



Original

Evaluación de la reperusión tras angiogénesis terapéutica con fotopleletismografía en un modelo murino de isquemia de miembros inferiores

Evaluation of the reperfusion after angiogenic therapy with photoplethysmography in a murine model of limb ischemia

Diego Caicedo Valdés¹, Pablo Devesa Peleteiro², Amalia Pazos González¹, Laura Romero Vázquez¹, Manuel Martínez Pérez¹, Víctor M. Arce Vázquez³, Jesús Devesa Múgica⁴

¹Servicio de Angiología y Cirugía Vascular. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. ²Departamento de Investigación y Desarrollo. Centro Médico Foltra. Teo, A Coruña. ³Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Centro de Investigación Molecular y Enfermedades Crónicas de la Universidad de Santiago (CIMUS). Santiago de Compostela. ⁴Centro Médico Foltra. Teo, A Coruña

Resumen

Introducción: a pesar del extendido uso de la fotopleletismografía (PPG) en clínica como test diagnóstico no invasivo de la isquemia, su utilización en experimentación animal es escasa.

Objetivo: evaluar el valor de la PPG en el seguimiento de la reperusión angiogénica en un modelo murino de isquemia periférica.

Material y métodos: en ratas macho Sprague Dawley se excluyeron los sectores arteriales iliaco y femoral de la pata trasera izquierda. Como control se utilizó la pata contralateral. Los animales se dividieron en tres grupos: GH (n = 8), placebo (n = 6) y sham (n = 2). La perfusión fue evaluada mediante escalas clínica y funcional y por PPG. Toda recuperación de la onda de PPG mayor del 5% fue considerada significativa. Se diseñaron controles basales, a los 10, 20 y 30 días. Se calculó el cociente de pulsatilidad pata/pata (rpp), así como los cambios morfológicos de la onda de pulso. La relación entre variables cualitativas fue evaluada por test Chi-cuadrado y la de las variables cuantitativas, mediante t de Student.

Resultados: los valores basales de rpp entre patas mostraron gran variabilidad, pero con una correlación significativa positiva: 0,9 (0,74-0,97, IC 95%, p < 0,001). La media de incremento de rpp a 30 días fue mayor en el grupo GH: 0,3 (0-1,1), p = 0,097 frente a 0,03 (0-0,2), p = 0,81. El 62,5% de animales GH presentó una recuperación significativa de la onda frente al 20% en el grupo placebo (recuperación media de la onda: 45% frente a 15,8% [p = 0,086], GH y placebo, respectivamente).

Conclusiones: la fotopleletismografía ha mostrado una sensibilidad adecuada para detectar pequeños cambios de perfusión en el modelo de isquemia propuesto y tras la administración de GH. Dicha prueba podría ser de utilidad como complemento en el seguimiento de la reperusión angiogénica tras isquemia en el modelo de tipo murino.

Palabras clave:

Fotopleletismografía (PPG). Experimentación animal. Modelo murino de isquemia. Hormona de crecimiento. Angiogénesis.

Key words:

Photoplethysmography (PPG). Animal experimentation. Murine model of ischemia. Growth hormone. Angiogenesis.

Abstract

Introduction: despite the widespread use of photoplethysmography (PPG) in clinical practice as a non-invasive diagnostic test for ischemia, it has been little used in animal experimentation.

Objective: to evaluate PPG for the follow-up of angiogenic reperfusion after growth hormone (GH) therapy in a murine model of limb ischemia.

Recibido: 30/11/2018 • Aceptado: 09/06/2019

Caicedo Valdés D, Devesa Peleteiro P, Pazos González A, Romero Vázquez L, Martínez Pérez M, Arce Vázquez VM, Devesa Múgica J. Evaluación de la reperusión tras angiogénesis terapéutica con fotopleletismografía en un modelo murino de isquemia de miembros inferiores. *Angiología* 2019;71(4):127-134.

