostic testing in GH-deficient adults. *Lancet*. 2000 Sep;356(9236):1137–42.
 385. Chang CH, Rickes EL, McGuire L, Frazier E, Chen H, Barakat K, et al. Growth hormone (GH) and insulin-like growth factor I responses after treatments with an orally active GH secretagogue L-163,255 in swine. *Endocrinology*. 1996 Nov;137(11):4851–6.
 386. Popovic V, Damjanovic S, Micic D, Djurovic M, Dieguez C, Casanueva FF. Blocked growth hormone-releasing peptide (GHRP-6)-induced GH secretion and absence of the synergic action of GHRP-6 plus GH-releasing hormone in patients with hypothalamopituitary disconnection: evidence that GHRP-6 main action is exerted at the hypothala. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Mar;80(3):942–7.
 387. Peñalva A, Pombo M, Carballo A, Barreiro J, Casanueva FF, Dieguez C. Influence of sex, age and adrenergic pathways on the growth hormone response to GHRP-6. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1993 Jan;38(1):87–91.
 388. Jaffe CA, Friberg RD, Barkan AL. Suppression of growth hormone (GH) secretion by a selective GH-releasing hormone (GHRH) antagonist. Direct evidence for involvement of endogenous GHRH in the generation of GH pulses. *J Clin Invest*. 1993 Aug 1;92(2):695–701.
 389. Raun K, Hansen B, Johansen N, Thogersen H, Madsen K, Ankersen M, et al. Ipamorelin, the first selective growth hormone secretagogue. *Eur J Endocrinol*. 1998 Nov 1;139(5):552–61.
 390. Carro E, Señaris R, Considine R V., Casanueva FF, Dieguez C. Regulation of in vivo growth hormone secretion by leptin. *Endocrinology*. 1997 May 1;138(5):2203–6.
 391. Okada K, Sugihara H, Minami S, Wakabayashi I. Effect of Parenteral Administration of Selected Nutrients and Central Injection of γ -Globulin from Antiserum to Neuropeptide Y on Growth Hormone Secretory Pattern in Food-Deprived Rats. *Neuroendocrinology*. 1993;57(4):678–86.
 392. al-Shoumer KA, Anyaoku V, Richmond W, Johnston DG. Elevated leptin

- concentrations in growth hormone-deficient hypopituitary adults. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1997 Aug;47(2):153–9.
393. Lal S, Martin JB, De la Vega CE, Friesen HG. Comparison of the effect of apomorphine and L-DOPA on serum growth hormone levels in normal men. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1975 May;4(3):277–85.
394. Casanueva FF, Burguera B, Muruais C, Dieguez C. Acute administration of corticoids: a new and peculiar stimulus of growth hormone secretion in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990 Jan;70(1):234–7.
395. Suda T, Demura H, Demura R, Jibiki K, Tozawa F, Shizume K. Anterior pituitary hormones in plasma and pituitaries from patients with Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1980 Nov;51(5):1048–53.
396. Irie M, Tsushima T. Increase of serum growth hormone concentration following thyrotropin-releasing hormone injection in patients with acromegaly or gigantism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1972 Jul;35(1):97–100.
397. Giustina A, Veldhuis JD. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev*. 1998 Dec;19(6):717–97.
398. Chan JM. Plasma Insulin-Like Growth Factor-I and Prostate Cancer Risk: A Prospective Study. *Science (80-)*. 1998 Jan 23;279(5350):563–6.
399. Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, et al. Circulating concentrations of insulin-like growth factor I and risk of breast cancer. *Lancet*. 1998 May;351(9113):1393–6.
400. Juul A. Determination of Insulin-Like Growth Factor-I in the Monitoring of Growth Hormone Treatment with Respect to Efficacy of Treatment and Side Effects: Should Potential Risks of Cardiovascular Disease and Cancer Be Considered? *Horm Res Paediatr*. 1999;51(3):141–8.
401. Conchillo M, Prieto J, Quiroga J. Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I) y cirrosis hepática. *Rev Española Enfermedades Dig*. 2007 Mar;99(3).
402. Dagdelen S, Cinar N, Erbas T. Increased thyroid cancer risk in acromegaly. *Pituitary*. 2014;17(4):299–306.
403. Jeffcoate W. Can growth hormone therapy cause diabetes? *Lancet*. 2000;355(9204):589–90.
404. Bates AS. The effect of hypopituitarism on life expectancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Mar 1;81(3):1169–72.
405. Arcopinto M, Salzano A, Giallauria F, Bossone E, Isgaard J, Marra AM, et al. Growth hormone deficiency is associated with worse cardiac function, physical performance, and outcome in chronic heart failure: Insights from the T.O.S.C.A. GHD study. *PLoS One*. 2017;12(1):1–12.
406. Saccà L. Growth hormone: a newcomer in cardiovascular medicine. *Cardiovasc Res*. 1997 Oct;36(1):3–9.
407. Salzano A, Cittadini A, Bossone E, Suzuki T, Heaney LM. Multiple hormone deficiency syndrome: a novel topic in chronic heart failure. *Futur Sci OA*. 2018 Jul;4(6):FSO311.
408. Böger RH. Nitric oxide and the mediation of the hemodynamic effects of growth hormone in humans. *J Endocrinol Invest*. 1999;22(5 Suppl):75–81.
409. Evans LM, Davies JS, Anderson RA, Ellis GR, Jackson SK, Lewis MJ, et al. The

- effect of GH replacement therapy on endothelial function and oxidative stress in adult growth hormone deficiency. *Eur J Endocrinol.* 2000;142(3):254–62.
410. Deepak D, Daousi C, Javadpour M, Clark D, Perry Y, Pinkney J, et al. The influence of growth hormone replacement on peripheral inflammatory and cardiovascular risk markers in adults with severe growth hormone deficiency. *Growth Horm IGF Res.* 2010 Jun;20(3):220–5.
411. Thum T, Bauersachs J. Growth hormone regulates vascular function—what we know from bench and bedside. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006 Feb 13;62(S1):29–32.
412. Cittadini A, Isgaard J, Monti MG, Casaburi C, Di Gianni A, Serpico R, et al. Growth hormone prolongs survival in experimental postinfarction heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Jun;41(12):2154–63.
413. Böger RH, Skamira C, Bode-Böger SM, Brabant G, Von Zur Mühlen A, Frölich JC. Nitric oxide may mediate the hemodynamic effects of recombinant growth hormone in patients with acquired growth hormone deficiency: A double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Invest.* 1996;98(12):2706–13.
414. Devesa J, Devesa P, Reimunde P. Growth hormone revisited. *Med Clin (Barc).* 2010 Nov 13;135(14):665–70.
415. Valcavi R, Gaddi O, Zini M, Iavicoli M, Mellino U, Portioli I. Cardiac performance and mass in adults with hypopituitarism: effects of one year of growth hormone treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(2):659–66.
416. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet.* 1996;348(9024):370–4.
417. Henry TD, Rocha-Singh K, Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ, Simons M, et al. Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial growth factor to patients with coronary artery disease. *Am Hear J.* 2001;142(5):872–80.
418. Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, et al. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation.* 2003;107(10):1359–65.
419. Lazarous DF, Unger EF, Epstein SE, Stine A, Arevalo JL, Chew EY, et al. Basic fibroblast growth factor in patients with intermittent claudication: results of a phase I trial. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Oct;36(4):1239–44.
420. Mäkinen K, Manninen H, Hedman M, Matsi P, Mussalo H, Alhava E, 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 Jul;6(1):127–33.
421. Hedman M, Hartikainen J, Syväne M, Stjernvall J, Hedman A, Kivelä A, et al. Safety and Feasibility of Catheter-Based Local Intracoronary Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transfer in the Prevention of Postangioplasty and In-Stent Restenosis and in the Treatment of Chronic Myocardial Ischemia. *Circulation.* 2003 Jun 3;107(21):2677–83.
422. Epstein SE, Fuchs S, Zhou YF, Baffour R, Kornowski R. Therapeutic interventions for enhancing collateral development by administration of growth factors: basic principles, early results and potential hazards. *Cardiovasc Res.* 2001;49(3):532–42.
423. Asahara T, Bauters C, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, et al.

- Synergistic Effect of Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor on Angiogenesis In Vivo. *Circulation*. 1995 Nov;92(9):365–71.
424. Csiszar A, Labinskyy N, Perez V, Recchia FA, Podlutzky A, Mukhopadhyay P, et al. Endothelial function and vascular oxidative stress in long-lived GH/IGF-deficient Ames dwarf mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Nov;295(5):H1882-94.
425. Strazhesko ID, Tkacheva ON, Akasheva DU, Dudinskaya EN, Plokhova E V., Pykhtina VS, et al. Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factor-1, Insulin Resistance, and Leukocyte Telomere Length as Determinants of Arterial Aging in Subjects Free of Cardiovascular Diseases. *Front Genet*. 2017 Dec 15;8:198.
426. Bach MHM, Sadoun E, Reed MJ. Defects in activation of nitric oxide synthases occur during delayed angiogenesis in aging. *Mech Ageing Dev*. 2005;126(4):467–73.
427. Kireev RA, Tresguerres ACF, Garcia C, Borrás C, Ariznavarreta C, Vara E, et al. Hormonal regulation of pro-inflammatory and lipid peroxidation processes in liver of old ovariectomized female rats. *Biogerontology*. 2010 Apr;11(2):229–43.
428. Teraa M, Sprengers RW, Westerweel PE, Gremmels H, Goumans M-JTH, Teerlink T, et al. Bone Marrow Alterations and Lower Endothelial Progenitor Cell Numbers in Critical Limb Ischemia Patients. *Pesce M, editor. PLoS One*. 2013 Jan 31;8(1):e55592.
429. Rigato M, Avogaro A, Fadini GP. Levels of Circulating Progenitor Cells, Cardiovascular Outcomes and Death. *Circ Res*. 2016 Jun 10;118(12):1930–9.
430. Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation*. 2005 Jun 7;111(22):2981–7.
431. Thum T, Fleissner F, Klink I, Tsikas D, Jakob M, Bauersachs J, et al. Growth Hormone Treatment Improves Markers of Systemic Nitric Oxide Bioavailability via Insulin-Like Growth Factor-I. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Nov;92(11):4172–9.
432. Ridker PM. Anticytokine Agents Targeting Interleukin Signaling Pathways for the Treatment of Atherothrombosis. *Circ Res*. 2019;124(3):437–50.
433. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med*. 2017;377(12):1119–31.
434. Agca R, Heslinga SC, Rollefstad S, Heslinga M, McInnes IB, Peters MJL, et al. EULAR recommendations for cardiovascular disease risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory joint disorders: 2015/2016 update. *Ann Rheum Dis*. 2017 Jan;76(1):17–28.
435. Dávida L, Pongrácz V, Mohamed EA, Szamosi S, Szücs G, Váncsa A, et al. A prospective, longitudinal monocentric study on laser Doppler imaging of microcirculation: comparison with macrovascular pathophysiology and effect of adalimumab treatment in early rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2020;40(3):415–24.
436. Signorelli SS, Anzaldi M, Libra M, Navolanic PM, Malaponte G, Mangano K, et al. Plasma Levels of Inflammatory Biomarkers in Peripheral Arterial Disease: Results of a Cohort Study. *Angiology*. 2016;67(9):870–4.

437. Chen J, Han L, Xu X, Tang H, Wang H, Wei B. Serum biomarkers VEGF-C and IL-6 are associated with severe human Peripheral Artery Stenosis. *J Inflamm*. 2015 Dec 18;12(1):50.
438. Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, Rumley A, Lowe GDO, Fowkes FGR. C-reactive protein, interleukin-6, and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in the general population: Edinburgh Artery Study. *Circulation*. 2005 Aug 16;112(7):976–83.
439. Yi C, Cao Y, Mao SH, Liu H, Ji LL, Xu SY, et al. Recombinant human growth hormone improves survival and protects against acute lung injury in murine *Staphylococcus aureus* sepsis. *Inflamm Res*. 2009;58(12):855–62.
440. Adamopoulos S. Effects of growth hormone on circulating cytokine network, and left ventricular contractile performance and geometry in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2003 Dec;24(24):2186–96.
441. Criqui MH, McClelland RL, McDermott MM, Allison MA, Blumenthal RS, Aboyans V, et al. The ankle-brachial index and incident cardiovascular events in the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *J Am Coll Cardiol*. 2010 Oct 26;56(18):1506–12.
442. Kaptoge S, Seshasai SRK, Gao P, Freitag DF, Butterworth AS, Borglykke A, et al. Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: new prospective study and updated meta-analysis. *Eur Heart J*. 2014 Mar 1;35(9):578–89.
443. Giles JT, Sattar N, Gabriel S, Ridker PM, Gay S, Warne C, et al. Cardiovascular Safety of Tocilizumab Versus Etanercept in Rheumatoid Arthritis: A Randomized Controlled Trial. *Arthritis Rheumatol*. 2020 Jan 27;72(1):31–40.
444. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJ, et al. Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial. *Lancet*. 2009 Apr;373(9670):1175–82.
445. Conte MS, Bradbury AW, Kolh P, White J V., Dick F, Fitridge R, et al. ESVS 2019 Guidelines on the Management of Chronic Limb-Threatening Ischemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2019;58(1):S1-S109.e33.
446. Aboyans V, Ricco J-B, Bartelink M-LEL, Björck M, Brodmann M, Cohnert T, et al. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2018 Mar;55(3):305–68.
447. Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, Pepys MB, Thompson SG, Collins R, et al. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet*. 2010 Jan;375(9709):132–40.
448. McDermott MM, Guralnik JM, Corsi A, Albay M, Macchi C, Bandinelli S, et al. Patterns of inflammation associated with peripheral arterial disease: the InCHIANTI study. *Am Heart J*. 2005 Aug;150(2):276–81.
449. Anwar A, Zahid AA, Scheidegger KJ, Brink M, Delafontaine P. Tumor necrosis factor- α regulates insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 expression in vascular smooth muscle. *Circulation*. 2002;105(10):1220–5.
450. Croker BA, Kiu H, Nicholson SE. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol*. 2008 Aug;19(4):414–22.

451. Erman A, Wabitsch M, Goodyer CG. Human growth hormone receptor (GHR) expression in obesity: II. Regulation of the human GHR gene by obesity-related factors. *Int J Obes (Lond)*. 2011 Dec;35(12):1520–9.
452. Anderson HDI, Rahmutula D, Gardner DG. Tumor Necrosis Factor- α Inhibits Endothelial Nitric-oxide Synthase Gene Promoter Activity in Bovine Aortic Endothelial Cells. *J Biol Chem*. 2004 Jan 9;279(2):963–9.
453. Yan G, You B, Chen S-P, Liao JK, Sun J. Tumor Necrosis Factor- α Downregulates Endothelial Nitric Oxide Synthase mRNA Stability via Translation Elongation Factor 1- α 1. *Circ Res*. 2008 Sep 12;103(6):591–7.
454. Maekawa Y, Ishikawa K, Yasuda O, Oguro R, Hanasaki H, Kida I, et al. Klotho suppresses TNF- α -induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF- κ B activation. *Endocrine*. 2009;35(3):341–6.
455. Masternak MM, Bartke A. Growth hormone, inflammation and aging. *Pathobiol Aging Age-related Dis*. 2012 Jan 4;2(1):17293.
456. Campión J, Maestro B, Calle C, Dávila N, Barceló B. Receptor de la hormona de crecimiento humano: características estructurales, estudio de su expresión y regulación génica. *Endocrinol y Nutr*. 1999;46(7):235.
457. Schwartzbauer G, Menon RK. Regulation of Growth Hormone Receptor Gene Expression. *Mol Genet Metab*. 1998 Apr;63(4):243–53.
458. Ardail D, Debon A, Perret-Vivancos C, Biol-N'Garagba MC, Krantic S, Lobie PE, et al. Growth hormone internalization in mitochondria decreases respiratory chain activity. *Neuroendocrinology*. 2010;91(1):16–26.
459. Perret-Vivancos C, Abbate A, Ardail D, Raccurt M, Usson Y, Lobie PE, et al. Growth hormone activity in mitochondria depends on GH receptor Box 1 and involves caveolar pathway targeting. *Exp Cell Res*. 2006 Feb 1;312(3):215–32.
460. Unthank J, Haas TL, Miller S. Impact of shear level and cardiovascular risk factors on bioavailable nitric oxide and outward vascular remodeling in mesenteric arteries. In: Schaper W, Deindl E, editors. *Arteriogenesis- Molecular Regulation, Pathophysiology and Therapeutics I*. Aachen, Germany: Shaker Verlag Publishing; 2011. p. 89–119.
461. Bir SC, Kolluru GK, Fang K, Kevil CG. Redox balance dynamically regulates vascular growth and remodeling. *Semin Cell Dev Biol*. 2012 Sep;23(7):745–57.
462. Steven S, Daiber A, Dopheide JF, Münzel T, Espinola-Klein C. Peripheral artery disease, redox signaling, oxidative stress – Basic and clinical aspects. *Redox Biol*. 2017;12:787–97.
463. Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, Arun Kumar HS, Meurer S, et al. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest*. 2006;116(9):2552–61.
464. Gladwin MT. Deconstructing endothelial dysfunction: soluble guanylyl cyclase oxidation and the NO resistance syndrome. *J Clin Invest*. 2006;116(9):2330–2.
465. Bauersachs J, Bouloumié A, Mülsch A, Wiemer G, Fleming I, Busse R. Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: Changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. *Cardiovasc Res*. 1998;37(3):772–9.
466. Kusaba T, Okigaki M, Matui A, Murakami M, Ishikawa K, Kimura T, et al. Klotho is associated with VEGF receptor-2 and the transient receptor potential canonical-1 Ca²⁺ channel to maintain endothelial integrity. *Proc Natl Acad Sci*. 2010 Nov

- 9;107(45):19308–13.
467. Lasch M, Kleinert EC, Meister S, Kumaraswami K, Buchheim J-I, Grantzow T, et al. Extracellular RNA released due to shear stress controls natural bypass growth by mediating mechanotransduction in mice. *Blood*. 2019 Oct 24;134(17):1469–79.
 468. Chillo O, Kleinert EC, Lautz T, Lasch M, Pagel J-I, Heun Y, et al. Perivascular Mast Cells Govern Shear Stress-Induced Arteriogenesis by Orchestrating Leukocyte Function. *Cell Rep*. 2016 Aug;16(8):2197–207.
 469. Crivellato E, Travan L, Ribatti D. Mast cells and basophils: a potential link in promoting angiogenesis during allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;151(2):89–97.
 470. Lawrence W, Dobrucki, Yoshiaki Tsutsumi, Leszek Kalinowski, c, Jarrod Deanb, Mary Gavinb, Sabyasachi Senb, Marivi Mendizabald, Albert J. Sinusasa, and Ryuichi Aikawab E. Analysis of Angiogenesis Induced by Local IGF-I Expression after Myocardial Infarction Using MicroSPECT-CT Imaging. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;6(6):247–53.
 471. Sun W, Yu W-Y, Yu D-J, Zhao T-L, Wu L-J, Han W-Y. The effects of recombinant human growth hormone (rHGH) on survival of slender narrow pedicle flap and expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and classification determinant 34 (CD34). *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(3):771–7.
 472. Dobrucki LW, Tsutsumi Y, Kalinowski L, Dean J, Gavin M, Sen S, et al. Analysis of angiogenesis induced by local IGF-I expression after myocardial infarction using microSPECT-CT imaging. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(6):1071–9.
 473. Brooks AJ, Waters MJ. The growth hormone receptor: mechanism of activation and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol*. 2010 Sep 27;6(9):515–25.
 474. Lang CH, Hong-Brown L, Frost RA. Cytokine inhibition of JAK-STAT signaling: a new mechanism of growth hormone resistance. *Pediatr Nephrol*. 2005 Mar;20(3):306–12.
 475. Owens GK, Reidy MA. Hyperplastic growth response of vascular smooth muscle cells following induction of acute hypertension in rats by aortic coarctation. *Circ Res*. 1985 Nov;57(5):695–705.
 476. Hansson H-A, Jennische E, Skottner A. IGF-I expression in blood vessels varies with vascular load. *Acta Physiol Scand*. 1987 Feb;129(2):165–9.
 477. Delafontaine P, Lou H, Alexander RW. Regulation of insulin-like growth factor I messenger RNA levels in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 1991 Dec;18(6):742–7.
 478. Bruel A, Oxlund H. Biosynthetic growth hormone increases the collagen deposition rate in rat aorta and heart. *Eur J Endocrinol*. 1995;132(2):195–9.
 479. Bruel A, Oxlund H. Growth hormone influences the content and composition of collagen in the aorta from old rats. *Mech Ageing Dev*. 2002;123(6):627–35.
 480. Kadomatsu K, Tomomura M, Muramatsu T. cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988 Mar;151(3):1312–8.
 481. Lee SH, Suh HN, Lee YJ, Seo BN, Ha JW, Han HJ. Midkine prevented hypoxic injury of mouse embryonic stem cells through activation of Akt and HIF-1 α via low-density lipoprotein receptor-related protein-1. *J Cell Physiol*. 2012