DOI: <http://dx.doi.org/10.20960/angiologia.00002>

Correspondencia:

Diego Caicedo Valdés. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Rúa de la Choupana, s/n. 15706 Santiago de Compostela
e-mail: diego.caicedo.valdes@sergas.es

Material and methods: in male Sprague Dawley rats, the iliac and femoral arterial sectors of the left hind limb were excluded. As a control, the contralateral limb was used. The rats were divided into three groups: GH (n = 8), placebo (n = 6) and sham (n = 2). Besides PPG, the perfusion was evaluated by clinical and functional scores. Any recovery of the PPG wave greater than 5% was considered as significant. Controls at baseline, 10, 20 and 30 days were planned. The paw/paw pulsatility ratio (rpp) was calculated, as well as the morphological changes of the pulse wave. The relationship between qualitative variables was evaluated by Chi-square test, and that of quantitative variables by Student's t-test.

Results: the baseline values of rpp between limbs showed great variability, but with a significant positive correlation: 0.9 (0.74-0.97, 95% CI, $p < 0.001$). The mean increase in rpp at 30 days was higher in the GH group: 0.3 (0-1.1), $p = 0.097$ vs. 0.03 (0-0.2), $p = 0.81$. Among GH animals, 62.5% presented a significant recovery of the wave as compared to 20% in placebo group (average recovery of the wave: 45% vs. 15.8% [$p = 0.086$], GH and placebo, respectively).

Conclusions: photoplethysmography has shown a suitable sensitivity to detect small changes of perfusion in the proposed ischemic model and after GH administration. The aforementioned test could be useful as a supplementary tool during the identification of the angiogenic reperfusion process after ischemia in a murine model.

INTRODUCCIÓN

La fotoplethysmografía (PPG) por reflexión es un test diagnóstico no invasivo para detectar procesos isquémicos muy utilizado en la actualidad para la valoración del estado microcirculatorio, medida indirecta del estado macrocirculatorio. La cantidad de luz infrarroja reflejada por los tejidos está directamente relacionada con la cantidad de sangre en el área localizada justo debajo del sensor. Los nuevos sensores de PPG, junto con algoritmos matemáticos, permiten una mayor sensibilidad disminuyendo las posibles interferencias que tradicionalmente han limitado su uso. Además, es un test excelente para hacer determinaciones seriadas. La sencillez de su realización y su fácil interpretación le atribuyen un gran valor para la práctica clínica. Sus principales limitaciones son su gran sensibilidad al movimiento del sujeto, por lo que requiere sujetos en reposo, y su gran dependencia de la temperatura ambiental, entre otros. Sin embargo, dicho test ha sido escasamente utilizado en experimentación animal, relegado por pruebas con mayor sensibilidad y visibilidad como la flujometría por láser doppler asociada a imagen o la tomografía de emisión de positrones-tomografía axial computarizada (PET-TAC). Así, su utilización para la valoración y el seguimiento de la reperfusion en terapias angiogénicas en modelos murinos de isquemia de extremidades inferiores todavía no ha sido convenientemente contrastada.

La trascendencia del modelo de isquemia elegido en los resultados ha sido previamente estudiada con detalle (1). En este sentido, el modelo doble de isquemia periférica es el más recomendado para el estudio de la angiogénesis. La ligadura de la arteria

epigástrica superficial caudal del animal añadida a este modelo (modelo triple) afecta más aún a la gravedad de la isquemia generada, provocando que la reperfusion se produzca mediante vasos colaterales más profundos e intramusculares en su mayoría, lo que enlentece el proceso regenerador.

Por otro lado, como factor angiogénico para este estudio se ha elegido la hormona de crecimiento (GH), que recientemente ha sido descrita como una prohormona capaz de inducir angiogénesis tanto en modelos experimentales como clínicos de isquemia (2-5).