- Apr;227(4):1731–9.
482. Kerzerho J, Adotevi O, Castelli FA, Dosset M, Bernardeau K, Szely N, et al. The Angiogenic Growth Factor and Biomarker Midkine Is a Tumor-Shared Antigen. *J Immunol*. 2010 Jul 1;185(1):418–23.
 483. Weckbach LT, Groesser L, Borgolte J, Pagel JI, Pogoda F, Schymeinsky J, et al. Midkine acts as proangiogenic cytokine in hypoxia-induced angiogenesis. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2012;303(4):429–38.
 484. Lautz T, Lasch M, Borgolte J, Troidl K, Pagel J-I, Caballero-Martinez A, et al. Midkine Controls Arteriogenesis by Regulating the Bioavailability of Vascular Endothelial Growth Factor A and the Expression of Nitric Oxide Synthase 1 and 3. *EBioMedicine*. 2018 Jan;27:237–46.
 485. Fujiwara K, Maliza R, Tofrizal A, Batchuluun K, Ramadhani D, Tsukada T, et al. In situ hybridization analysis of the temporospatial expression of the midkine/pleiotrophin family in rat embryonic pituitary gland. *Cell Tissue Res*. 2014 Jul 10;357(1):337–44.
 486. Lejay A, Choquet P, Thaveau F, Singh F, Schlagowski A, Charles A-L, et al. A New Murine Model of Sustainable and Durable Chronic Critical Limb Ischemia Fairly Mimicking Human Pathology. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2015;49(2):205–12.
 487. Stabile E, Burnett MS, Watkins C, Kinnaird T, Bachis A, la Sala A, et al. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation*. 2003 Jul 15;108(2):205–10.
 488. Hellingman AA, Bastiaansen AJNM, de Vries MR, Seghers L, Lijkwan MA, Löwik CW, et al. Variations in surgical procedures for hind limb ischaemia mouse models result in differences in collateral formation. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2010 Dec;40(6):796–803.
 489. Widmer LW, Vikatmaa P, Aho P, Lepäntalo M, Venermo M. Reliability and repeatability of toe pressures measured with laser Doppler and portable and stationary photoplethysmography devices. *Ann Vasc Surg*. 2012 Apr;26(3):404–10.
 490. Silva H, Ferreira HA, da Silva HP, Monteiro Rodrigues L. The Venoarteriolar Reflex Significantly Reduces Contralateral Perfusion as Part of the Lower Limb Circulatory Homeostasis in vivo. *Front Physiol*. 2018;9:1123.
 491. Hoefler IE, van Royen N, Jost MM. Experimental models of arteriogenesis: differences and implications. *Lab Anim (NY)*. 2006 Feb;35(2):36–44.
 492. Bondke A, Hillmeister P, Buschmann IR. Exact Assessment of Perfusion and Collateral Vessel Proliferation in Small Animal Models. *Circ Res*. 2007 Apr 27;100(8).
 493. Hiatt WR, Armstrong EJ, Larson CJ, Brass EP. Pathogenesis of the Limb Manifestations and Exercise Limitations in Peripheral Artery Disease. *Circ Res*. 2015;116(9):1527–39.
 494. McDermott MM. Lower extremity manifestations of peripheral artery disease: the pathophysiologic and functional implications of leg ischemia. *Circ Res*. 2015 Apr 24;116(9):1540–50.
 495. Pipinos II, Sharov VG, Shepard AD, Anagnostopoulos P V., Katsamouris A, Todor A, et al. Abnormal mitochondrial respiration in skeletal muscle in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*. 2003;38(4):827–32.

496. Pipinos II, Judge AR, Zhu Z, Selsby JT, Swanson SA, Johanning JM, et al. Mitochondrial defects and oxidative damage in patients with peripheral arterial disease. *Free Radic Biol Med.* 2006;41(2):262–9.
497. Mañón, Garrido G, Nuñez A. Biomarcadores del estrés oxidativo en la terapia antioxidante. *J Pharm Pharmacogn Res.* 2016;4(2):62–83.
498. Weiss DJ, Casale GP, Koutakis P, Nella AA, Swanson SA, Zhu Z, et al. Oxidative damage and myofiber degeneration in the gastrocnemius of patients with peripheral arterial disease. *J Transl Med.* 2013;11:230.
499. Melov S, Shoffner JM, Kaufman A, Wallace DC. Marked increase in the number and variety of mitochondrial DNA rearrangements in aging human skeletal muscle. *Nucleic Acids Res.* 1995 Oct 25;23(20):4122–6.
500. Bhat HK, Hiatt WR, Hoppel CL, Brass EP. Skeletal muscle mitochondrial DNA injury in patients with unilateral peripheral arterial disease. *Circulation.* 1999;99(6):807–12.
501. Rouslin W. Mitochondrial complexes I, II, III, IV, and V in myocardial ischemia and autolysis. *Am J Physiol.* 1983;244(6):H743-748.
502. Brass EP, Hiatt WR, Gardner AW, Hoppel CL. Decreased NADH dehydrogenase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase in peripheral arterial disease. *Am J Physiol Hear Circ Physiol.* 2001;280(2):H603-9.
503. Barker GA, Green S, Green AA, Walker PJ. Walking performance, oxygen uptake kinetics and resting muscle pyruvate dehydrogenase complex activity in peripheral arterial disease. *Clin Sci (Lond).* 2004 Mar 1;106(3):241–9.
504. Keane J, Tajouri L, Gray B. The effect of growth hormone administration on the regulation of mitochondrial apoptosis in-vivo. *Int J Mol Sci.* 2015;16(6):12753–72.
505. Suzuki K, Yanagi K, Shimizu M, Wakamatsu S, Niitani T, Hosonuma S, et al. Effect of growth hormone replacement therapy on plasma diacron-reactive oxygen metabolites and endothelial function in Japanese patients: The GREAT clinical study. *Endocr J.* 2017 Oct 25;65(1):101–11.
506. Bossone E, Limongelli G, Malizia G, Ferrara F, Vrizz O, Citro R, et al. The T.O.S.C.A. Project: research, education and care. *Monaldi Arch Chest Dis - Card Ser Fond Salvatore Maugeri.* 2011 Dec;76(4):198–203.
507. Steyn FJ, Tolle V, Chen C, Epelbaum J. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion. *Compr Physiol.* 2016;6(2):687–735.
508. Devesa J, Lima L, Tresguerres J a. Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. *Trends Endocrinol Metab.* 1992;3(5):175–83.
509. Rubinek T, Modan-Moses D. Klotho and the Growth Hormone/Insulin-Like Growth Factor 1 axis: novel insights into complex interactions. In: *Vitamins and Hormones.* 1st ed. Academic Press: Cambridge, MA, USA; 2016. p. 85–118.
510. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature.* 1997 Nov 6;390(6655):45–51.
511. Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y. Identification of the HumanKlothoGene and Its Two Transcripts Encoding Membrane and SecretedKlothoProtein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Jan;242(3):626–30.
512. Nagai R, Hoshino Y. Molecular genetics of cardiovascular diseases. *Rinsho Byori.*

- 1998 Mar;46(3):249–57.
513. Saito Y, Yamagishi T, Nakamura T, Ohyama Y, Aizawa H, Suga T, et al. Klotho protein protects against endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;248(2):324–9.
 514. Nagai R, Saito Y, Ohyama Y, Aizawa H, Suga T, Nakamura T, et al. Endothelial dysfunction in the klotho mouse and downregulation of klotho gene expression in various animal models of vascular and metabolic diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(5):738–46.
 515. Saito Y, Nakamura T, Ohyama Y, Suzuki T, Iida A, Shiraki-Iida T, et al. In Vivo klotho Gene Delivery Protects against Endothelial Dysfunction in Multiple Risk Factor Syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;276(2):767–72.
 516. Rhee E-J, Oh K-W, Lee W-Y, Kim S-Y, Jung C-H, Kim B-J, et al. The differential effects of age on the association of KLOTHO gene polymorphisms with coronary artery disease. *Metabolism.* 2006 Oct;55(10):1344–51.
 517. Shahmoon S, Rubinfeld H, Wolf I, Cohen ZR, Hadani M, Shimon I, et al. The aging suppressor klotho: a potential regulator of growth hormone secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014 Aug 1;307(3):E326–34.
 518. Chung C-P, Chang Y-C, Ding Y, Lim K, Liu Q, Zhu L, et al. α -Klotho expression determines nitric oxide synthesis in response to FGF-23 in human aortic endothelial cells. *Delia MA, editor. PLoS One.* 2017 May 2;12(5):e0176817.
 519. Kurosu H. Suppression of Aging in Mice by the Hormone Klotho. *Science (80-).* 2005 Sep 16;309(5742):1829–33.
 520. Schmid C, Neidert MC, Tschopp O, Sze L, Bernays RL. Growth hormone and Klotho. *J Endocrinol.* 2013 Nov;219(2):R37–57.
 521. Six I, Okazaki H, Gross P, Cagnard J, Boudot C, Maizel J, et al. Direct, acute effects of Klotho and FGF23 on vascular smooth muscle and endothelium. *PLoS One.* 2014;9(4).
 522. Friedenstein AJ, Petrakova K V, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968 Mar;6(2):230–47.
 523. da Silva Meirelles L, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009 Oct;20(5–6):419–27.
 524. Kassis I, Zangi L, Rivkin R, Levdansky L, Samuel S, Marx G, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant.* 2006 May 3;37(10):967–76.
 525. Zou Z, Zhang Y, Hao L, Wang F, Liu D, Su Y, et al. More insight into mesenchymal stem cells and their effects inside the body. *Expert Opin Biol Ther.* 2010 Feb 21;10(2):215–30.
 526. Lin G, Garcia M, Ning H, Banie L, Guo Y-L, Lue TF, et al. Defining Stem and Progenitor Cells within Adipose Tissue. *Stem Cells Dev.* 2008 Dec;17(6):1053–63.
 527. Corselli M, Chen C-W, Crisan M, Lazzari L, Péault B. Perivascular Ancestors of Adult Multipotent Stem Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Jun;30(6):1104–9.
 528. Amato B, Compagna R, Amato M, Grande R, Butrico L, Rossi A, et al. Adult Vascular Wall Resident Multipotent Vascular Stem Cells, Matrix

- Metalloproteinases, and Arterial Aneurysms. *Stem Cells Int.* 2015;2015:1–16.
529. Siow R. Migration of adventitial myofibroblasts following vascular balloon injury: insights from in vivo gene transfer to rat carotid arteries. *Cardiovasc Res.* 2003 Jul 1;59(1):212–21.
530. Li G, Chen S-J, Oparil S, Chen Y-F, Thompson JA. Direct In Vivo Evidence Demonstrating Neointimal Migration of Adventitial Fibroblasts After Balloon Injury of Rat Carotid Arteries. *Circulation.* 2000 Mar 28;101(12):1362–5.
531. Faggin E, Puato M, Zardo L, Franch R, Millino C, Sarinella F, et al. Smooth Muscle-Specific SM22 Protein Is Expressed in the Adventitial Cells of Balloon-Injured Rabbit Carotid Artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Jun;19(6):1393–404.
532. Haurani M, Pagano P. Adventitial fibroblast reactive oxygen species as autocrine and paracrine mediators of remodeling: Bellwether for vascular disease? *Cardiovasc Res.* 2007 Sep 1;75(4):679–89.
533. Herrmann J, Samee S, Chade A, Porcel MR, Lerman LO, Lerman A. Differential Effect of Experimental Hypertension and Hypercholesterolemia on Adventitial Remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Feb;25(2):447–53.
534. Li L, Ren W, Li J, Liu J, Wang L, Zheng X, et al. Increase in serum pregnancy-associated plasma protein-A is correlated with increase in cardiovascular risk factors in adult patients with growth hormone deficiency. *Endocrine.* 2012 Oct;42(2):375–81.
535. Stenmark KR, Davie N, Frid M, Gerasimovskaya E, Das M. Role of the Adventitia in Pulmonary Vascular Remodeling. *Physiology.* 2006 Apr;21(2):134–45.
536. Jin K, Li B, Lou L, Xu Y, Ye X, Yao K, et al. In vivo vascularization of MSC-loaded porous hydroxyapatite constructs coated with VEGF-functionalized collagen/heparin multilayers. *Sci Rep.* 2016 Apr 22;6(1):19871.
537. Khaki M, Salmanian AH, Abtahi H, Ganji A, Mosayebi G. Mesenchymal Stem Cells Differentiate to Endothelial Cells Using Recombinant Vascular Endothelial Growth Factor -A. *Reports Biochem Mol Biol.* 2018 Apr;6(2):144–50.
538. Devesa J, Caicedo D. The Role of Growth Hormone on Ovarian Functioning and Ovarian Angiogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:450.
539. Galvão AM, Skarzynski D, Ferreira-Dias G. Luteolysis and the Auto-, Paracrine Role of Cytokines From Tumor Necrosis Factor α and Transforming Growth Factor β Superfamilies. In: *Vitamins and Hormones.* Academic Press: Cambridge, MA, USA; 2018. p. 287–315.
540. Xie Q, Cheng Z, Chen X, Lobe CG, Liu J. The role of Notch signalling in ovarian angiogenesis. *J Ovarian Res.* 2017 Dec 11;10(1):13.
541. Joaquin C, Aguilera E, Granada ML, Pastor MC, Salinas I, Alonso N, et al. Effects of GH treatment in GH-deficient adults on adiponectin, leptin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Eur J Endocrinol.* 2008;158(4):483–90.
542. Marra AM, Bobbio E, D'Assante R, Salzano A, Arcopinto M, Bossone E, et al. Growth Hormone as Biomarker in Heart Failure. *Heart Fail Clin.* 2018;14(1):65–74.
543. Gazzaruso C, Gola M, Karamouzis I, Giubbini R, Giustina A. Cardiovascular risk in adult patients with growth hormone (GH) deficiency and following substitution with GH-An update. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(1):18–29.
544. Maison P, Griffin S, Nicoue-Beglah M, Haddad N, Balkau B, Chanson P. Impact

- of growth hormone (GH) treatment on cardiovascular risk factors in GH-deficient adults: a Metaanalysis of Blinded, Randomized, Placebo-Controlled Trials. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(5):2192–9.
545. Elbornsson M, Götherström G, Bosæus I, Bengtsson B-Å, Johannsson G, Svensson J. Fifteen years of GH replacement improves body composition and cardiovascular risk factors. *Eur J Endocrinol.* 2013 May;168(5):745–53.
 546. Muniyappa R, Walsh MF, Rangi JS, Zayas RM, Standley PR, Ram JL, et al. Insulin like growth factor 1 increases vascular smooth muscle nitric oxide production. *Life Sci.* 1997;61(9):925–31.
 547. Sverrisdóttir YB, Elam M, Caidahl K, Söderling A-S, Herlitz H, Johannsson G. The effect of growth hormone (GH) replacement therapy on sympathetic nerve hyperactivity in hypopituitary adults: a double-blind, placebo-controlled, crossover, short-term trial followed by long-term open GH replacement in hypopituitary adults. *J Hypertens.* 2003 Oct;21(10):1905–14.
 548. Molitch ME, Clemmons DR, Malozowski S, Merriam GR, Vance ML. Evaluation and treatment of adult growth hormone deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(6):1587–609.
 549. Planat-Benard V, Silvestre J-S, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation.* 2004 Feb 10;109(5):656–63.
 550. Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Dec;25(12):2542–7.
 551. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation.* 2004 Jul 20;110(3):349–55.
 552. Sverrisdóttir YB, Elam M, Herlitz H, Bengtsson BA, Johannsson G. Intense sympathetic nerve activity in adults with hypopituitarism and untreated growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(6):1881–5.
 553. Ruiters MS, van Golde JM, Schaper NC, Stehouwer CD, Huijberts MS. Diabetes impairs arteriogenesis in the peripheral circulation: review of molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond).* 2010;119(6):225–38.
 554. Martínez-Nieves B, Dunbar JC. Vascular dilatatory responses to sodium nitroprusside (SNP) and alpha-adrenergic antagonism in female and male normal and diabetic rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999 Oct;222(1):90–8.
 555. Stevens MJ, Edmonds ME, Douglas SL, Watkins PJ. Influence of neuropathy on the microvascular response to local heating in the human diabetic foot. *Clin Sci.* 1991;80(3):249–56.
 556. Leininger GM, Vincent AM, Feldman EL. The role of growth factors in diabetic peripheral neuropathy. *J Peripher Nerv Syst.* 2004;9(1):26–53.
 557. Cen Y, Liu J, Qin Y, Liu R, Wang H, Zhou Y, et al. Denervation in femoral artery-ligated hindlimbs diminishes ischemic recovery primarily via impaired arteriogenesis. *PLoS One.* 2016;11(5):1–18.
 558. Meusel M, Herrmann M, Machleidt F, Franzen KF, Krapalis AF, Sayk F. GHRH-mediated GH release is associated with sympathoactivation and baroreflex resetting: a microneurographic study in healthy humans. *Am J Physiol Regul*

- Integr Comp Physiol. 2019;317(1):R15–24.
559. England JD, Ferguson MA, Hiatt WR, Regensteiner JG. Progression of neuropathy in peripheral arterial disease. *Muscle Nerve*. 1995 Apr;18(4):380–7.
 560. Devesa P, Gelabert M, González-Mosquera T, Gallego R, Relova JL, Devesa J, et al. Growth hormone treatment enhances the functional recovery of sciatic nerves after transection and repair. *Muscle Nerve*. 2012;45(3):385–92.
 561. McGuigan MR, Bronks R, Newton RU, Sharman MJ, Graham JC, Cody D V, et al. Muscle fiber characteristics in patients with peripheral arterial disease. *Med Sci Sports Exerc*. 2001 Dec;33(12):2016–21.
 562. Mitchell RG, Duscha BD, Robbins JL, Redfern SI, Chung J, Bensimhon DR, et al. Increased levels of apoptosis in gastrocnemius skeletal muscle in patients with peripheral arterial disease. *Vasc Med*. 2007 Nov 30;12(4):285–90.
 563. Weber MM. Effects of growth hormone on skeletal muscle. *Horm Res*. 2002;58 Suppl 3:43–8.
 564. Baum HB, Biller BM, Finkelstein JS, Cannistraro KB, Oppenheim DS, Schoenfeld DA, et al. Effects of physiologic growth hormone therapy on bone density and body composition in patients with adult-onset growth hormone deficiency. A randomized, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med*. 1996 Dec 1;125(11):883–90.
 565. McCarthy JJ, Esser KA. Anabolic and catabolic pathways regulating skeletal muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010;13(3):230–5.
 566. Yoon M-S. mTOR as a Key Regulator in Maintaining Skeletal Muscle Mass. *Front Physiol*. 2017;8:788.
 567. Lozier NR, Kopchick JJ, de Lacalle S. Relative Contributions of Myostatin and the GH/IGF-I Axis in Body Composition and Muscle Strength. *Front Physiol*. 2018 Nov 1;9:1418.
 568. Castellero E, Akashi H, Wang C, Najjar M, Ji R, Kennel PJ, et al. Cardiac myostatin upregulation occurs immediately after myocardial ischemia and is involved in skeletal muscle activation of atrophy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Jan;457(1):106–11.
 569. Spanos K, Saleptsis V, Athanasoulas A, Karathanos C, Bargiota A, Chan P, et al. Factors Associated with Ulcer Healing and Quality of Life in Patients with Diabetic Foot Ulcer. *Angiology*. 2017;68(3).
 570. Payan DG. Neuropeptides and inflammation: the role of substance P. *Annu Rev Med*. 1989;40(1):341–52.
 571. O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol*. 2004 Nov;201(2):167–80.
 572. Harrison S, Geppetti P. Substance p. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33(6):555–76.
 573. Matsuda H, Kawakita K, Kiso Y, Nakano T, Kitamura Y. Substance P induces granulocyte infiltration through degranulation of mast cells. *J Immunol*. 1989;142(3):927–31.
 574. Ni T, Liu Y, Peng Y, Li M, Fang Y, Yao M. Substance P induces inflammatory responses involving NF- κ B in genetically diabetic mice skin fibroblasts co-cultured with macrophages. *Am J Transl Res*. 2016;8(5):2017–188.
 575. Amann R, Egger T, Schuligoi R. The tachykinin NK(1) receptor antagonist SR140333 prevents the increase of nerve growth factor in rat paw skin induced by

- substance P or neurogenic inflammation. *Neuroscience*. 2000;100(3):611–5.
576. Scharfmann R, Atouf F, Tazi A, Czernichow P. Growth hormone and prolactin regulate the expression of nerve growth factor receptors in INS-1 cells. *Endocrinology*. 1994 Jun;134(6):2321–8.
 577. Mashaghi A, Marmalidou A, Tehrani M, Grace PM, Pothoulakis C, Dana R. Neuropeptide substance P and the immune response. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(22):4249–64.
 578. Arita J, Kojima Y, Yamamoto I, Mazawa S, Kimura F. Somatotropes and thyrotropes in the rat anterior pituitary gland cosecrete substance P: analysis by the sandwich cell immunoblot assay. *Neuroendocrinology*. 1994;60(6):567–74.
 579. Lemamy GJ, Guillaume V, Ndéboko B, Mouecoucou J, Oliver C. Substance P stimulates Growth Hormone (GH) and GH-Releasing Hormone (GHRH) secretions through tachykinin NK2 receptors in sheep. *Peptides*. 2012;35(1):60–4.
 580. Coiro V, Volpi R, Capretti L, Speroni G, Bocchi R, Caffarri G, et al. Intravenously infused substance P enhances basal and growth hormone (GH) releasing hormone-stimulated GH secretion in normal men. *Peptides*. 1992;13(4):843–6.
 581. Fasshauer M, Klein J, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 expression is stimulated by growth hormone and interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;317(2):598–604.
 582. Meazza C, Pagani S, Travaglino P, Bozzola M. Effect of growth hormone (GH) on the immune system. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2004 Aug;1 Suppl 3:490–5.
 583. Borrione P, Grasso L, Pautasso M, Parisi A, Quaranta F, Ciminelli E, et al. Impact of different concentrations of human recombinant growth hormone on T lymphocytes. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 25(1):87–97.
 584. Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN, et al. Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell*. 1993 Jul 30;74(2):237–44.
 585. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Jun;117(7 Suppl):1e-S-32e-S.
 586. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16(5):585–601.
 587. Thorey IS, Hinz B, Hoeflich A, Kaesler S, Bugnon P, Elmlinger M, et al. Transgenic mice reveal novel activities of growth hormone in wound repair, angiogenesis, and myofibroblast differentiation. *J Biol Chem*. 2004;279(25):26674–84.
 588. Messias de Lima Ms et al. Topical Growth Hormone Accelerates Wound Healing in Mice. *Wounds*. 2016;29 (12)(September):387–92.
 589. Mazo IB, Massberg S, von Andrian UH. Hematopoietic stem and progenitor cell trafficking. *Trends Immunol*. 2011 Oct;32(10):493–503.
 590. Zheng H, Fu G, Dai T, Huang H. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007 Sep;50(3):274–80.
 591. Lee Y, Kim JM, Lee EJ. Functional expression of CXCR4 in somatotrophs: CXCL12 activates GH gene, GH production and secretion, and cellular proliferation. *J Endocrinol*. 2008 Nov;199(2):191–9.

592. Barbieri F, Bajetto A, Porcille C, Pattarozzi A, Schettini G, Florio T. Role of stromal cell-derived factor 1 (SDF1/CXCL12) in regulating anterior pituitary function. *J Mol Endocrinol*. 2007;38(3-4):383-9.
593. Smaniotto S, De Mello-Coelho V, Villa-Verde DMS, Pléau JM, Postel-Vinay MC, Dardenne M, et al. Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12. *Endocrinology*. 2005;146(7):3005-17.
594. Smaniotto S, Martins-Neto AA, Dardenne M, Savino W. Growth hormone is a modulator of lymphocyte migration. *Neuroimmunomodulation*. 2011;18(5):309-13.



ANEXOS

Junto con esta tesis se adjuntan, además de los artículos del compendio comentados, material suplementario sobre el capítulo de un libro titulado Growth Hormone and Wound Healing, dentro del libro sobre cicatrización titulado: Wound Healing (DOI: 10.5772/intechopen.80978). Dicho capítulo se comenta en el apartado correspondiente de GH y cicatrización junto con el artículo número 4. También se anexan los justificantes sobre autorizaciones para la realización del ensayo clínico y del estudio experimental que aquí se presentan como trabajos originales.

En una carpeta independiente, se han añadido los permisos pedidos por el copyright de aquellas figuras que lo precisaban. Por último, se adjuntan aquellos documentos que se exigen como la solicitud de lectura, la idoneidad o la renuncia de los coautores doctores y no doctores.



Growth Hormone (GH) and Wound Healing

Diego Caicedo and Jesús Devesa

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.80978>

Abstract

Wound healing is complex and numerous factors overlap perfectly with the goal of wound closure. Among them, we will focus on a large amount of experimental and clinical evidence on the action of GH in wound repair. We will analyze how the physiological rhythm of GH secretion influences this process, and also one of the most important signaling pathways that mediate the effects of GH on tissue regeneration. The role of IGF-1 and the factors that stimulate GH secretion and that have also been shown to improve healing will also be reviewed. In addition, it will be analyzed the cellular senescence process, which plays a key role in nonhealing wounds associated with chronic diseases. The benefit of GH in this last circumstance is especially important. The lesions associated with catabolic states, mainly burns, are considered a delicate situation in which it is extraordinarily difficult to act with growth factors due to the fragile situation of these patients, often children. The positive action of GH in these states will also be described. In summary, we will analyze many evidences about the beneficial effects of GH and its main secretagogues in the healing of wounds.

Keywords: wound healing, growth hormone, tissue regeneration, IGF-1, cellular senescence, chronic diseases, catabolic states, secretagogues

1. Introduction

Wound healing represents a major challenge in medicine due to its complexity and potential severity. It is a sequential process that requires the perfect interaction of many factors and cell types. As is well known, the key aspects in wound healing are the growth of granulation tissue and the proliferation and migration of keratinocytes at the edges of the wound. For this, a series of cytokines and growth factors arriving from blood and others produced locally, act in an autocrine or paracrine manner, orchestrating the communication between cells and

regulating the healing process [1–4]. In the normal repair of a tissue, the resident cells have the mission of producing these cytokines and growth factors that cooperate in their repair function. In fact, it has been discovered that some of them promote cell proliferation, angiogenesis, and synthesis of extracellular matrix (ECM) [5]. Therefore, the direct application in the wound of specific stimulating peptides is expected to increase the healing of chronic ulcers until now considered as incurable.

We currently know that growth hormone (GH) is a pleiotropic factor capable of acting positively in many organs and tissues. For years, the use of GH for wound healing has been investigated [6, 7]. For example, the use of recombinant human GH as an anabolic treatment in burns to accelerate wound healing is already classic [8, 9]. Patients with severe burns who were treated with systemic GH improved both their healing and their survival [10, 11]. More recently, a number of studies have shown that GH is a promising agent in the acceleration of wound healing [12, 13]. In addition to the stimulation of granulation tissue formation, GH increases collagen deposition, and facilitates epithelialization [14, 15]. This effect of GH has been seen in experimental models of undernourished rats, in which the administration of the hormone made the granulation tissue to grow in previously induced wounds [16]. Similar results have been found in GH-transgenic mice models [17]. Although contradictory data can be found in the literature on this particular action of GH, most studies support its benefit, and evidence of its positive effects (**Table 1**) will be described widely later in the text. It should be noticed that GH activation normally is produced in morbid conditions as catabolic or chronic diseases, and it may have no effect in healthy subjects. For example, when we artificially produce an injury in normal individuals, there are no differences about the speed of wound healing between GH-treated subjects and controls [18]. Furthermore, some data suggest that systemic GH treatment is detrimental for wound healing in healthy individuals [19]. The same is found in healthy people if we try to stimulate the immune system with GH [20]. There is much evidence to support an angiogenic effect of GH in patients with critical limb ischemia that suffer usually from ischemic ulcers; or its benefit in aging or in diabetes mellitus (DM) [21, 22]. The latter data show the specific role that the hormone can play depending on the morbid condition of the patient. **Figures 1–3** show the evolution of a patient with critical ischemia of the lower limbs, suffering from an ulcer, before and after 8 weeks of treatment with subcutaneous GH administration (0.4 mg/day).

The regulation of metabolic factors acting on wound healing is well known, albeit some aspects have still to be elucidated. Growth hormone-releasing hormone (GHRH) and Ghrelin are some of the most important factors controlling not only the synthesis and release of GH from the pituitary gland, but also regulating the GH receptor (GHR) and its function [23, 24]. As it will be detailed further, both hormones have also been described as having the ability to improve the healing process. Although this is not the aim of this review, at this point we cannot forget the association between Klotho and the GH/IGF-1 axis [22], especially during aging.

The key problem is to find the best way for the hormone to be administered, and the best vehicle to carry it out. However, while for GH both systemic and local administration have been demonstrated to be effective in the healing of wounds, in the case of IGF-1, the main mediator of GH actions, systemic, unlike local use, has no effect, probably because GH can have direct actions that are added to its indirect actions stimulating other growth factors involved in

-
- A. Inflammation phase
- Stimulates the recruitment of inflammatory cells: monocytes and T-lymphocytes by increasing MCP-1, without changing neutrophil count.
 - Diffuse wound occupation of inflammatory cells.
- B. Proliferation phase: granulation tissue formation (dose-dependent)
- Diffuse wound occupation of fibroblasts and myofibroblast.
 - Increase fibroblasts proliferation along with total collagen deposition.
 - Increase secretion of ECM: scaffold function.
 - Increase proliferation and migration of keratinocytes, accelerating epithelization.
 - Angiogenesis:
 - ◊ Boosts the formation of capillaries.
 - ◊ Directly, or indirectly: VEGF, FGF, or SDF-1.
 - ◊ Attraction of endothelial cells from the bone marrow.
 - It could improve neurogenic response.
 - High doses of GH can delay wound closure (overgrowth of granulation tissue).
- C. Remodeling phase
- Accelerates the remodeling of the granulation tissue.
-

Table 1. Key points about evidence of GH and wound healing.

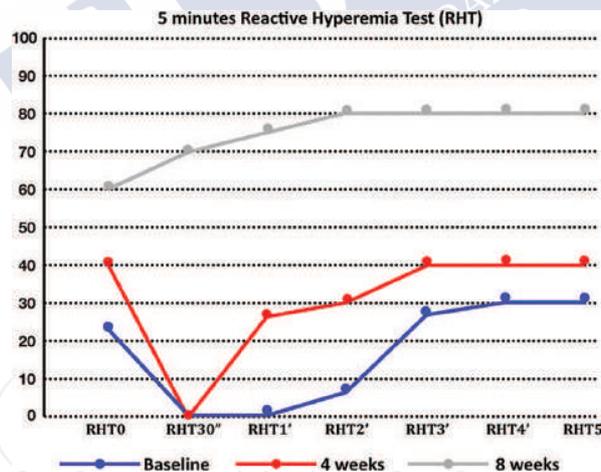


Figure 1. Five minutes reactive hyperemia test. Response to artificially induced ischemia in an affected limb with Chronic limb-threatening ischemia and a nonhealing wound. The limb is compressed until losing the flow for 5 minutes. Results after 8 weeks of systemic GH treatment. RHT: reactive hyperemia test; RHT0: ankle pressure at baseline; RHT30'': ankle pressure at 30 seconds; RHT1'-2'-3'-4'-5': ankle pressure at 1, 2, 3, 4 and 5 minutes. y axis: mm Hg (data obtained from the GHAS trial).

wound healing. It has to be highlighted that the concentration of GH, when applied locally, and the dose, when a systemic administration is chosen, are also of importance and may determine the final effect and/or the appearance of complications. Systemic GH may increase the collagen production and mechanical strength of wounds [15, 25]. It has been reported



Figure 2. Evolution in the same patient that in **Figure 1** of the ankle-brachial index (ABI), calculated as the rate of the arterial ankle pressure divided by the arterial brachial pressure, and the arterial pressure at the ankle (measured in mmHg). Results show a positive evolution in angiogenesis, parallel to the wound evolution and the 5 minutes RHT (data obtained from the GHAS trial).



Figure 3. Picture of a nonhealing wound in the same patient as in **Figure 1** suffering from Chronic limb-threatening ischemia. Evolution after 8 weeks of systemic administration of GH: (A) baseline picture and (B) final picture (data obtained from the GHAS trial).

that systemic GH administration could accelerate the split-thickness skin defect in pigs [7]. However, systemic use of GH may induce side effects that must be considered when using this way. Such collateral effects are dependent on dose and time of administration. Although the topical use of GH seems to be better to reduce the possibility of side effects, unfortunately, this way of administration also present some deficiencies. Nevertheless, GH therapy has also the advantage of its relatively low cost. To produce growth factors for medical use in non-healing wounds is costly, and hence, increasing the production of these factors by local GH administration, could be more cost-effective.

2. Experimental and clinical evidences of GH action on wound healing

GH actions on wound healing have been evaluated in different studies from the macroscopic and microscopic points of view.

During the inflammatory phase of skin wounds in mice, GH stimulated the recruitment of inflammatory cells after 3 days of topical treatment, allowing to improve the degradation of the injured tissue [26]. Monocytes, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and T-lymphocytes play a key role in the control of the healing process. GH is a strong inductor of these cells [27–29] and activates human monocyte chemotaxis and migration [29]. A low dose of exogenous GH administration induces the expression of MCP-1 mRNA up to eight-fold [28]. However, as it will be described further, the stimulation of these immune cells by GH not only benefits inflammatory phase, but also angiogenic and neurogenic responses [19]. After analyzing the areas of wounds in the inflammatory phase when GH is used topically in mice, GH-treated mice increased the number of macrophages by about 15%, and the number of lymphocytes by 50% without changing neutrophil recruitment [26].

The effects of GH on the immune system have been extensively analyzed. In a model of peritonitis, GH reduced bacterial counts in the peritoneal layer and increased the number of exudative neutrophils [30]. Furthermore, GH increases the thymic mass in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV), and the number of CD4⁺ T-lymphocytes [31]. In these cases, GH was able to restore immune function.

A study in male mice in which an incision wound occurred showed that local administration of GH led to increased cellular infiltration in the wound area, mainly occupied by inflammatory cells, fibroblasts, and myofibroblasts, while in the control group (who did not receive the hormone) this type of cellular infiltration was only observed at the edges of the wound. This finding indicates that GH, directly or indirectly, had accelerated the migration and recruitment of cells, such as fibroblasts, to the site of injury [26].

Fibroblasts play a key role in all aspects of this process. In response to early injury signals, fibroblasts proliferate and migrate into the wound. They significantly contribute to the synthesis of the extracellular matrix (ECM), providing a scaffold for cellular ingrowth [32]. In addition, fibroblasts secrete various important cytokines with both autocrine and paracrine effects [33–36]. This concept is schematized in **Figure 4**.

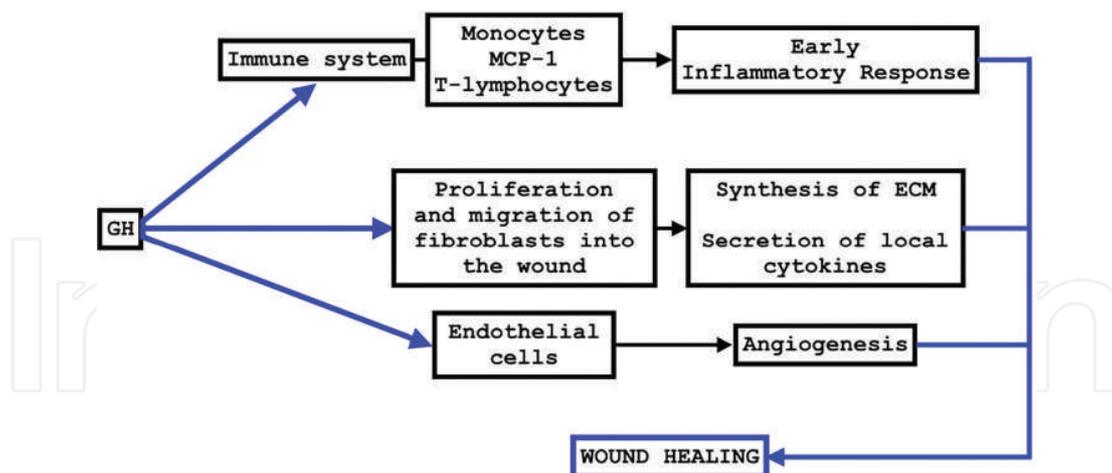


Figure 4. Schematic description of the effects of GH on a wound during the early inflammatory process and stages after it. Lastly, GH also induces the acceleration of the granulation tissue and the wound is healed. Blue arrows indicate stimulation.

The role of GH in accelerating the granulation tissue has been described in previous work [37]. The cell recruitment along with collagen deposition was also accelerated in response to GH during the phase of granulation tissue. An increased mitosis and migration of keratinocyte were found after 7 days of the incision in mice treated with the hormone, parallel to the secretion of ECM to give consistency to the aforementioned granulation tissue [26]. In this study, it was observed that GH accelerated the migration and proliferation of these cells already in the first week of treatment [26], but also the analysis of the samples showed that topical treatment with GH, regardless of the concentration used, increased the total collagen deposition after 7 and 14 days of treatment. That is, GH therapy not only accelerated the remodeling of the granulation tissue, but also the epithelization, with a more stratified epidermis. Another study showed that the systemic application of GH stimulated the formation of granulation tissue in wounds of malnourished rats [16].

In vitro studies on plates coated with Matrigel® with endothelial cells have shown that GH produces a mitogen effect, which affects cell morphology, increases ECM and boosts the formation of structures similar to capillaries [38]. Some data supporting the action of GH on collagen deposition have been described in patients with acromegaly, in whom the excess of GH determines severe cardiac damage with fibrosis [22].

The role of GH in fibroblast proliferation is crucial for the wound healing process [39]. In one study, when GH was applied topically, fibroblast proliferation increased significantly, as indicated by a tetrazolium-based colorimetric assay. However, the increase in proliferation differed according to the concentration of GH, being 2.5 IU/L the best dose to stimulate the proliferation of fibroblasts [40].

Angiogenesis plays a key role during the granulation phase and tissue remodeling, as new vessels are required for the progression of wound healing. Endothelial cells express the GHR [41], and the participation of GH in the latter process has been widely demonstrated and reviewed [21, 22, 42]. Moreover, GH-transgenic mice show an increase in blood vessels during tissue repair [19].

GH can act directly on endothelial cells through the GHR, or indirectly, by increasing others growth factors such as VEGF, FGF, or SDF-1; in this way, the hormone facilitates the proliferation, migration, and formation of endothelial cell tubes, as well as the attraction of that type of cells from the bone marrow through the CXCR4 receptor for SDF-1 [43].

The formation of blood vessels is already observed 7 days after the local administration of GH in mice. Again, the dose utilized is important, since at 10^{-7} M doses of GH a higher number of blood vessels was produced in the granulation tissue, compared to the control group and the group treated with GH 10^{-8} M [26]. A similar effect was also observed after 14 days of treatment, indicating that GH maintained its proangiogenic effect during the 2 weeks of application.