Este artículo es novedoso porque aporta el valor de la PPG como método indirecto de valoración de la reperfusion tras angiogénesis terapéutica en un modelo murino de isquemia periférica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley con un peso de entre 350 y 400 gramos, estabuladas y manejadas de acuerdo a las normas de experimentación animal del centro donde se realizaba el estudio y del Comité de Experimentación Animal (CEEA) 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%, mante-

nimiento: 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 tres 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 hormona de crecimiento recombinante: Genotonorm miniquick 0,4 mg, 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 9:00 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.

Como analgésico se utilizó buprenorfina (0,03-0,05 mg/kg/24 h, 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.

Fotopletismografía (PPG)

Se realizó bajo sedación leve del animal (isofluorano a 1,5%), en una sala a temperatura constante (24-25 °C) y 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 la 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 del tiempo 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: 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 se 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 (6,7). 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 al 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 de Chi-cuadrado (X^2) con corrección de Fisher, mientras que para las variables continuas se usó la t de Student para dos muestras independientes o apareadas, 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.

RESULTADOS

Se analizó la capacidad de la onda de pulso PPG para detectar diferencias de reperusión angiogénica mediante dos modelos de isquemia animal diferentes en ocho ratas piloto sin tratamiento alguno. Se comparó un modelo de isquemia doble (exclusión ilio-femoral), frente a un modelo de isquemia simple (exclusión fémoro-safeno-poplítea) (Fig. 1).

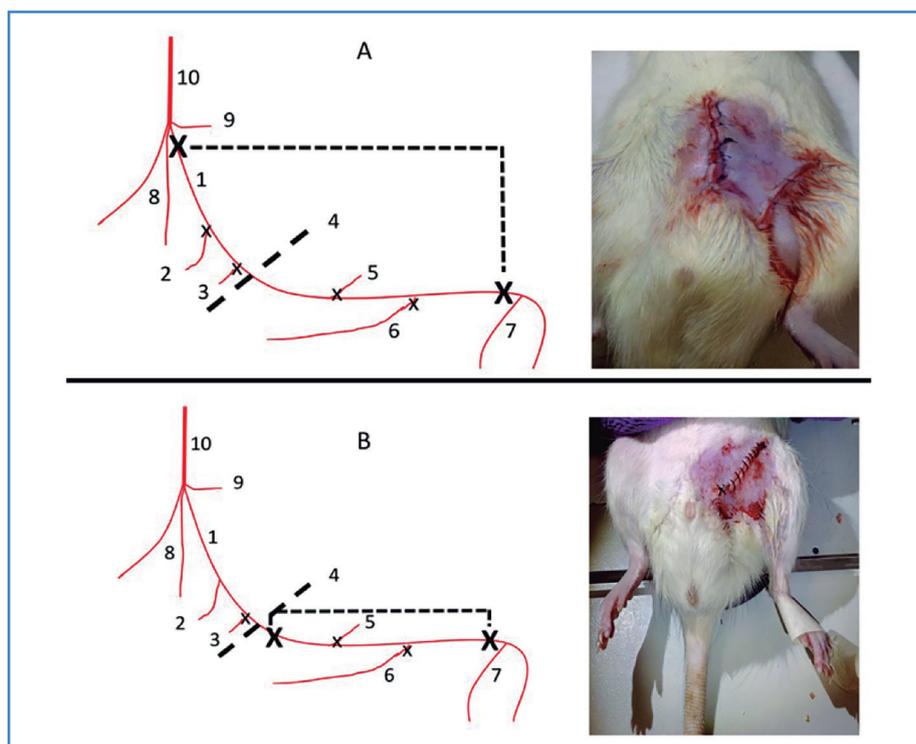


Figura 1. Esquema quirúrgico. A. Modelo de isquemia doble. B. Modelo de isquemia simple. La línea discontinua larga representa el sector arterial extirpado. 1: a. iliaca común; 2: a. iliaca interna; 3: tronco epigástrico-pudendo; 4: ligamento inguinal; 5: a. circunfleja femoral lateral; 6: a. epigástrica superficial caudal; 7: aa. poplíteas y safenas; 8: a. caudal medial; 9: a. lumbar; 10: aorta.