All these results point out that GH is a member of those molecules that have pleiotropic actions on skin cells, and confirm previous research showing that after an injury to the skin, the process of wound healing is accelerated in GH-transgenic mice overexpressing GH [19]. In the latter study, full-thickness incisional and excisional wounds developed a highly vascularized granulation tissue. However, the bursting strength of these injuries did not increase. In these injured mice, wound closure was even delayed as a result of increased granulation tissue formation, demonstrating that, on one hand, GH can grow this essential tissue for healing, but on the other hand, at high doses, the overgrowth of granulation tissue can even delay wound closure. The authors of this study also support the fact that this action of GH on healing is probably not mediated via IGF-1 [19], in contrast to previous studies that hypothesized a direct role of IGF-1, induced by GH, in healing wounds [44, 45]. Currently, many evidences support the fact that circulating IGF-1 does not affect the wound, but that IGF-1 produced locally by fibroblasts, macrophages, and endothelial cells is the responsible for wound healing [46, 47]. Nevertheless, topically applied GH also increases the concentration of IGF-1 mRNA in the granulation tissue in vivo [48]. In any case, if the effect of IGF-1 on wound healing occurs as a consequence of the local production of IGF-1, induced by GH within the wound, it is equally important the fact that the topical administration of GH can facilitate the healing of wounds.

Furthermore, as it will be described later, some of the hormones related to the control of GH secretion, as GHRH and Ghrelin, have also shown positive effects on wound healing, showing, once again, the strong influence of GH on wound healing.

2.1. Signaling pathways in wound healing

2.1.1. The JAK/STAT signaling pathway

The Janus kinase (JAK) signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway is considered one of the most relevant intracellular signaling pathways utilized by hormones, growth factors, and cytokines to carry out their cellular actions [49], and it is also involved in wound healing [50]. Cell proliferation, migration, differentiation, and apoptosis are mediated by this pathway [51]. When its control is altered, this promotes chronic inflammation.

Basically, the regulation of the JAK/STAT pathway is carried out by various mechanisms such as tyrosine phosphatase, internalization-degradation of signaling molecules, receptor antagonists, and inhibitors such as inhibitors of activated STAT proteins (PIAS) or suppressors of cytokine signaling proteins (SOCS) [52].

Indirect examples of the implication of this pathway in wound healing are the relationship of the same with the immune system, the main actor during healing. Inhibitors of the JAK/STAT signaling pathway are currently used to treat autoimmune diseases, including psoriasis and rheumatoid arthritis [53].

GHR is a transmembrane protein belonging to the family of receptors of class I cytokines, which homodimerizes after its binding to the ligand and signals through the family of tyrosine kinases of JAK2 and the recruitment of transcriptional factors of the STAT type, in particular isoforms 3 and 5. Intracellular signaling involves the activation by phosphorylation of different intracellular proteins, including IRS-1, MAPK, and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) [54]. Intracellular signaling induced by GH is downregulated by the family of cytokine signaling suppressors (SOCS) [55].

Different members of this pathway have been described, but their main mission is to transmit extracellular information, via specific receptors binding of the ligand and phosphorylation, to the nucleus. To describe the functioning of the latter pathway is out of the scope of this review, and we will focus on those aspects related to wound healing.

2.1.1.1. Role of JAK/STAT in wound healing

Fibroblasts, endothelial cells, keratinocytes, and macrophages, are some of the cells in which cytokines and growth factors, using the JAK/STAT pathway, play a key role during the wound repair process. Pathological conditions can affect the normal functioning of this pathway, delaying the closure of the wound, and leading to the development of a chronic wound [56]. For example, Feng and colleagues studied the gene expression pattern of seven SOCSs members in tissue collected from chronic venous leg ulcer patients; they found significantly higher mRNA levels of SOCS3 and SOCS4 in chronic nonhealing ulcers as compared to healing/healed ulcers [57]. In chronic wounds, it is required that the JAK/STAT pathway be upregulated, especially in cases when its normal functioning has been compromised; more specifically in an environment of senescent cells or DM where there is a reduced growth factor/receptor signaling [53].

As known, GH is one of the growth factors using the JAK/STAT pathway as an intracellular signaling pathway for exerting its actions. In fact, the inhibition of this GH signaling by SOCS members has been defended as a key factor affecting GH effect along with vasoinhibins. Moreover, GH induces the expression of CIS and SOCS1–3, which suggests that these proteins may also play a physiological role in the regulation of GH secretion. SOCS2 seems to act downregulating GH activity [58]. In this sense, pro-inflammatory cytokines such as IL-1B or TNF α , and endotoxins, which are frequently increased in inflammatory states such as DM or in patients suffering from severe peripheral ischemia, may induce SOCS proteins which could lead to a GH insensitivity. Nevertheless, SOCS2 has been found that paradoxically may upregulate GH signaling at high concentrations in mice [58]. Thus, both uncontrolled inflammation and infection at wounds may block the action of growth factors using this pathway, and delay the healing (**Figure 5**).

Although not properly known, the JAK/STAT signaling is regulated by SOCS proteins, having an influence on the action of cytokines and growth factors, as well as on the cells involved in the wound repair process [52]. SOCS have been related to inflammatory diseases,

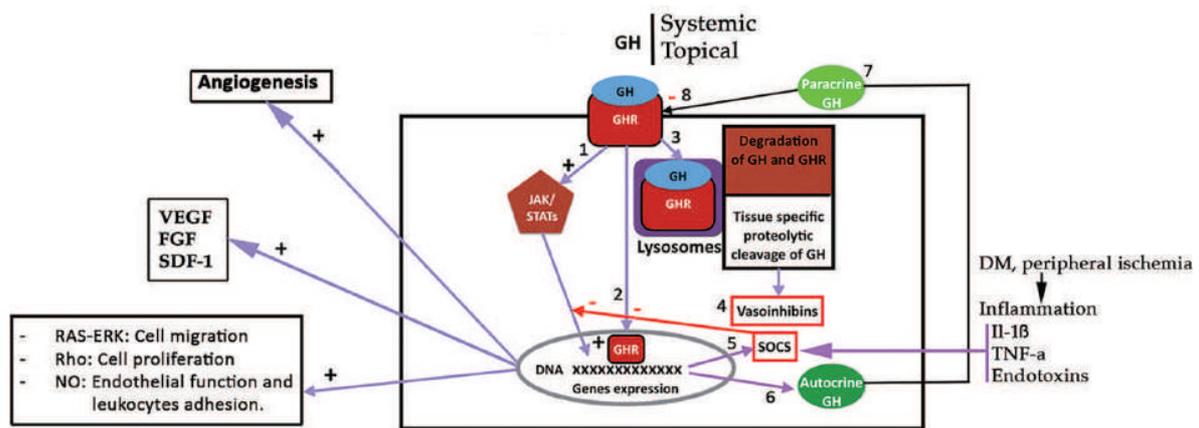


Figure 5. Activation of the GHR by GH, administered subcutaneously or secreted by the pituitary gland (systemic) or locally applied on the wound (topical). (1) After the interaction between GH and its receptor (GHR) a cascade of signaling pathways is initiated by JAK2 activation leading to the expression of a number of genes. (2) The GHR may be internalized together with GH and translocated to the nucleus, where it may also activate gene expression. (3) GH and GHR may suffer a lysosomal degradation after being internalized, but also, depending on the tissue, the hormone may suffer a specific proteolytic cleavage giving origin to vasoinhibins (4) which may block angiogenesis and arteriogenesis. (5) SOCS are expressed after GHR translocation to the nucleus of the cell, and they act by inhibiting GH signaling, directly or affecting the translocation of the GHR to the nucleus. (6, 7) Cells may express GH that acts in an autocrine (6) or paracrine (7) manner. This cellular production of the hormone may lead to an interaction with the membrane GHR (8) impeding the effects of endocrine, or exogenously administered hormone, or topically applied; these auto/paracrine GHs even may produce the desensitization of GHR, therefore impeding GH actions at this level. On the left of the figure, signals induced by GH on the expression of several genes leading to several positive effects, such as angiogenesis. On the right of the figure, it can be seen that some pathological situations, such as diabetes mellitus (DM) or peripheral ischemia lead to inflammation. In this situation, IL-1 β , TNF- α or endotoxins, induce the expression or activation of SOCS which block GH signaling pathways. Blue arrows: stimulation; red arrows and squares, inhibition. +: activation; -: inhibition.

since in the absence of SOCS3, IL-6 acts decreasing tumor necrosis factor alpha (TNF α), by inhibiting the STAT3 signaling. It has to be highlighted that immune response, crucial in wound healing, is modulated by IL6 [59]. SOCS4 and SOCS5 have also been linked to EGF signaling, regulating its receptor (EGFR), and affecting its signaling capacity in senescent fibroblast cells [53].

The effects of the JAK/STAT pathway seem to be time-dependent: positive and protective in early phases, while negative and inhibitory in the later chronic phase [60].

Upregulation of the STAT genes and activation of the STAT proteins have been directly linked to wound healing in intestinal epithelial cells [61].

Further investigations into cellular and molecular mechanisms and signaling pathways involved in wound healing, and methods of activating senescent cells through various treatments will add possible benefits on this process in the future; therefore GH, the anti-aging factor for excellence, could be one of them.

2.2. GH, circadian rhythm disorders, and wound healing

All organisms have an adaptive mechanism, and several of their functions are synchronized to environmental factors and possess biological clocks that endogenously estimate the time. Consequently, functions such as the sleep-wake cycle and secretion of various hormones

exhibit a rhythm with a characteristic period of ~24 hours (the so-called circadian rhythms). There is a relationship between feeding, the organs involved in food intake, metabolic networks, and circadian physiology. One of the most important endocrine axes involved in circadian rhythm is the axis Ghrelin-GH-IGF-1. The coordinating role of these hormones lies in regulating appetite, behavior, growth, and cell proliferation, with a clear influence in the metabolic regulation of nutrients and all those processes dependent of them, as it is wound healing. Some hormones have been implied in the regulation of circadian GH production, as cortisol, thyrotropin (TSH), and insulin, in addition to some important neurotransmitters [62].

Although GH is mainly released by the anterior pituitary gland, there is a peripheral GH production in practically all the organism, highly dependent on developmental stages, at the level of tissues as nervous system, or the immune, cardiovascular, gonadal, and musculoskeletal system. This peripheral GH plays an autocrine and paracrine role [63]. In humans, plasma GH shows a circadian pattern of secretion, different according to sex and age; during puberty, the hormone reaches its highest plasma values, but once puberty ends, the secretion of the hormone begins to decline until being practically undetectable in elder people [64].

The circadian pattern of GH is affected by nutritional status (caloric intake), age, stress, sex, physical exercise, and lack of sleep. Nutritional status is a key determinant in the regulation of GH secretion; thus, while fasting increases the frequency of GH secretion pulses, while IGF-1 levels decrease, in obesity the opposite occurs, at least during childhood [65]. During fasting, GHR are downregulated [66, 67]. Evidence for a circadian effect on the reduction of human GH gene expression has been demonstrated in response to excess caloric intake [68], and obesity has been associated to the suppression of circulating GH [69].

The highest pulse amplitude of GH secretion is observed during the REM phase of the sleep, while sleep deprivation leads to a strong inhibition of nocturnal GH secretion [70, 71].

Several studies have shown that prolonged sleep deprivation, with the subsequent stress, leads to a reduction in body mass, elevated energy metabolism, changes in circulating hormones, and loss of immune system integrity [72]. Stress mediators act on immune cells to modulate the production of key regulatory cytokines [73, 74]. Thus, circadian rhythm disorders affect the levels of IL-1, IL-2, IL-6, TNF α , natural killer cells, adrenocorticotrophic hormone (ACTH), cortisol, GH, and melatonin, all of them playing a key role in wound healing [75–77]. Melatonin has potential effects on the immune system, as inhibition of pineal melatonin synthesis with propranolol or pinealectomy results in immunosuppression and negative effects on wound healing [78]. Yet another study found that melatonin improved wound healing when given at night, coinciding with its normal circadian period of secretion [79].

Notwithstanding all these data, some studies disagree with the concept that sleep exerts a predominant influence on GH release and its effects whatever the conditions be, as it seems to occur compensatory mechanisms promoting GH pulses during wakefulness [80].

Thus, GH influences on wound healing progression. Physiologic circadian rhythm, with higher levels of the hormone during the night, will make a faster healing of wounds during the night, and the alteration of this pattern by different factors might exert a deleterious effect on wound healing via GH and others hormones related to it, although compensatory mechanisms have been described in the long-term.

3. IGF-1 and wound healing

IGF-1 is considered as the main mediator of GH actions, and it has been considered as the “authentic” GH, at least for growing, although GH exerts many actions directly without the participation of IGF-1 [27].

IGF-1 is a polypeptide structural and functionally similar to insulin. It is produced in the liver and practically all extrahepatic tissues, and its production depends not only of GH, but also is strongly influenced by the nutritional status of the organism, at least in the liver. The local production of IGF-1 has been shown to regulate many physiological and pathophysiological states such as fetal development, atherosclerosis, and tissue repair. During tissue repair, IGF-1 is secreted by platelets, macrophages, and fibroblasts of the wound [5].

In wounds, IGF-1 increases protein production and cell proliferation and migration, which are crucial in the healing process [81, 82]. IGF-1 expression is enhanced in subcutaneous [5], and incisional [83] wounds, and in postburn injuries [84]. Some studies have shown that the administration of exogenous IGF-I enhanced protein synthesis in severely burned experimental animals [85].

Moreover, the levels of this growth factor are reduced in the wound environment of diabetic patients. Wound-related parameters as proteins, DNA, hydroxyproline, and macrophages have been shown to be decreased as a consequence of diabetes. After 14 days of treatment with IGF-1 in rats with diabetes produced by streptozotocin, it was observed that the total values of hydroxyproline, DNA, proteins, and macrophages increased by 48, 52, 31, and 40%, respectively [5]. These data support the fact that the suppression of IGF-1 and the macrophage function impairment within the wound environment by the diabetic state are responsible, at least in part, for the delay of wound healing in this disease.

In this context, the relationship between the IGF-1 receptor (IGF-1R) and the estrogen receptor (ER) is of interest. Locally administered IGF-1 promotes wound repair in an estrogen-deprived animal model, the ovariectomized (Ovx) mouse, mainly by dampening the local inflammatory response and promoting re-epithelialization. Using specific IGF-1R and ER antagonists it has been shown how IGF-1-mediated effects on re-epithelialization were directly mediated by IGF-1R [86]. In contrast, the anti-inflammatory effects of IGF-1 were predominantly mediated by ERs, in particular ER α (**Figure 6**). When ER α -null mice were used, IGF-1 could not promote healing and local inflammation increased [86]. These findings illustrate the great complexity of interactions between growth factors at the cutaneous level.

Recent data on the systemic administration of IGF-1 have shown an apparent lack of effect in wound healing. Therefore, perhaps only the IGF-1 produced locally by fibroblasts and macrophages contributes to the regulation of wound healing [46, 47], although it is also possible that the dose used and the type of administration do not have been the most appropriate in this case. If the systemic IGF-1 is ineffective in wound healing, topical administration of IGF-1 could be considered, as other growth factors such as EGF, TGF β , or the own GH. In addition, IGF-1 systemic administration produces mild complications as hypoglycemia and hypotension. These limit its clinical usefulness.

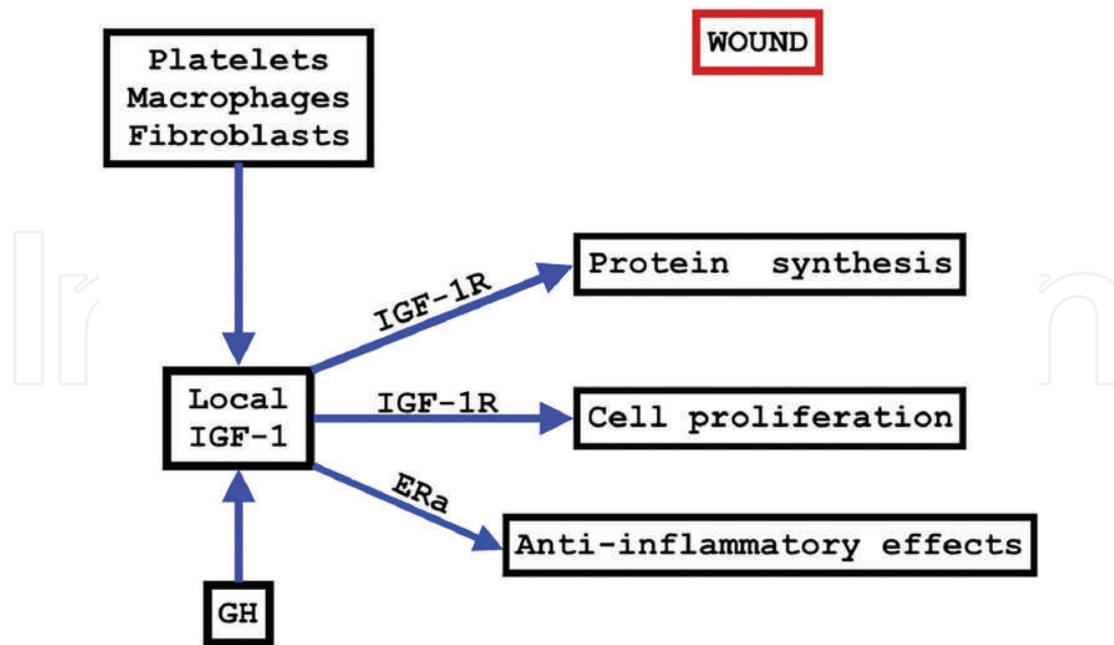


Figure 6. Local expression of IGF-1 in a wound. This expression may be induced by GH, but also IGF-1 may proceed from platelets, macrophages, and fibroblasts. Local IGF-1 induces protein synthesis and cell proliferation by interacting with its receptor IGF-1R, and also has anti-inflammatory effects, although in this case IGF-1 seems to act via the estrogen receptor a (ERa).

4. Analogs of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and wound healing

The complexity of GH regulation seems to be related to the multiple roles that GH plays in the human body, very far than those classically thought [27]. Interestingly, some of these roles are played in conjunction with GH-stimulating factors.

As described, growth hormone-releasing hormone (GHRH) is an important neuroendocrine peptide secreted by the hypothalamus, regulating the synthesis and release of GH [87]. Classically, it was thought that the role of GHRH simply was the regulation of the synthesis and secretion of GH [88, 89]. However, the detection of GHRH and its receptors, as well as the expression of GHRH gene in several extra-hypothalamic tissues, including placenta, ovary, testis, digestive tract, and tumors [90, 91], suggests that GHRH plays a wider role than simply acting on the regulation of pituitary GH secretion; in fact, it seems to be particularly involved in conditions aimed at tissue regeneration and repair. The presence of the peptide in peripheral tissues highlights the possibility that locally produced GHRH might act as an autocrine growth factor playing a role in cell proliferation. In addition to its own actions in various tissues, several GHRH agonists have been developed showing that the effects of this neuropeptide could include direct actions on wound healing. For example, a pioneer work demonstrated that the GHRH agonist JI-38 stimulates the proliferation and migration of mouse embryonic fibroblasts (MEF) [92]. The upregulation of GHRH receptor (GHRH-R) and its splicing variant 1 (SV1) in GHRH-R negative 3T3 fibroblasts has been shown to promote its proliferation when GHRH and its analogs are given [93, 94]. Despite it is logical to think

that fibroblast stimulation by GHRH agonist could be mediated by GH/IGF-1. Some authors have found that using MR-409 and MR-502 GHRH agonists, there was a promotion of wound healing by stimulating the proliferation and survival of dermal fibroblast through phosphorylation of the ERK1/2 and AKT pathways, although neither GH nor IGF-1 was found to be significantly increased in fibroblasts after 4 hours exposure to these agonists. Moreover, none of the agonists showed an effect on the expression levels of either IGF-1 receptor (IGF1-R) or its phosphorylated isoform. Thus, these findings imply direct effects of GHRH and its agonists on extra-pituitary cells and tissues [95].

GHRH affects the proliferation of fibroblasts as well as their migration and the expression of smooth muscle actin α (α -SMA) [92], which is organized into stress fibers and exerts contractile forces on the extracellular matrix [96]. Therefore, it seems that GHRH can regulate, simultaneously, both the kinetic profile and the differentiation of fibroblasts in myofibroblasts (Figure 7).

The suppression of growth of fibroblasts in not healing-wound environment is partially due to the decreased sensitivity of resident cells and rapid degradation of growth factors used in different therapies by proteases released from inflammatory cells and bacteria [97, 98]. Therefore, it would be necessary to have a factor that exerted a strong mitogen action on the fibroblasts, while being resistant to proteolytic degradation. In this sense, unlike the natural GHRH [95], the above mentioned MR agonists seem to have an increased resistance to degradation by proteases, because many of the coded amino acids in the peptide chain have been replaced with synthetic non-natural and/or non-coded amino acids which are much less susceptible to such degradation [99]. Consequently, these analogs have demonstrated a greatly prolonged half-life in vivo, making them promising agents for use in wound healing, where an environment rich in proteases is often found. Even more, it was found that MR class agonists do not stimulate tumor growth or neoplastic transformation [95].

Another factor supporting the use of GHRH agonists has been found in human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC), that seems to express both pituitary GHRH-R and its splicing variant 1 (SV1). HDMEC is responsible for angiogenesis, a critical event for granulation tissue formation [95].

The endogenous GHRH produced by fibroblasts regulates its own activity, and the role that GHRH signaling may play in physiological maintenance of wound healing could improve with some GHRH agonists.

The high concentration of glucose in diabetic patients inhibits the proliferation of fibroblasts and favors resistance to growth factors, decreasing wound healing. Interestingly, MR-409 enhances the survival of transplanted pancreatic islets and helps to lower blood glucose in diabetic SCID mice [100]; therefore, it would be interesting to investigate whether it might benefit diabetic wounds which are hard to cure, partially because of the special adverse bacterial environment. However, some other aspects of diabetic injuries should also be addressed; such is the case of the affectation of the neuropathic response, the true conductor in this process.

Despite these data, the precise physiologic and biochemical mechanism for GHRH accelerating wound healing remains unclear. Besides, the production of GHRH in dermal wounds still seems not to be clear. Moreover, given its short lifetime, it is unlikely that plasma GHRH

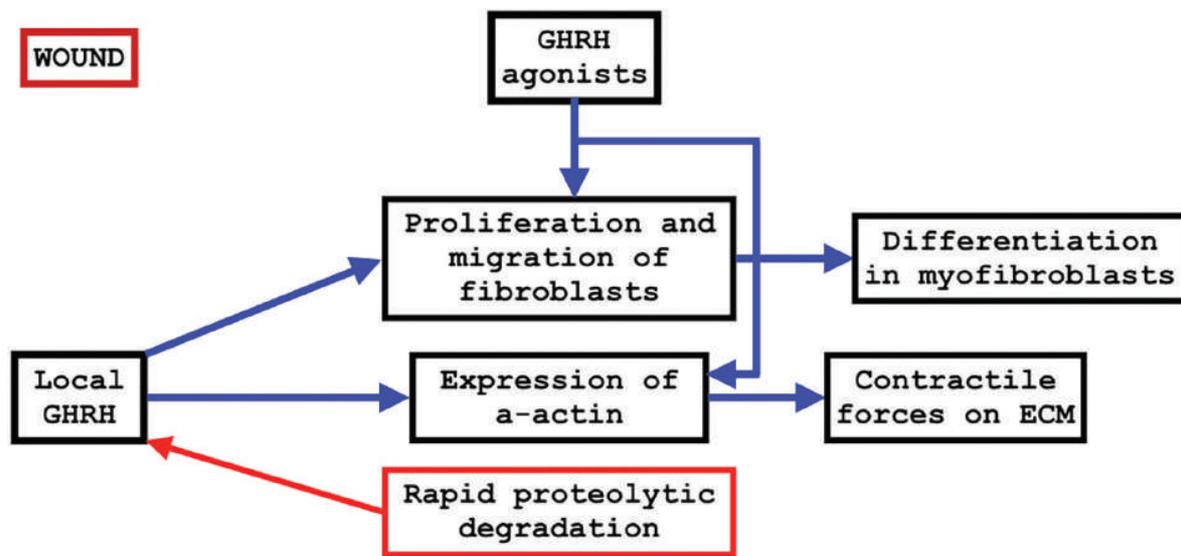


Figure 7. Possible effects of GHRH on wound healing. The possibility exists that GHRH is expressed in cells in a wound, since its short life in plasma does not explain its effects on wound healing. However, GHRH agonists do not suffer proteolytic degradation; therefore, they may mimic the effects of GHRH on the proliferation and migration of fibroblasts and its differentiation in myofibroblasts, as well as inducing the expression of smooth muscle α -actin which favors the appearance of contractile forces on the extracellular matrix (ECM). Blue arrows: induction or activation; red arrow: inhibition.

may reach adequate levels to contribute to wound healing. A possibility, not explored, is that some GHRH agonists produced in dermal wounds during healing might be responsible for the activity of GHRH on wound healing.

Whether this apparently novel function of GHRH is operational in a different kind of healing or it is indicative of the activity of a structurally related peptide(s), should be investigated more extensively to elucidate some of the basic aspects of skin biology and repair, as well as in view of its potential implications in therapeutic wound healing.

5. Wound healing in catabolic states: the role of growth hormone

The balance between anabolic and catabolic states and hormones may affect wound healing, since the overall protein compartment status has a great influence on this process [101]. Protein synthesis restores and maintains lean body mass, composed of muscle, skin, and the immune system, all of them having a role during wound repair. When anabolic activity decreases, as occurs during stress, aging, or chronic disease, there is a derivation of proteins to the energy compartment and, therefore, affects wound healing as a result of protein depletion in the wound to restore lost lean mass. Impaired immunity and healing during catabolic states are directly proportional to the degree of lean mass loss [102, 103]. Protein depletion appears to delay wound healing by prolonging the inflammatory phase (inhibits fibroplasia, synthesis of collagen, and proteoglycans), affects the proliferation phase (neoangiogenesis) and inhibits wound remodeling [104]. It has been shown that protein depletion models produce a decrease

in tensile strength of wounds in animals, and rats fed with a protein-deficient diet showed a decrease in wound integrity and resistance as compared to control animals [105].

Burn injury induces acute and severe inflammation and a hypermetabolic state which are strongly correlated to the size of the burn [106]. The inflammatory process reaches a peak during the first week postburn and persists to a lesser extent throughout convalescence [107]. The hypermetabolic state begins 5 days after the burn, and may last up to 1 year after the injury, with energy requirements that reach 150–200% of the basal metabolic rate [108].

GH is one of the most important anabolic hormones and, like other anabolic hormones, has an anti-cortisol activity, lowering the catabolic response of this steroid, without altering its protective anti-inflammatory activity. Many studies have demonstrated the usefulness of anabolic hormones in existing wounds in catabolic states. However, it remains difficult to determine whether the benefit is due to the increase in the systemic anabolic state or to a direct effect on the anabolic state of the wound [109].

Starvation and intense exercise, both being catabolic states, are potent stimuli of GH, while acute or chronic injury or illness inhibits GH release, especially in the elderly [109]. GH leads to an increased influx of amino acids into the cell, decreasing the flow of these from the same. The increase in fatty metabolism that GH produces is also beneficial, since it preserves the amino acids for the synthesis of proteins, instead of being used as an energy resource.

Severe burns and injuries, people with HIV infection with wasting and elderly people, all of them catabolic states, are populations that could benefit from GH therapy. GH increases lean mass, muscle strength, and immune function in these states, but requires an intake of a high-protein, high-energy diet [109].

The skin is a target tissue for GH, and GHRs have been found on the surface of epidermal cells. Recent data indicate that IGF-1 and insulin also provide some of the anabolic effects of GH therapy in wounds [110, 111]. GH administered exogenously increases the thickness of the skin even in normal people [112]. It has been shown that GH can improve the re-epithelialization rate of sites where a skin graft has taken place in adults and children with severe burns or trauma [7, 10]. In addition, it has been seen, in experimental models, that GH also accelerates the healing by increasing wound collagen content, granulation tissue, and wound tensile strength, as well as the local production of IGF-1 by fibroblasts [109, 113].

A study conducted on burned children also supports the role of GH in catabolic states, since no differences were found in mortality, organ failure, or clinically significant morbidity between the groups, and the requirements for albumin supplementation were reduced by 65%, as well as episodes of hypocalcemia, an unexpected benefit of the hormone [114]. As it will be discussed at the end of the chapter, unlike it happens in children, it has been reported an increase of mortality in adult with burns when GH was used [115]. However, the authors of the study in pediatric population have been treating severely burned children with rhGH for more than 10 years, and they have reported that 0.2 mg/kg/day of rhGH in this catabolic state has some benefits, accelerating donor site wound healing by up to 30% and reducing a 25% the hospital stay and costs. They have also shown that GH increased protein synthesis by more than 25%. Another study has also found that GH causes significant serum elevations in

other different parameters as total catecholamines, insulin, glucagon, or free fatty acids. GH therapy even showed a rise in blood flow of the leg [114].

In summary, the use of GH together with adequate nutrition and protein intake, at the appropriate doses, clearly improves anabolic activity and, as a consequence, positively impacts wound healing, even in patients with spinal cord injuries, as **Figure 8** shows. Although many data suggest that the effect of GH on wound healing can be direct, it is still unknown whether some other hormones could contribute to this positive effect.

5.1. Ghrelin, GH, and wound healing

Ghrelin (GH-releasing peptide or GHRP) is a small peptide found in the gastrointestinal tract in 1999 [116]. Although it is mainly secreted by the stomach, it is known that Ghrelin is also produced in other territories, such as the intestine or placenta, for example.

In addition to its known actions on the regulation of appetite and energy expenditure, it has also been discovered that this hormone plays a role in the control of inflammation and metabolism, as do leptin and adiponectin. In fact, all three hormones are interrelated in chronic disease states [117–119]. Interestingly, in a study that addressed the relationship between these hormones in burns, the authors came to the surprising conclusion that they acted in two different ways: one in normal physiological conditions or chronic disease states, and another after severe acute stresses such as burn injury [120]. This can be an adaptive mechanism that depends on the physiological situation or the type of the pathological condition.

Recently, it was demonstrated that Ghrelin improves hemodynamic and metabolic alterations and attenuates cancer, heart affectations, and cachexia induced by burns, and also again protects the damage induced by burns and facilitates the healing of wounds [121].

In relation to the hemodynamic role of this hormone, receptors for Ghrelin have been found in the aorta, the left cardiac ventricle, and the left cardiac atrium in rats. In healthy humans, the intravenous infusion of Ghrelin decreases blood pressure, increases the cardiac index, and produces a greater volume of the pulse [122].

Ghrelin also has an anti-inflammatory effect, by inhibiting the secretion of IL-6 and TNF α from monocytes and T5 cells [119, 123]. The protective role of Ghrelin appears to depend on the integrity of GH/IGF-1 axis, since in studies of inflammation with pancreatitis, protection against inflammation did not occur in hypophysectomized rats unless they received IGF-1 in parallel with Ghrelin. In these studies, when normal GH secretion was reached, the



Figure 8. Evolution of a pressure ulcer in the foot of a quadriplegic patient (complete spinal cord injury, C5-C6) treated with GH applied topically (0.4 mg/day, 5 days/week), before the treatment (10/10/2012) and throughout it until the healing of the wound (02/27/2013).

inflammation was reduced in severity, with a more rapid regeneration of the pancreas, resulting in a reduction in the serum concentrations of interleukin 1- β pro-inflammatory (IL-1 β) as well as the amylase and lipase activities. In addition, there was an increase in pancreatic blood flow, and DNA synthesis increased in this organ. This demonstrates that the possible role of Ghrelin during catabolic states needs an adequate functioning of the GH/IGF-1 axis [124]. This last statement has also been supported by models of colitis in which treatment with Ghrelin clearly improved the area of damage in the colonic mucosa in intact pituitary rats, but increased it in hypophysectomized animals. In addition, it was shown that rats with a normal production of GH-IGF-1 had improved blood flow in the colonic mucosa and increased mucosal cell proliferation while treated with Ghrelin, as well as reduced levels of IL1-1 β and myeloperoxidase; just the opposite of what was found in hypophysectomized rats [125].

The therapeutic effect of Ghrelin on wound healing has also been evaluated using a rat model in which the administration of radiation was combined with the induction of a wound. The altered healing of a wound caused by radiation often occurs in clinical practice and the exact mechanisms by which this occurs are not yet clear. In this wound model, the administration of Ghrelin promoted the healing of skin wounds, and also reduced the average time of wound closure [126]. Ghrelin inhibited the induction of serum pro-inflammatory mediators, especially TNF α , and promoted wound healing in a dose-dependent manner [127]. After the isolation and analysis of the granulation tissues, a greater synthesis of DNA, hexosamine, nitrate, and nitrite, a high content of collagen and an enhanced neovascularization was observed after treatment with Ghrelin. The hormone also increased the expression of VEGF and TGF β , responsible for wound healing as described. Again, when a GH 1a secretagogue receptor blocker (GHS-R1a) was administered, all of these therapeutic effects of Ghrelin were affected [126]. These results identify Ghrelin as a peptide that could be used for the affected wound healing induced by radiation, although it is necessary that there is a normal secretion of GH so that its effects occur. These effects of Ghrelin are shown in **Figure 9**.

5.2. Cellular senescence and wound healing: benefit of GH therapy

Cellular senescence is the consequence of DNA damage secondary to oxidative stress associated with aging or chronic morbid conditions such as diabetes. This seems to be an antitumor mechanism [128]. The number of senescent cells is low in young individuals, while it increases with age in all tissues, including the skin [129, 130].

At skin level, senescence has been reported in keratinocytes, melanocytes, endothelial cells, epithelial cells, T-lymphocytes, and even in stem cells [131–133].

This concept has emerged as a possible cause of general tissue dysfunction [134, 135], since, although senescent cells are unable to divide, they remain metabolically active. This high metabolic activity is associated with the release of a multitude of cytokines, chemokines, and pro-inflammatory growth factors, which leads to its denomination as the secretion phenotype associated with senescence (SASP) [136]. These factors would include interleukin (IL) 6 and IL-8, chemokines such as monocyte chemoattractant protein (MCPs), macrophage inflammatory proteins, and growth factors as VEGF, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), TGF β , and proteinases such as matrix metalloproteinases [128, 137]. All these

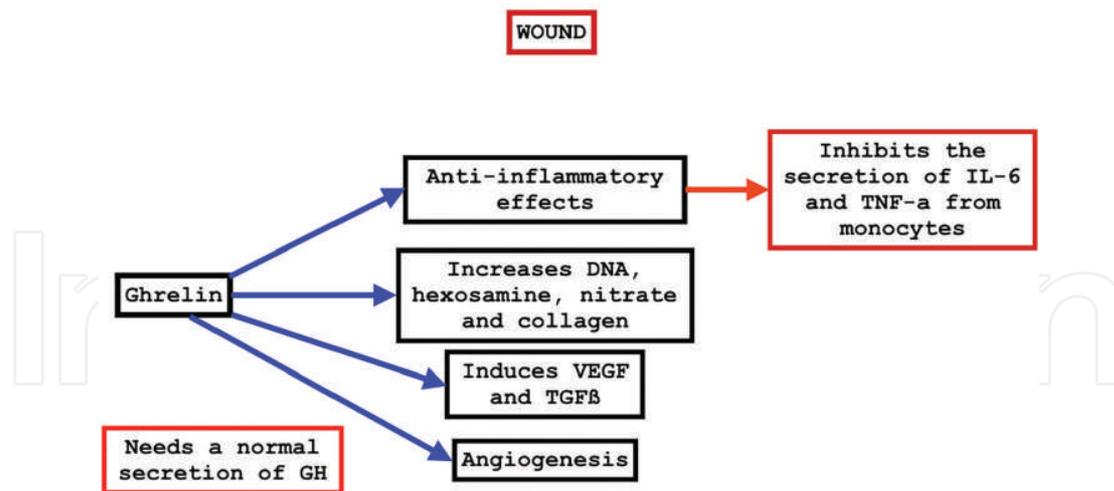


Figure 9. Ghrelin effects on a wound. While many positive effects appear at very different levels during wound healing, there is a need for a normal pituitary secretion of GH, so that these Ghrelin effects can occur. Therefore, it is not clear whether these effects depend on Ghrelin or on GH, although the possibility exists that GH could induce Ghrelin expression in the wound.

factors can act in an autocrine and paracrine way, also having effects on the surrounding cells and their environment. Therefore, the senescent cell itself could initiate a feedback mechanism by spreading this phenomenon to nearby cells [138].

Characteristically, the inflammation resulting from cellular senescence is sterile or is not associated with pathogens [137]. It has been suggested that chronic low-level inflammation that is often observed during aging in tissues without obvious infection is due to senescent cells and SASP [139]. In addition, a low number of senescent cells can have systemic effects, and it is already evident that the senescence process can be transmitted to normal cells by SASP in a paracrine or autocrine manner [128].

The basis of this senescence is mitochondrial dysfunction, which in turn causes oxidative stress, which has been implicated as a cause of aging [140].

Understanding this process would help develop different strategies that could mitigate chronic inflammation and, therefore, cellular senescence. These dysfunctional and destructive signs are also found in the wounds of diabetic or elderly patients, altering the normal healing process.

At this point, it is important to note that GH is a mitochondrial protector [141–143], therefore, playing a positive role in this process. GH restores the redox imbalance, improving the mitochondrial respiratory chain and the production of energy.

In situations of GH deficiency (GHD) there is an accelerated aging process. In mice with GHD, GH replacement therapy increases stress resistance by altering the functional capacity of the glutathione S-transferase system (GST) through the regulation of specific members of the GST family [144]. The hormone also affects the regulation of thioredoxins (TRX) and glutaredoxins (GRX), which are factors that regulate the post-translational modification of proteins and the redox balance, also influencing resistance to stress [144]. Patients with GHD show a decrease in their life expectancy with a twice higher risk of death from cardiovascular disease. In this regard, after 24 weeks of GH replacement therapy in the GREAT

study, the hormone significantly lowered plasma diacron-reactive oxygen metabolites and improved endothelial function, as measured by reactive hyperemia index [145]. This indicates that GH can exert a protective role in redox balance in GHD, in which predominates a pro-oxidant environment, corrected by short-term GH administration [146]. Klotho, a GH-releasing factor that currently is gaining in interest, also lowers the oxidative stress, decreasing apoptosis and senescence of the vascular system in an atherogenic risk rat model [147]. The hormone also affects the regulation of TRX and GRX, which are factors that regulate the post-translational modification of proteins and the redox balance, also influencing resistance to stress [41]. As a consequence of the antioxidant action of GH, the hormone produces a benefit in the inflammatory state associated with senescence [22]. It has been reported that this protection against oxidative stress is mediated by GH induction of the RAS/ERK pathways [148].

However, the exact role of GH in the redox equilibrium has not been fully understood, since in some cases of oxidative stress, overproduction, or administration of GH in excess may enhance oxidation [149]. Thus, both the overproduction of GH and its deficiency are closely related to increased oxidative stress.

5.3. Contrary studies not supporting a GH role in wound healing

As described in the introduction, GH needs specific stimuli to exert its effects. In fact, there is a study carried out to determine the effect of rhGH on the rate of wound healing in normal individuals. In each subject was performed a split-thickness wound in one buttock and a full-thickness wound in the other. The full-thickness wound healed significantly more slowly in the group treated with rhGH compared to the control group treated with placebo, while no statistically significant difference was observed in the healing of the split-thickness wounds. This study concluded that rhGH may delay healing in normal patients with full-thickness wounds, although it could not be ruled out if the healing delay associated to rhGH group was due to the quality of the scab, thereby, appearing only as an alteration of the wound healing process [18].

In another trial, the serum levels of some hormones, GH, insulin, and cortisol were analyzed in normal and diabetic rats during wound healing. It was shown that the rate of wound healing in normal rats is faster than that of diabetics. The serum insulin concentrations were lower in the diabetic rats compared to the normal and control groups and showed a correlation with the wound healing process in diabetic rats. Serum cortisol concentrations decreased in the normal and diabetic groups during wound healing, but did not show a significant correlation with this process. Serum GH levels did not change significantly in any of the groups, nor did they show a significant correlation with the wound healing process [150]. As described above, a possible explanation for these findings is that the main effect of GH in this case could occur as a consequence of the local production of the hormone, something that was overlooked because it was not measured. A small wound on the back of the animal is not a stimulus strong enough to increase systemic GH, which seems to be related, as demonstrated, to more intense catabolic states.

A recent report from two prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled Phase III trials conducted in Europe, which studied the effects of rhGH in critically ill burned adult patients, in

an intensive care unit, revealed a significant increase in mortality among catabolic patients treated with rhGH (42 vs. 18%) [115]. GH, in fact, can increase cell adhesion molecules (CAM), since the serum of healthy patients treated with GH significantly increased the expression of VCAM-1 in cultured umbilical vein endothelial cells [151], and this could be the mechanism involved, but it must be taken into account that in these studies high doses of GH were used (10–20 times greater than the usual treatment dose), which would facilitate the appearance of side effects produced by the hormone. In contrast to these data, when the same study was carried out in burned children, no differences were found in mortality, but other beneficial effects were found.

6. Conclusion

Despite all data here presented, it is necessary to remember that the patient with a problem in the wound healing needs to be addressed in a holistic way. That is, “we do not treat a hole in the patient, but the whole patient”. Normal wounds in healthy people are not a problem. However, a delaying wound always appears in a patient with a morbid condition, normally in an elderly patient or that with a catabolic state or a chronic disease as diabetes mellitus. Therefore, using only a topical wound treatment seems to be an unrealistic approach to healing. However, a total approach will be more beneficial to not only accelerate the healing process but also decrease the possibility of a new wound.

The knowledge of the molecular aspects related to wound repair and tissue regeneration, as well as the whole circumstances affecting also the patients is crucial to success dealing with this topic.

We cannot overlook the high amount of data regarding the role of GH and its secretagogues, not only in the healing process, but also improving the pro-oxidant state of the patients. GH therapy is a cheap and well known drug, and may increase many growth factors when is locally used in wounds. Maybe the combination of appropriate doses of systemic GH and topical application in the wound would be a good option. The combination of GH or its secretagogues and IGF-1 in a topical way, could be also a beneficial approach for wounds repair.

Acknowledgements

This chapter has been funded by the Carlos III Health Institute and the European Regional Development Fund (ISCIII-FEDER), Madrid, Spain, (grant number PI 13-00790). We thank the Foltra Medical Center for the transfer of some images for this chapter.

Diego Caicedo and Jesús Devesa participated in a similar way in the realization of this work.

Conflict of interest

The authors declare that no conflict of interest exists.

Author details

Diego Caicedo^{1*} and Jesús Devesa²

*Address all correspondence to: diego.caicedo.valdes@sergas.es

1 Service of Vascular Surgery, University Hospital of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

2 Scientific Direction, Medical Center Foltra, Teo, Spain

References

- [1] Eming SA, Krieg T, Davidson JM, Hall RP. Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2007;**127**:514-525. DOI: 10.1038/sj.jid.5700701
- [2] Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;**453**:314-321. DOI: 10.1038/nature07039
- [3] Barrientos S, Brem H, Stojadinovic O, Tomic-Canic M. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2014;**22**:569-578. DOI: 10.1111/wrr.12205
- [4] Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*. 2014;**6**:265sr6. DOI: 10.1126/scitranslmed.3009337
- [5] Bitar MS. Insulin-like growth factor-1 reverses diabetes-induced wound healing impairment in rats. *Hormone and Metabolic Research*. 1997;**29**:383-386. DOI: 10.1055/s-2007-979060
- [6] Lee SW, Kim SH, Kim JY, Lee Y. The effect of growth hormone on fibroblast proliferation and keratinocyte migration. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*. 2010;**63**:e364-e369. DOI: 10.1016/j.bjps.2009.10.027
- [7] Ghofrani A, Höller D, Schuhmann K, Saldern S, Messmer BJ. The influence of systemic growth hormone administration on the healing time of skin graft donor sites in a pig model. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1999;**104**:470-475
- [8] Weiming Z, Ning L, Jieshou L. Effect of recombinant human growth hormone and enteral nutrition on short bowel syndrome. *JPEN Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2004;**28**:377-381. DOI: 10.1177/0148607104028006377
- [9] Vara-Thorbeck R, Guerrero JA, Rosell J, Ruiz-Requena E, Capitán JM. Exogenous growth hormone: Effects on the catabolic response to surgically produced acute stress and on postoperative immune function. *World Journal of Surgery*. 1993;**17**:530-537; discussion 537-538

- [10] Lal SO, Wolf SE, Herndon DN. Growth hormone, burns and tissue healing. *Growth Hormone and IGF Research*. 2000;**10**:539-543. DOI: 10.1016/S1096-6374(00)80008-8
- [11] Herndon DN, Hawkins HK, Nguyen TT, Pierre E, Cox R, Barrow RE. Characterization of growth hormone enhanced donor site healing in patients with large cutaneous burns. *Annals of Surgery*. 1995;**221**:649-656; discussion 656-659
- [12] Losada F, García-Luna PP, Gómez-Cía T, Garrido M, Pereira JL, Marín F, et al. Effects of human recombinant growth hormone on donor-site healing in burned adults. *World Journal of Surgery*. 2002;**26**:2-8. DOI: 10.1007/s00268-001-0170-9
- [13] Rasmussen LH, Karlsmark T, Avnstorp C, Peters K, Jørgensen M, Jensen LT. Topical human growth hormone treatment of chronic leg ulcers. *Phlebology*. 1991;**6**:23-30. DOI: 10.1177/026835559100600105
- [14] Rasmussen LH, Garbarsch C, Schuppan D, Moe D, Hørslev-Pedersen K, Gottrup F, et al. Influence of human growth hormone on granulation tissue formation, collagen deposition, and the aminoterminal propeptide of collagen type III in wound chambers in rats. *Wound Repair and Regeneration*. 1994;**2**:31-36. DOI: 10.1046/j.1524-475X.1994.20106.x
- [15] Jørgensen PH, Oxlund H. Growth hormone increases the biomechanical strength and collagen deposition rate during the early phase of skin wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 1996;**4**:40-47. DOI: 10.1046/j.1524-475X.1996.40108.x
- [16] Zaizen Y, Ford EG, Shimada H, Kosi M, Costin G, Atkinson JB. Growth hormone effects on wound healing in malnourished animals: A histological study. *European Journal of Pediatric Surgery*. 1995;**5**:226-230. DOI: 10.1055/s-2008-1066211
- [17] Vakili H, Jin Y, Nagy JI, Cattini PA. Transgenic mice expressing the human growth hormone gene provide a model system to study human growth hormone synthesis and secretion in non-tumor-derived pituitary cells: Differential effects of dexamethasone and thyroid hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2011;**345**:48-57. DOI: 10.1016/j.mce.2011.07.010
- [18] Welsh KM, Lamit M, Morhenn VB. The effect of recombinant human growth hormone on wound healing in normal individuals. *The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology*. 1991;**17**:942-945
- [19] Thorey IS, Hinz B, Hoeflich A, Kaesler S, Bugnon P, Elmlinger M, et al. Transgenic mice reveal novel activities of growth hormone in wound repair, angiogenesis, and myofibroblast differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;**279**:26674-26684. DOI: 10.1074/jbc.M311467200
- [20] Borrione P, Grasso L, Pautasso M, Parisi A, Quaranta F, Ciminelli E, et al. Impact of different concentrations of human recombinant growth hormone on T lymphocytes. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2012;**25**:87-97. DOI: 10.1177/039463201202500111
- [21] Caicedo D, Devesa P, Arce VM, Requena J, Devesa J. Chronic limb-threatening ischemia could benefit from growth hormone therapy for wound healing and limb salvage. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*. 2017;**12**:53-72. DOI: 10.1177/1753944717745494

- [22] Caicedo D, Díaz O, Devesa P, Devesa J. Growth hormone (GH) and cardiovascular system. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;**19**:290. DOI: 10.3390/ijms19010290
- [23] Luque RM, Gahete MD, Valentine RJ, Kineman RD. Examination of the direct effects of metabolic factors on somatotrope function in a non-human primate model, *Papio anubis*. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2006;**37**:25-38. DOI: 10.1677/jme.1.02042
- [24] Root AW, Root MJ. Clinical pharmacology of human growth hormone and its secretagogues. *Current Drug Targets—Immune, Endocrine and Metabolic Disorders*. 2002;**2**:27-52
- [25] Jørgensen PH, Andreassen TT. A dose-response study of the effects of biosynthetic human growth hormone on formation and strength of granulation tissue. *Endocrinology*. 1987;**121**:1637-1641. DOI: 10.1210/endo-121-5-1637
- [26] Messias de Lima CF, de Araújo Vieira LF, de Carvalho Wanderley LA, de Souza Ferro JN, Smaniotto S. Topical growth hormone accelerates wound healing in mice. *Wounds: A Compendium of Clinical Research and Practice*. 2017;**29**:387-392
- [27] Devesa J, Almengló C, Devesa P. Multiple effects of growth hormone in the body: Is it really the hormone for growth? *Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes*. 2016;**9**:47-71. DOI: 10.4137/CMED.S38201
- [28] Fasshauer M, Klein J, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 expression is stimulated by growth hormone and interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;**317**:598-604. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.03.090
- [29] Meazza C, Pagani S, Travaglini P, Bozzola M. Effect of growth hormone (GH) on the immune system. *Pediatric Endocrinology Reviews*. 2004;**1**(Suppl 3):490-495
- [30] Inoue T, Saito H, Tsuno N, Fukatsu K, Lin MT, Inaba T, et al. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on opsonin receptor expression on local and systemic phagocytes in a lethal peritonitis model. *Critical Care Medicine*. 1998;**26**:338-343
- [31] Napolitano LA, Schmidt D, Gotway MB, Ameli N, Filbert EL, Ng MM, et al. Growth hormone enhances thymic function in HIV-1-infected adults. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008;**118**:1085-1098. DOI: 10.1172/JCI32830
- [32] Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine*. 1999;**341**:738-746. DOI: 10.1056/NEJM199909023411006
- [33] Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Molecular Biology of the Cell*. 1993;**4**:637-645
- [34] Marchese C, Felici A, Visco V, Lucania G, Igarashi M, Picardo M, et al. Fibroblast growth factor 10 induces proliferation and differentiation of human primary cultured keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2001;**116**:623-628. DOI: 10.1046/j.0022-202x.2001.01280.x

- [35] Werner S, Smola H. Paracrine regulation of keratinocyte proliferation and differentiation. *Trends in Cell Biology*. 2001;**11**:143-146
- [36] Trompezinski S, Berthier-Vergnes O, Denis A, Schmitt D, Viac J. Comparative expression of vascular endothelial growth factor family members, VEGF-B, -C and -D, by normal human keratinocytes and fibroblasts. *Experimental Dermatology*. 2004;**13**:98-105. DOI: 10.1111/j.0906-6705.2004.00137.x
- [37] Rasmussen LH, Garbarsch C, Schuppan D, Moe D, Hørslev-Pedersen K, Gottrup F, et al. Dose response profiles of human growth hormone in subcutaneous wound chambers in rats. *The European Journal of Surgery*. 1995;**161**:157-162
- [38] Messias de Lima CF, dos Santos Reis MD, da Silva Ramos FW, Ayres-Martins S, Smaniotta S. Growth hormone modulates in vitro endothelial cell migration and formation of capillary-like structures. *Cell Biology International*. 2017;**41**:577-584. DOI: 10.1002/cbin.10747
- [39] Li J, Liu X, Tang H, Zhou X, Huang Y. Influence of some topical antibiotics and FGF2, EGF and rhGH on the biological characteristics of fibroblasts in vitro. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2006;**22**:33-37
- [40] Suk HK, Eun JH, Sang WL. The effect of topically applied recombinant human growth hormone on wound healing in pigs. *Wounds*. 2009;**21**:150-152
- [41] Thum T, Hoerber S, Froese S, Klink I, Stichtenoth DO, Galuppo P, et al. Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth hormone mediated increase of insulin-like growth factor-1. *Circulation Research*. 2007;**100**:434-443. DOI: 10.1161/01.RES.0000257912.78915.af
- [42] Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martínez De La Escalera G. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiological Reviews*. 2009;**89**:1177-1215. DOI: 10.1152/physrev.00024.2009
- [43] Zheng H, Fu G, Dai T, Huang H. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1 α /CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2007;**50**:274-280. DOI: 10.1097/FJC.0b013e318093ec8f
- [44] Scott CD, Martin JL, Baxter RC. Production of insulin-like growth factor I and its binding protein by adult rat hepatocytes in primary culture. *Endocrinology*. 1985;**116**:1094-1101. DOI: 10.1210/endo-116-3-1094
- [45] Pell JM, Bates PC. Differential actions of growth hormone and insulin-like growth factor-I on tissue protein metabolism in dwarf mice. *Endocrinology*. 1992;**130**:1942-1950. DOI: 10.1210/endo.130.4.1547721
- [46] Robertson JG, Walton PE, Dunshea F, Dunaiski V, Ballard FJ, Belford DA. Growth hormone but not insulin-like growth factor-I improves wound strength in pigs. *Wound Repair and Regeneration*. 1997;**5**:168-174. DOI: 10.1046/j.1524-475X.1997.50209.x

- [47] Dunaiski V, Belford DA. Contribution of circulating IGF-I to wound repair in GH-treated rats. *Growth Hormone and IGF Research*. 2002;**12**:381-387
- [48] Steenfos HH, Jansson JO. Growth hormone stimulates granulation tissue formation and insulin-like growth factor-I gene expression in wound chambers in the rat. *The Journal of Endocrinology*. 1992;**132**:293-298
- [49] Harrison DA. The Jak/STAT pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012;**4**:pii, a011205. DOI: 10.1101/cshperspect.a011205
- [50] Abroun S, Saki N, Ahmadvand M, Asghari F, Salari F, Rahim F. STATs: An old story, yet mesmerizing. *Cell Journal*. 2015;**17**:395-411
- [51] Soldevila G, García-Zepeda EA. The role of the Jak-Stat pathway in chemokine-mediated signaling in T lymphocytes. *Signal Transduction*. 2007;**7**:427-438. DOI: 10.1002/sita.200700144
- [52] Hunckler J, de Mel A. A current affair: Electrotherapy in wound healing. *Journal of Multidisciplinary Healthcare*. 2017;**10**:179-194. DOI: 10.2147/JMDH.S127207
- [53] Jere SW, Abrahamse H, Houreld NN. The JAK/STAT signaling pathway and photobiomodulation in chronic wound healing. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2017;**38**: 73-79. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2017.10.001
- [54] Pilecka I, Whatmore A, Hooft van Huijsduijnen R, Destenaves B, Clayton P. Growth hormone signalling: Sprouting links between pathways, human genetics and therapeutic options. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2007;**18**:12-18. DOI: 10.1016/j.tem.2006.11.004
- [55] Rowland JE, Lichanska AM, Kerr LM, White M, D'Aniello EM, Maher SL, et al. In vivo analysis of growth hormone receptor signaling domains and their associated transcripts. *Molecular and Cellular Biology*. 2005;**25**:66-77. DOI: 10.1128/MCB.25.1.66-77.2005
- [56] Belacortu Y, Paricio N. *Drosophila* as a model of wound healing and tissue regeneration in vertebrates. *Developmental Dynamics*. 2011;**240**:2379-2404. DOI: 10.1002/dvdy.22753
- [57] Feng Y, Sanders AJ, Morgan LD, Harding KG, Jiang WG. Potential roles of suppressor of cytokine signaling in wound healing. *Regenerative Medicine*. 2016;**11**:193-209. DOI: 10.2217/rme.16.4
- [58] Croker BA, Kiu H, Nicholson SE. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2008;**19**:414-422
- [59] McFarland-Mancini MM, Funk HM, Paluch AM, Zhou M, Giridhar PV, Mercer CA, et al. Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor. *Journal of Immunology*. 2010;**184**:7219-7228. DOI: 10.4049/jimmunol.0901929
- [60] Wang T, Yuan W, Liu Y, Zhang Y, Wang Z, Zhou X, et al. The role of the JAK-STAT pathway in neural stem cells, neural progenitor cells and reactive astrocytes after spinal cord injury. *Biomedical Reports*. 2015;**3**:141-146. DOI: 10.3892/br.2014.401

- [61] Beigel F, Friedrich M, Probst C, Sotlar K, Göke B, Diegelmann J, et al. Oncostatin M mediates STAT3-dependent intestinal epithelial restitution via increased cell proliferation, decreased apoptosis and upregulation of SERPIN family members. *PLoS One*. 2014;**9**:e93498. DOI: 10.1371/journal.pone.0093498
- [62] Giustina A, Veldhuis JD. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocrine Reviews*. 1998;**19**:717-797. DOI: 10.1210/edrv.19.6.0353
- [63] Harvey S. Extrapituitary growth hormone. *Endocrine*. 2010;**38**:335-359. DOI: 10.1007/s12020-010-9403-8
- [64] Goldenberg N, Barkan A. Factors regulating growth hormone secretion in humans. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2007;**36**:37-55. DOI: 10.1016/j.ecl.2006.11.003
- [65] Ho KY, Veldhuis JD, Johnson ML, Furlanetto R, Evans WS, Alberti KG, et al. Fasting enhances growth hormone secretion and amplifies the complex rhythms of growth hormone secretion in man. *The Journal of Clinical Investigation*. 1988;**81**:968-975. DOI: 10.1172/JCI113450
- [66] Harvey S, Scanes C, Daughaday WH. Growth hormone release: Integrative hypothalamic control. In: *Growth Hormone*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1995. pp. 131-162. ISBN 0-8493-8697-7
- [67] Clemmons DR, Underwood LE. Nutritional regulation of IGF-I and IGF binding proteins. *Annual Review of Nutrition*. 1991;**11**:393-412. DOI: 10.1146/annurev.nu.11.070191.002141
- [68] Vakili H, Jin Y, Cattini PA. Evidence for a circadian effect on the reduction of human growth hormone gene expression in response to excess caloric intake. *The Journal of Biological Chemistry*. 2016;**291**:13823-13833. DOI: 10.1074/jbc.M116.722744
- [69] Møller N, Jørgensen JOL. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. *Endocrine Reviews*. 2009;**30**:152-177. DOI: 10.1210/er.2008-0027
- [70] Van Cauter E, Plat L, Copinschi G. Interrelations between sleep and the somatotrophic axis. *Sleep*. 1998;**21**:553-566
- [71] Van Cauter E, Kerkhofs M, Caufriez A, Van Onderbergen A, Thorner MO, Copinschi G. A quantitative estimation of growth hormone secretion in normal man: Reproducibility and relation to sleep and time of day. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1992;**74**:1441-1450. DOI: 10.1210/jcem.74.6.1592892
- [72] Everson CA, Bergmann BM, Rechtschaffen A. Sleep deprivation in the rat: III. Total sleep deprivation. *Sleep*. 1989;**12**:13-21
- [73] Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002; **966**:290-303

- [74] Lorton D, Lubahn CL, Estus C, Millar BA, Carter JL, Wood CA, et al. Bidirectional communication between the brain and the immune system: Implications for physiological sleep and disorders with disrupted sleep. *Neuroimmunomodulation*. 2006;**13**:357-374. DOI: 10.1159/000104864
- [75] Bjorvatn B, Pallesen S. A practical approach to circadian rhythm sleep disorders. *Sleep Medicine Reviews*. 2009;**13**:47-60. DOI: 10.1016/j.smrv.2008.04.009
- [76] Dickstein JB, Moldofsky H. Sleep, cytokines and immune function. *Sleep Medicine Reviews*. 1999;**3**:219-228
- [77] Moldofsky H, Lue FA, Davidson JR, Gorczynski R. Effects of sleep deprivation on human immune functions. *The FASEB Journal*. 1989;**3**:1972-1977
- [78] Drobnik J, Dabrowski R. Melatonin suppresses the pinealectomy-induced elevation of collagen content in a wound. *Cytobios*. 1996;**85**:51-58
- [79] Pugazhenthik K, Kapoor M, Clarkson AN, Hall I, Appleton I. Melatonin accelerates the process of wound repair in full-thickness incisional wounds. *Journal of Pineal Research*. 2008;**44**:387-396. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2007.00541.x
- [80] Brandenberger G, Weibel L. The 24-h growth hormone rhythm in men: Sleep and circadian influences questioned. *Journal of Sleep Research*. 2004;**13**:251-255. DOI: 10.1111/j.1365-2869.2004.00415.x
- [81] Ando Y, Jensen PJ. Epidermal growth factor and insulin-like growth factor I enhance keratinocyte migration. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1993;**100**:633-639
- [82] Lee YR, Oshita Y, Tsuboi R, Ogawa H. Combination of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-1 promotes fibroblast-embedded collagen gel contraction. *Endocrinology*. 1996;**137**:5278-5283. DOI: 10.1210/endo.137.12.8940346
- [83] Gartner MH, Benson JD, Caldwell MD. Insulin-like growth factors I and II expression in the healing wound. *The Journal of Surgical Research*. 1992;**52**:389-394
- [84] Ghahary A, Shen YJ, Wang R, Scott PG, Tredget EE. Expression and localization of insulin-like growth factor-1 in normal and post-burn hypertrophic scar tissue in human. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1998;**183**:1-9
- [85] Strock LL, Singh H, Abdullah A, Miller JA, Herndon DN. The effect of insulin-like growth factor I on postburn hypermetabolism. *Surgery*. 1990;**108**:161-164
- [86] Emmerson E, Campbell L, Davies FCJ, Ross NL, Ashcroft GS, Krust A, et al. Insulin-like growth factor-1 promotes wound healing in estrogen-deprived mice: New insights into cutaneous IGF-1R/ER α cross talk. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2012;**132**:2838-2848. DOI: 10.1038/jid.2012.228
- [87] Kovács M, Schally AV, Varga JL, Zarándi M. Endocrine and antineoplastic actions of growth hormone-releasing hormone antagonists. *Current Medicinal Chemistry*. 2008;**15**:314-321

- [88] Toogood AA, Shalet SM. Growth hormone replacement therapy in the elderly with hypothalamic-pituitary disease: A dose-finding study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1999;**84**:131-136. DOI: 10.1210/jcem.84.1.5408
- [89] Melmed S. In: Melmed S, editor. *The Pituitary*. 4th ed. Academic Press; 2017. ISBN 978-0-12-804169-7
- [90] Meigan G, Sasaki A, Yoshinaga K. Immunoreactive growth hormone-releasing hormone in rat placenta. *Endocrinology*. 1988;**123**:1098-1102. DOI: 10.1210/endo-123-2-1098
- [91] Bagnato A, Moretti C, Ohnishi J, Frajese G, Catt KJ. Expression of the growth hormone-releasing hormone gene and its peptide product in the rat ovary. *Endocrinology*. 1992;**130**:1097-1102. DOI: 10.1210/endo.130.3.1537276
- [92] Dioufa N, Schally AV, Chatzistamou I, Moustou E, Block NL, Owens GK, et al. Acceleration of wound healing by growth hormone-releasing hormone and its agonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; **107**:18611-18615. DOI: 10.1073/pnas.1013942107
- [93] Kiaris H, Schally AV, Busto R, Halmos G, Artavanis-Tsakonas S, Varga JL. Expression of a splice variant of the receptor for GHRH in 3T3 fibroblasts activates cell proliferation responses to GHRH analogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;**99**:196-200. DOI: 10.1073/pnas.012590999
- [94] Barabutis N, Siejka A, Schally AV, Block NL, Cai R, Varga JL. Activation of mitogen-activated protein kinases by a splice variant of GHRH receptor. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2010;**44**:127-134. DOI: 10.1677/JME-09-0121
- [95] Cui T, Jimenez JJ, Block NL, Badiavas EV, Rodriguez-Menocal L, Granda AV, et al. Agonistic analogs of growth hormone releasing hormone (GHRH) promote wound healing by stimulating the proliferation and survival of human dermal fibroblasts through ERK and AKT pathways. *Oncotarget*. 2016;**7**:52661-52672. DOI: 10.18632/oncotarget.11024
- [96] Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Experimental Cell Research*. 1999;**250**:273-283. DOI: 10.1006/excr.1999.4543
- [97] Yager DR, Chen SM, Ward SI, Olutoye OO, Diegelmann RF, Kelman Cohen I. Ability of chronic wound fluids to degrade peptide growth factors is associated with increased levels of elastase activity and diminished levels of proteinase inhibitors. *Wound Repair and Regeneration*. 1997;**5**:23-32. DOI: 10.1046/j.1524-475X.1997.50108.x
- [98] Stanley AC, Park HY, Phillips TJ, Russakovsky V, Menzoian JO. Reduced growth of dermal fibroblasts from chronic venous ulcers can be stimulated with growth factors. *Journal of Vascular Surgery*. 1997;**26**:994-999.discussion 999-1001
- [99] Cai R, Schally AV, Cui T, Szalontay L, Halmos G, Sha W, et al. Synthesis of new potent agonistic analogs of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and evaluation of their endocrine and cardiac activities. *Peptides*. 2014;**52**:104-112. DOI: 10.1016/j.peptides.2013.12.010

- [100] Zhang X, Cui T, He J, Wang H, Cai R, Popovics P, et al. Beneficial effects of growth hormone-releasing hormone agonists on rat INS-1 cells and on streptozotocin-induced NOD/SCID mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;**112**:13651-13656. DOI: 10.1073/pnas.1518540112
- [101] Ziegler TR, Gatzen C, Wilmore DW. Strategies for attenuating protein-catabolic responses in the critically ill. *Annual Review of Medicine*. 1994;**45**:459-480. DOI: 10.1146/annurev.med.45.1.459
- [102] Roubenoff R, Kehayias JJ. The meaning and measurement of lean body mass. *Nutrition Reviews*. 1991;**49**:163-175
- [103] Tierney R, Pierson N. Magnitude of body-cell-mass depletion death from wasting in AIDS13 and the timing. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1989;**50**:444-447
- [104] Ruberg RL. Role of nutrition in wound healing. *The Surgical Clinics of North America*. 1984;**64**:705-714
- [105] Peacock EE. Effect of dietary proline and hydroxyproline on tensile strength of healing wounds. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1960;**105**:380-383
- [106] Jeschke MG, Mlcak RP, Finnerty CC, Norbury WB, Gauglitz GG, Kulp GA, et al. Burn size determines the inflammatory and hypermetabolic response. *Critical Care*. 2007;**11**:R90. DOI: 10.1186/cc6102
- [107] Finnerty CC, Herndon DN, Przkora R, Pereira CT, Oliveira HM, Queiroz DMM, et al. Cytokine expression profile over time in severely burned pediatric patients. *Shock*. 2006;**26**:13-19. DOI: 10.1097/01.shk.0000223120.26394.7d
- [108] Herndon DN, Tompkins RG. Support of the metabolic response to burn injury. *Lancet (London, England)*. 2004;**363**:1895-1902. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16360-5
- [109] Demling RH. The role of anabolic hormones for wound healing in catabolic states. *Journal of Burns and Wounds*. 2005;**4**:46-59
- [110] Lang CH, Frost RA. Role of growth hormone, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding proteins in the catabolic response to injury and infection. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2002;**5**:271-279
- [111] Ross RJ, Rodriguez-Arno J, Bentham J, Coakley JH. The role of insulin, growth hormone and IGF-I as anabolic agents in the critically ill. *Intensive Care Medicine*. 1993;**19**(Suppl 2):S54-S57
- [112] Mulligan K, Tai VW, Schambelan M. Use of growth hormone and other anabolic agents in AIDS wasting. *JPEN Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 1999;**23**:S202-S209. DOI: 10.1177/014860719902300606
- [113] Pierre EJ, Perez-Polo JR, Mitchell AT, Matin S, Foyt HL, Herndon DN. Insulin-like growth factor-I liposomal gene transfer and systemic growth hormone stimulate wound healing. *The Journal of Burn Care and Rehabilitation*. 1997;**18**:287-291

- [114] Ramirez RJ, Wolf SE, Barrow RE, Herndon DN. Growth hormone treatment in pediatric burns: A safe therapeutic approach. *Annals of Surgery*. 1998;**228**:439-448
- [115] Takala J, Ruokonen E, Webster NR, Nielsen MS, Zandstra DF, Vundelinckx G, et al. Increased mortality associated with growth hormone treatment in critically ill adults. *The New England Journal of Medicine*. 1999;**341**:785-792. DOI: 10.1056/NEJM199909093411102
- [116] Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999;**402**:656-660. DOI: 10.1038/45230
- [117] Badman MK, Flier JS. The adipocyte as an active participant in energy balance and metabolism. *Gastroenterology*. 2007;**132**:2103-2115. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.03.058
- [118] Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, et al. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: Comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2001;**86**:1169-1174. DOI: 10.1210/jcem.86.3.7314
- [119] Dixit VD, Taub DD. Ghrelin and immunity: A young player in an old field. *Experimental Gerontology*. 2005;**40**:900-910. DOI: 10.1016/j.exger.2005.09.003
- [120] Levy R, Efrati O, Bujanover Y, Hashomer T. Leptin, ghrelin, and adiponectin in the metabolic adjustment to burn injury in children. *Wounds*. 2014;**26**(6):178-185
- [121] Sehirlı O, Sener E, Sener G, Cetinel S, Erzik C, Yeğen BC. Ghrelin improves burn-induced multiple organ injury by depressing neutrophil infiltration and the release of pro-inflammatory cytokines. *Peptides*. 2008;**29**:1231-1240. DOI: 10.1016/j.peptides.2008.02.012
- [122] Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H, et al. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2001;**280**:R1483-R1487. DOI: 10.1152/ajpregu.2001.280.5.R1483
- [123] Taub DD. Novel connections between the neuroendocrine and immune systems: The ghrelin immunoregulatory network. *Vitamins and Hormones*. 2008;**77**:325-346. DOI: 10.1016/S0083-6729(06)77014-5
- [124] Ceranowicz D, Warzecha Z, Dembinski A, Ceranowicz P, Cieszkowski J, Kusnierz-Cabala B, et al. Role of hormonal axis, growth hormone—IGF-1, in the therapeutic effect of ghrelin in the course of cerulein-induced acute pancreatitis. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2010;**61**:599-606
- [125] Ceranowicz P, Warzecha Z, Cieszkowski J, Ceranowicz D, Kuśnierz-Cabala B, Bonior J, et al. Essential role of growth hormone and IGF-1 in therapeutic effect of ghrelin in the course of acetic acid-induced colitis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;**18**:pii, E1118. DOI: 10.3390/ijms18061118
- [126] Liu C, Hao Y, Huang J, Li H, Yang Z, Zeng Y, et al. Ghrelin accelerates wound healing in combined radiation and wound injury in mice. *Experimental Dermatology*. 2017;**26**:186-193. DOI: 10.1111/exd.13224

- [127] Liu C, Huang J, Li H, Yang Z, Zeng Y, Liu J, et al. Ghrelin accelerates wound healing through GHS-R1a-mediated MAPK-NF- κ B/GR signaling pathways in combined radiation and burn injury in rats. *Scientific Reports*. 2016;**6**:27499. DOI: 10.1038/srep27499
- [128] Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2007;**8**:729-740. DOI: 10.1038/nrm2233
- [129] Tchkonina T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scrable H, et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*. 2010;**9**:667-684. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2010.00608.x
- [130] Waaijer MEC, Parish WE, Strongitharm BH, van Heemst D, Slagboom PE, de Craen AJM, et al. The number of p16INK4a positive cells in human skin reflects biological age. *Aging Cell*. 2012;**11**:722-725. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2012.00837.x
- [131] Oh J, Lee YD, Wagers AJ. Stem cell aging: Mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nature Medicine*. 2014;**20**:870-880. DOI: 10.1038/nm.3651
- [132] Bandyopadhyay D, Timchenko N, Suwa T, Hornsby PJ, Campisi J, Medrano EE. The human melanocyte: A model system to study the complexity of cellular aging and transformation in non-fibroblastic cells. *Experimental Gerontology*. 2001;**36**:1265-1275
- [133] Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975;**6**:331-343
- [134] Kirkland JL, Tchkonina T. Clinical strategies and animal models for developing senolytic agents. *Experimental Gerontology*. 2015;**68**:19-25. DOI: 10.1016/j.exger.2014.10.012
- [135] Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2014;**15**:482-496. DOI: 10.1038/nrm3823
- [136] Kuilman T, Peeper DS. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature Reviews. Cancer*. 2009;**9**:81-94. DOI: 10.1038/nrc2560
- [137] López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;**153**:1194-1217. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.039
- [138] Nelson G, Wordsworth J, Wang C, Jurk D, Lawless C, Martin-Ruiz C, et al. A senescent cell bystander effect: Senescence-induced senescence. *Aging Cell*. 2012;**11**:345-349. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2012.00795.x
- [139] Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2007;**128**:92-105. DOI: 10.1016/j.mad.2006.11.016
- [140] Passos JF, Nelson G, Wang C, Richter T, Simillion C, Proctor CJ, et al. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Molecular Systems Biology*. 2010;**6**:347. DOI: 10.1038/msb.2010.5

- [141] Ardail D, Debon A, Perret-Vivancos C, Biol-N'Garagba M-C, Krantic S, Lobie PE, et al. Growth hormone internalization in mitochondria decreases respiratory chain activity. *Neuroendocrinology*. 2010;**91**:16-26. DOI: 10.1159/000268289
- [142] Nylander E, Grönbladh A, Zelleroth S, Diwakarla S, Nyberg F, Hallberg M. Growth hormone is protective against acute methadone-induced toxicity by modulating the NMDA receptor complex. *Neuroscience*. 2016;**339**:538-547. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.10.019
- [143] Keane J, Tajouri L, Gray B. The effect of growth hormone administration on the regulation of mitochondrial apoptosis in-vivo. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;**16**:12753-12772. DOI: 10.3390/ijms160612753
- [144] Rojanathammanee L, Rakoczy S, Brown-Borg HM. Growth hormone alters the glutathione S-transferase and mitochondrial thioredoxin systems in long-living Ames dwarf mice. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*. 2014;**69**:1199-1211. DOI: 10.1093/gerona/glt178
- [145] Suzuki K, Yanagi K, Shimizu M, Wakamatsu S, Niitani T, Hosonuma S, et al. Effect of growth hormone replacement therapy on plasma diacron-reactive oxygen metabolites and endothelial function in Japanese patients: The GREAT clinical study. *Endocrine Journal*. 2017;**65**:101-111. DOI: 10.1507/endocrj.EJ17-0330
- [146] Scacchi M, Valassi E, Pincelli AI, Fatti LM, Pecori Giraldi F, Ascoli P, et al. Increased lipid peroxidation in adult GH-deficient patients: Effects of short-term GH administration. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2006;**29**:899-904. DOI: 10.1007/BF03349194
- [147] Ikushima M, Rakugi H, Ishikawa K, Maekawa Y, Yamamoto K, Ohta J, et al. Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;**339**:827-832. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.11.094
- [148] Gu Y, Zou Y, Aikawa R, Hayashi D, Kudoh S, Yamauchi T, et al. Growth hormone signalling and apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2001;**223**:35-46. DOI: 10.1023/A:1017941625858
- [149] Kokoszko A, Lewiński A, Karbownik-Lewińska M. The role of growth hormone and insulin-like growth factor I in oxidative processes. *Endokrynologia Polska*. 2008;**59**:496-501
- [150] Zadeh ZA, Kesmati M, Galehdari H, Rezai A, Seyednezhad SM, Torabi M. Evaluation of the relationship between serum levels of insulin, cortisol and growth hormones with wound healing in normal and diabetic rats. *Physiology and Pharmacology*. 2014;**18**:92-100
- [151] Hansen TK, Fisker S, Dall R, Ledet T, Jørgensen JOL, Rasmussen LM. Growth hormone increases vascular cell adhesion molecule 1 expression: In vivo and in vitro evidence. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2004;**89**:909-916. DOI: 10.1210/jc.2003-030223

DESTINATARIO

Diego Caicedo Valdés
Avda. Montecelo s/n-Mourete
36071 Pontevedra (España)

REFERENCIA: MUH/AEC

ASUNTO: RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DEL ENSAYO CLINICO Nº EUDRACT 2012-002228-34

Adjunto se remite la resolución sobre el ensayo clínico titulado **Ensayo clínico sobre el efecto angiogénico de la Hormona de Crecimiento (GH) en pacientes con isquemia crítica de las extremidades inferiores. Estudio GHAS, N° EudraCT: 2012-002228-34.**

El promotor o solicitante nombrado por éste deberá notificar la fecha de inicio del ensayo en España, remitir la información pertinente o solicitar autorización a la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, según proceda y de acuerdo con lo que establece el Real Decreto 223/2004, de las modificaciones relevantes a la documentación del ensayo, informes de seguimiento, sospechas de reacciones adversas graves e inesperadas, finalización del ensayo y demás circunstancias que establezca la legislación vigente.

Firmado digitalmente por: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

Localizador: CNDJGYQ068

Fecha de la firma: 30/09/2015

Puede comprobar la autenticidad del documento en la aplicación Localizador de la Web de la AEMPS

CORREO ELECTRÓNICO

Página 1 de 3

C/ CAMPEZO, 1 - EDIFICIO 8
28022 MADRID
Tel.: 918225073
Fax: 918225043

smhaem@aemps.es



Referencia: MUH/CLIN

ASUNTO: RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DEL ENSAYO CLINICO Nº EUDRACT 2012-002228-34

DESTINATARIO: Diego Caicedo Valdés
Avda. Montecelo s/n-Mourete
36071 Pontevedra (España)

Vista la solicitud formulada por **Diego Caicedo Valdés** para la realización del ensayo clínico número **2012-002228-34**, titulado **Ensayo clínico sobre el efecto angiogénico de la Hormona de Crecimiento (GH) en pacientes con isquemia crítica de las extremidades inferiores. Estudio GHAS**, código de protocolo del promotor **2012/1vas**, cuyo promotor es **Diego Caicedo Valdés** se emite resolución a tenor de los siguientes:

ANTECEDENTES DE HECHO

PRIMERO: Con fecha **02/06/2015**, solicita la autorización de este ensayo clínico.

SEGUNDO: Con fecha 15/06/2015 se envió validación e inicio del trámite de evaluación.

TERCERO: Con fecha 24/08/2015 se envió una propuesta de denegación que fue adecuadamente respondida.

CUARTO: Con fecha 22/09/2015 han tenido entrada en la AEMPS el dictamen favorable del CEIC de referencia y la conformidad de la dirección de UN centro.

A estos antecedentes de hecho les es de aplicación los siguientes:

FUNDAMENTOS DE DERECHO

Único.- Son de aplicación al presente procedimiento la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, modificada por la Ley 4/1999, de 13 de enero; la Ley 12/2000, de 29 de diciembre de medidas fiscales, administrativas y de orden social; Texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios, aprobado por Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio; el Real Decreto 223/2004 de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos;

Firmado digitalmente por: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
Fecha de la firma: 30/09/2015

Localizador: CNDJGYQ068

Puede comprobar la autenticidad del documento en la aplicación Localizador de la Web de la AEMPS

CORREO ELECTRÓNICO
smhaem@aemps.es

Página 2 de 3

C/ CAMPEZO, 1 - EDIFICIO 8
28022 MADRID
Tel.: 918225073
Fax: 918225043



el Real Decreto 1275/2011, de 16 de septiembre, por el que se crea la Agencia estatal «Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios» y se aprueba su Estatuto, y demás normas aplicables.

Así, del expediente se deduce que se cumplen los requisitos establecidos para su autorización de acuerdo con el artículo 22 del Real Decreto 223/2004.

Por todo lo anteriormente expuesto la Directora de la Agencia de Medicamentos y Productos Sanitarios en el ejercicio de sus competencias **RESUELVE:**

1º.- AUTORIZAR la realización de este ensayo clínico con número EudraCT 2012-002228-34.

Contra esta Resolución, que pone fin a la vía administrativa, puede interponerse potestativamente Recurso de Reposición ante el/la Director/a de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios en el plazo de un mes, conforme a lo dispuesto en el artículo 116 y 117 de la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones públicas y del Procedimiento Administrativo Común, o interponerse Recurso Contencioso-Administrativo ante el Juzgado Central de lo Contencioso-Administrativo de Madrid, en el plazo de dos meses a contar desde el día siguiente a la recepción de la presente notificación, conforme a lo dispuesto en la Ley Reguladora de la Jurisdicción Contencioso-Administrativa de 13 de julio de 1998, y sin perjuicio de cualquier otro recurso que pudiera interponerse.

LA DIRECTORA DE LA AGENCIA ESPAÑOLA
DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS

D^a. Belén Crespo Sánchez-Eznarriaga

Firmado digitalmente por: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

Localizador: CNDJGYQ068

Fecha de la firma: 30/09/2015

Puede comprobar la autenticidad del documento en la aplicación Localizador de la Web de la AEMPS

CORREO ELECTRÓNICO

Página 3 de 3

smhaem@aemps.es

C/ CAMPEZO, 1 - EDIFICIO 8
28022 MADRID
Tel.: 918225073
Fax: 918225043



DICTAMEN DEL COMITÉ AUTONÓMICO DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE GALICIA

Paula M. López Vázquez, Secretaria del Comité Autonomo de Ética de la Investigación de Galicia,

CERTIFICA

Que este Comité, actuando en calidad de CEIC de referencia, evaluó en su reunión del día 09/09/2015 la propuesta del promotor para que se realice el estudio:

Nº EudraCT: 2012-002228-34

Código del promotor: 2012/1vas

Código de Registro: 2012/378

Versión/fecha del protocolo y Hoja de Información al Paciente: protocolo versión 3.0 de 5 de marzo de 2015 y documentos de consentimiento informado de la misma fecha

Título: Ensayo clínico sobre el efecto angiogénico de la Hormona de Crecimiento (GH) en pacientes con isquemia crítica de las extremidades inferiores. Estudio GHAS

Promotor: Diego Caicedo Valdés

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, la Declaración de Helsinki, así como los requisitos del Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero y la Circular nº 07 / 2004, investigaciones clínicas con productos sanitarios y demás normas que los desarrollan.
- Los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- El seguro o la garantía financiera previstos.
- El procedimiento para obtener el consentimiento informado, incluyendo la hoja de información para los sujetos, el plan de reclutamiento de sujetos y las compensaciones previstas para los sujetos, el plan de reclutamiento de los mismos y las compensaciones previstas para ellos por daños que pudieran derivarse de su participación en el ensayo.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas y su posible interferencia con el respeto a los postulados éticos.

Emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización de dicho ensayo en los centros y por los investigadores principales siguientes

Centros	Investigadores Principales
C.H. de Pontevedra	Diego Caicedo Valdés



Y HACE CONSTAR QUE:

1. El CAEIG cumple los requisitos legales vigentes (R.D 223/2004 por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, y la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica).
2. El CAEIG tanto en su composición como en sus PNTs cumple las Normas de Buena Práctica Clínica (CPMP/ICH/135/95).
3. La composición actual del CAEIG es:

Manuel Portela Romero. (Presidente). Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Irene Zarra Ferro. (Vicepresidenta). Farmacéutica de Atención Especializada.

Paula M^a López Vázquez, (Secretaria). Médico Especialista en Farmacología Clínica.

Juan Vázquez Lago (Secretario Suplente). Médico Especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública.

Jesús Alberdi Sudupe. Médico especialista en Psiquiatría.

Rosendo Bugarín González. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Juan Casariego Rosón. Médico Especialista en Cardiología.

Xoán X. Casas Rodríguez. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Juana M^a Cruz del Río. Trabajadora Social.

Juan Fernando Cueva Bañuelos. Médico Especialista en Oncología Médica.

José Álvaro Fernández Rial. Médico Especialista en Medicina Interna.

José Luis Fernández Trisac. Médico Especialista en Pediatría.

M^a José Ferreira Díaz. Diplomada Universitaria de Enfermería.

Pablo Nimo Ríos. Licenciado en Derecho. Miembro externo

Pilar Gayoso Diz. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Agustín Pía Morandeira. Farmacéutico de Atención Primaria

Salvador Pita Fernández. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Carmen Rodríguez-Tenreiro Sánchez. Licenciada en Farmacia.

Susana María Romero Yuste. Médico Especialista en Reumatología.

M^a Asunción Verdejo González. Médico Especialista en Farmacología Clínica.

Y para que conste a petición del interesado, en Santiago de Compostela, a 09 de septiembre de 2015

Firmado digitalmente por LOPEZ VAZQUEZ PAULA MARIA - DNI 46900339G
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, o=XUNTA DE GALICIA, ou=certificado electrónico de empleado público, serialNumber=46900339G, sn=LOPEZ VAZQUEZ, givenName=PAULA MARIA, cn=LOPEZ VAZQUEZ PAULA MARIA - DNI 46900339G
Fecha: 2015.09.09 10:54:32 +02'00'

Paula M. López Vázquez

Estudio para evaluar la mejoría de la circulación en las piernas mediante tratamiento con hormona del crecimiento (GH)

Estado No iniciado	Tipo de Participantes Población especialmente vulnerable , Pacientes	Rangos de Edad Mayores de 64 , Adultos (18 - 64)
Género Ambos	Fases Fase III	Participantes esperados Sin determinar
Resultados Sin resultados	Bajo nivel intervención No	Enfermedad rara No

Información

Identificador

2012-002228-34

Enfermedad investigada

Falta de circulación con riesgo de amputación

Título Científico

Ensayo clínico sobre el efecto angiogénico de la Hormona de Crecimiento (GH) en pacientes con isquemia crítica de las extremidades inferiores. Estudio GHAS

Justificación

No aportado

Objetivo Principal

Evaluar la eficacia angiogénica y la seguridad de la hormona del crecimiento subcutánea (sGH) en pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores

Variables de Evaluación Primaria

Fotopletismografía (onda en milímetros)

Momentos temporales de evaluación primaria

0 días
30 días
60 días
1 año

Objetivo Secundario

Determinar el momento de inicio de la acción angiogénica de la sGH una vez es administrada
Comparar la gravedad de enfermedad arterial periférica entre los grupos de tratamiento (sGH y placebo) con las pruebas descritas en el protocolo en el momento basal, 30 días y final de tratamiento (60 días)
Evaluar el efecto de la sGH a largo plazo tras la interrupción del tratamiento (1 año)
Evaluar la seguridad del tratamiento con GH para esta indicación mediante descripción de los eventos adversos.

Variables de Evaluación Secundaria

Estudio Doppler: velocidad Sistólica; velocidad diastólica, índice de pulsatilidad, índice tobillo-brazo; análisis morfológico de la curva
Angio-TAC/Angio-RMN/arteriografía
Biopsia muscular

Momentos temporales de evaluación secundaria

0 días
30 días (salvo angioTAC/RMN/Arteriografía and biopsia)
60 días
1 año (salvo angioTAC/RMN/Arteriografía and biopsia)

Criterios de Inclusión

Pacientes con Isquemia Crítica de la Extremidad Inferior diagnosticada por métodos clínicos (lesiones tróficas y/o dolor de reposo o nocturno de naturaleza isquémica) y hemodinámicos (Índice Tobillo-Brazo o ITB igual o menor de 0.4)
Fallo de intento previo de revascularización por los métodos principales: terapias quirúrgica y/o endovascular
Alto riesgo de pérdida de la extremidad.

Criterios de Exclusión

Mujeres en edad fértil
Menores de edad
Incapacitados legalmente
Pacientes oncológicos
Sepsis

Calendario

(Última actualización: 08/08/2018)

Autorización 30/09/2015	Inicio de Ensayo No aportado	Inclusión Primer Paciente No aportado	Interrumpido No aportado	Reiniciado No aportado
Fin de reclutamiento No aportado	Fin prematuro (España) No aportado	Fin prematuro (Global) No aportado	Fin del ensayo en España No aportado	Fin del ensayo global No aportado

Promotor

Diego Caicedo Valdés España

Avda. Montecelo s/n-Mourete 36071 Pontevedra

Contact Person

Fundación Biomédica Galicia Sur - Unidad de Apoyo a la Investigación

0034 986 800949

0034 986 800096

marta.olivares.parada@sergas.es

Monetary support: ISCIII/Fundación Biomédica Galicia Sur

Centros

Activo (31/05/2017)

**COMPLEXO HOSPITALARIO
UNIVERSITARIO DE PONTEVEDRA**

PONTEVEDRA

PONTEVEDRA

Angiología y Cirugía Vasculat



Medicamentos

Genotonorm
Polvo y disolvente para solución inyectable

Código ATC: H01AC01 - SOMATROPINA
Principios Activos: somatropinal

Experimental

Sin resultados

Study to evaluate the improvement of leg's circulation through growth hormone (GH) treatment.

State Not initiated	Type of participants Population especially vulnerable , Patient	Age Ranges Older than 64 , Adults (18 - 64)
Gender Both	Phases Phase III	Expected Participants Undetermined
Results No results	Low level of intervention No	Rare disease No

Information

Identifier

2012-002228-34

Investigated Disease

Circulation deficit at risk of amputation

Scientific Title

Growth hormone (GH) angiogenic effect clinical trial on patients with lower limb critical ischemia. GHAS Study

Rationale

Not provided

Main Objective

To evaluate the angiogenic efficacy and the safety of subcutaneous growth hormone (sGH) on patients with lower limb critical ischemia

Primary Endpoints

Photoplethysmography (wave in millimeters)

Temporary moments of secondary assessment

0 days
30 days
60 days
1 year

Secondary Objective

To determine the onset time of angiogenic action of sGH after injection
To compare the severity of peripheral artery disease among treatment groups (sGH and placebo) according to protocol tests at time 0, 30 days and 60 days (end of treatment)
To evaluate long term effects of sGH after end of treatment (1 year)
To evaluate the safety of sGH treatment through adverse events description.

Secondary Endpoints

Doppler study: systolic speed, diastolic speed, pulsatility index, ABI, morphological analysis of the curve
Angio-CT/angio-MRI/arteriography
Muscular biopsy

Temporary moments of secondary assessment

0 days
30 days (except angioCT/MRI/arteriography and biopsy)
60 days
1 year (except angioCT/MRI/arteriography and biopsy)

Inclusion criteria

Patients with lower limbs critical ischemia by mean: trophic lesions and/or rest pain and/or night pain of ischemic origin and ankle-brachial index (ABI) equal or lower than 0.4
Failed previous attempts of revascularization through main methods: surgical and/or endovascular therapies.
High risk of loss limb

Exclusion criteria

Fertile women

Aged under 18
 Legally incapable
 Onchologic patients
 Sepsis

Calendar

(Last Update: 08/08/2018)

Authorization 30/09/2015	Start of Trial Not aported	First patient inclusion Not aported	Halted Not aported	Restarted Not aported
End of recruitment Not aported	Premature end (Spain) Not aported	Premature End (Global) Not aported	Trial end (Spain) Not aported	Trial end (Global) Not aported

Sponsor

Diego Caicedo Valdés España

Avda. Montecelo s/n-Mourete 36071 Pontevedra

Contact Person

Fundación Biomédica Galicia Sur - Unidad de Apoyo a la Investigación

0034 986 800949

0034 986 800096

marta.olivares.parada@sergas.es

Monetary support: ISCIIIIFundación Biomédica Galicia SurI

Sites

Active (31/05/2017)	COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE PONTEVEDRA
	PONTEVEDRA
	PONTEVEDRA
	Angiología y Cirugía Vascolar



Medication

Genotonorm Polvo y disolvente para solución inyectable
ATC code: H01AC01 - SOMATROPINA Active Principles: somatropinal
Experimental

No results

Informe del Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de los centros usuarios de animales de experimentación de la USC en el Campus de Santiago

El CEEA de los centros usuarios de animales de experimentación de la USC en el Campus de Santiago, tras evaluar el Proyecto titulado “Estudio sobre efecto angiogénico de la Hormona de Crecimiento (GH) en un modelo animal de isquemia de las extremidades inferiores” del que es Investigador Responsable D. Diego Caicedo Valdés, acordó con fecha 28 de Julio de 2015 emitir

INFORME FAVORABLE

para la realización de dicho proyecto, así como los procedimientos que incluye, en las instalaciones de los establecimientos usuarios Animalario de la Facultad de Medicina y Animalario del CIMUS, con números de registro ES150780263401 y ES150780275701, respectivamente, y siempre que, en cumplimiento del RD 53/2013, se obtenga la correspondiente autorización administrativa.

En Santiago, a 30 de Julio de 2015



Fdo. El secretario



Responsable administrativo:	Nombre: Raúl Vieira Miguel Cargo: Director de la RIAIDT de la USC	Firma y sello
-----------------------------	--	---------------

JOSÉ MANUEL CIFUENTES MARTÍNEZ, PRESIDENTE DEL COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA, cuya Sección de Experimentación animal ha sido designada como Órgano habilitado para la evaluación de proyectos de experimentación animal por resolución de la Xunta de Galicia, con fecha 11 de noviembre de 2013, de acuerdo con lo exigido por el RD 53/2013 de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia,

INFORMA:

Que el proyecto de investigación titulado: ***“Estudio sobre efecto angiogénico de la Hormona de Crecimiento (GH) en un modelo animal de isquemia de las extremidades inferiores”*** del que es investigador responsable D. **Diego Caicedo Valdés**, ha sido examinado por el Comité de Bioética de esta Universidad, Sección de Experimentación Animal, reunido el uno de octubre del presente año, llegando a las siguientes conclusiones:

- Con respecto a su finalidad, se trata de un proyecto de investigación traslacional o aplicada cuyo objetivo es demostrar el efecto clínico de la GH sobre la mejora del tiempo y distancia máxima recorrida por la rata, en un modelo de isquemia crónica mediante el test Treadmill, demostrando el efecto angiogénico de la GH mediante diversos test hemodinámicos y de laboratorio.
- Con respecto a los requisitos de las 3Rs,
 - no cabe la posibilidad de reemplazo ya que objetivo general y primario del estudio se basa en la distancia máxima recorrida y el objetivo secundario en probar la angiogénesis mediante distintos tipos de test que precisan animal vivo, dicho estudio no se puede plantear de otra forma. Los estudios de laboratorio ya se han realizado.
 - La experimentación se realizará en un centro registrado como usuario de animales de experimentación por lo que la manipulación, manejo y supervisión de los animales durante todo el proyecto será llevada a cabo por personas capacitadas. El grupo investigador lo componen personas con capacitaciones A, B y C, lo que asegura su preparación para garantizar el bienestar animales durante todos los procedimientos (requisito de refinamiento). Además, todos los procedimientos quirúrgicos se realizarán con una anestesia adecuada y los animales recibirán analgésicos en los días siguientes con el fin de minimizar el dolor, angustia o sufrimiento que pudieran experimentar.
 - Finalmente, con respecto al requisito de reducción, este Comité considera que el número de animales propuesto es adecuado para conseguir datos fiables. El grupo de investigación ha realizado el estudio estadístico correspondiente y el cálculo muestral en base a utilizar el menor número de animales posible teniendo en cuenta las pérdidas. Dicho cálculo se ha realizado en base a la prueba más sensible para reducir en lo posible el número de animales.
- La clasificación de los procedimientos en función de su grado de severidad es de “leve” en los procedimientos 2 y 3 y “moderado” en los procedimientos 1 y 4.
- Con respecto al balance de los daños y los beneficios, los procedimientos se efectúan bajo anestesia general por los que no ocasionan dolor, angustia ni sufrimiento, y los animales reciben analgésicos y antibioterapia con posterioridad a la intervención para minimizar el malestar que provocan. Los métodos de sacrificio descritos (sobredosis de pentotal sódico) se encuentran entre los indicados por el propio RD 53/2013 para los roedores. Entre los beneficios esperados se trata de demostrar los múltiples datos indirectos sobre el aumento de la aplicabilidad que presenta un tratamiento como es el de la Hormona de Crecimiento (GH), una hormona que, si bien en la

actualidad presenta indicaciones restringidas y fundamentalmente para los trastornos de crecimiento, así como en los problemas deficitarios del adulto o en el hipopituitarismo, hoy en día se sabe que puede aportar muchos más beneficios de los tradicionales. Se trata, por tanto, de un proyecto, no para generar un fármaco nuevo, sino para aumentar el abanico de indicaciones de un tratamiento ya existente, bien conocido, económico en la actualidad y con perfil de seguridad importante gracias a su control de dosis con IGF-1.

- Se han examinado las situaciones y excepciones previstas en el punto e) del artículo 34. 2 encontrando que ninguna de ellas es aplicable en este proyecto.
- El proyecto se clasifica como tipo I y por tanto no debe ser sometido a evaluación retrospectiva.

Por todas estas razones, este Comité acordó emitir un **INFORME FAVORABLE**.

En la evaluación de este proyecto **NO HA EXISTIDO CONFLICTO DE INTERESES**.

Lugo, 2 de octubre de 2015



The image shows a handwritten signature in black ink over a blue circular stamp. The stamp contains the text 'UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA' around the perimeter and 'VICERREITORÍA DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN' in the center. The signature is written in a cursive style.



XUNTA DE GALICIA

DELEGACIÓN TERRITORIAL
DA CORUÑA

Xefatura Territorial da Consellería do
Medio Rural e do Mar

Edificio Administrativo Monelos
Vicente Ferrer, 2
15071 A Coruña

galicia

REXISTRO XERAL DA XUNTA DE GALICIA
REXISTRO DO EDIFICIO ADMINISTRATIVO DA CORUÑA
A CORUÑA

Data: 29/01/2016 13:15:04

SAÍDA 11005 / RX 122168



José Manuel Cifuentes
Departamento de Anatomía
Facultade de Veterinaria
Campus Universitario
27002 Lugo

NOTIFICACIÓN DE RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15010/2015/002

Data de inicio: 24.11.2015

Interesado: Diego Caicedo Valdés

Forma de inicio: solicitude do interesado

Procedemento: resolución de autorización

Notifícolle que con data 25 de xaneiro de 2016, o xefe territorial da Consellería do Medio Rural emitiu unha resolución de autorización do proxecto de experimentación animal, cuxo texto íntegro é o seguinte:

ANTECEDENTES

O interesado, como representante do CIMUS (Universidade de Santiago de Compostela) presentou, con data 24.11.2015 e rexistro de entrada 133158 RX 2367476, unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal, cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: Estudio sobre efecto angiogénico da Hormona de Crecemento (GH) nun modelo animal de isquemia das extremidades inferiores

Nome do centro usuario: Facultade de Medicina da USC

Persoa responsable do proxecto: Diego Caicedo Valdés

Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Animalario do CIMUS

Clasificación do proxecto : Tipo I Tipo II Tipo III

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1. O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE núm. 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.
2. O artigo 89 da Lei 30/1992, de 26 de novembro, do réxime xurídico das administracións públicas e do procedemento administrativo común (BOE núm. 285, 27 de novembro de 1992), modificada pola Lei 4/1999, de 14 de xaneiro, establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.



XUNTA DE GALICIA

DELEGACIÓN TERRITORIAL
DA CORUÑA

Xefatura Territorial da Consellería do
Medio Rural e do Mar

Edificio Administrativo Monelos
Vicente Ferrer, 2
15071 A Coruña

galicia

3. O Servizo de Gandarías da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto que realizou o órgano habilitado, a Sección de Experimentación Animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co artigo 11 do Decreto 245/2009 de 3 de abril, polo que se regulan as delegacións territoriais da Xunta de Galicia e o Decreto 46/2012, de 19 de xaneiro, polo que establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural e do Mar e do Fondo Galego de Garantía Agraria.

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

1. Autorizar o proxecto solicitado.
2. Notificarlle esta resolución á persoa interesada.

O mencionado proxecto non debe someterse a unha avalización retrospectiva.

A autorización deste proxecto terá unha duración de cinco anos e transcorrido este tempo, deberá ser renovada.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandarías.

Esta autorización poderá ser suspendida, no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirada, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpor recurso de alzada ante a conselleira de Medio Rural e do Mar da Xunta de Galicia no prazo dun mes contado a partir da recepción da notificación da presente resolución, conforme coa Lei 30/1992, do 26 de novembro, (BOE núm.: 285, 27 de novembro de 1992), de réxime xurídico das administracións públicas e do procedemento administrativo común na súa redacción dada pola Lei 4/1999, do 13 de xaneiro.

A Coruña, 28 de xaneiro de 2016

O xefe do Servizo de Gandarías



Eugenio Romero Senande