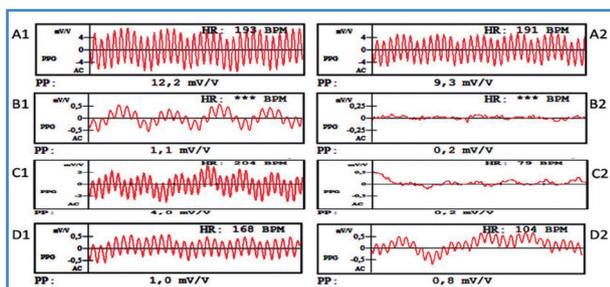


Figura 2. A. Patrón de ondas PPG normales y simétricas en ambas patas traseras de la rata previo a la isquemia (A1: pata derecha, A2: pata izquierda). B. Patrón normal en la pata derecha sin isquemia (B1) y patrón completamente plano en la pata izquierda justo después de inducir la isquemia (B2). C. Patrón de recuperación a los 30 días de la onda PPG en el modelo doble de isquemia (C2). Obsérvese la casi nula recuperación respecto al patrón de control en la pata contralateral (C1). D. Patrón de recuperación a los 30 días en un modelo simple de isquemia (D2). Obsérvese la buena recuperación de la onda (D2) respecto al patrón de control en la pata contralateral (D1). PP: pulsatilidad; HR: frecuencia cardíaca; PPG: fotopleletismografía; BPM: latidos por minuto; mv/v: milivoltios/voltio.

La PPG fue capaz de detectar diferencias a los 30 días entre ambos modelos de isquemia en todos los animales (Fig. 2).

Se observó la existencia de variabilidad de pulsatilidad y morfología de la onda PPG pata-pata pre-isquemia. Para analizar dicha variabilidad se utilizó un gráfico de dispersión, observando la agrupación de los valores de la onda de pulso (Fig. 3). Se estudió el grado de correlación entre dichos valores en los 14 animales a estudio, así como en el grupo sham. Se aplicó el test de correlación de Pearson de valores basales de pulsatilidad, mostrando una correlación significativa positiva de 0,9 (0,74-0,97, IC 95%, $p < 0,001$).

Se detectaron varios patrones normales de la onda PPG, obtenidos de la pata contralateral sana durante el seguimiento (Fig. 4). Mientras los patrones A y B se asociaron a altas frecuencias cardíacas (generalmente mayores de 150 lpm), los patrones B y C típicamente estuvieron asociados a frecuencias cardíacas más bajas.

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, también 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%.

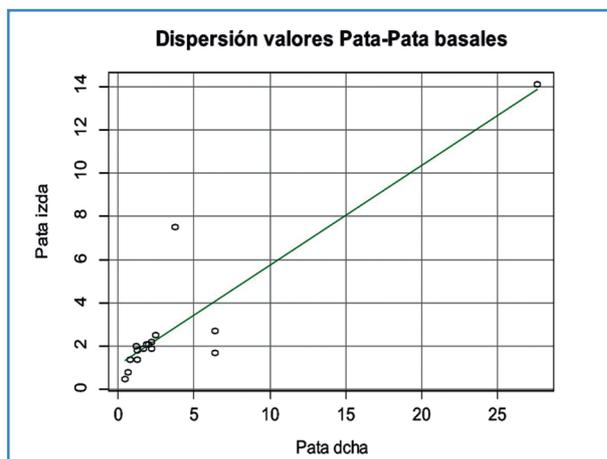


Figura 3. Gráfico de dispersión que muestra la distribución de los valores de pulsatilidad basales entre patas. Obsérvese la existencia de valores atípicos (outliers), pero con una buena agrupación en torno a la línea media.

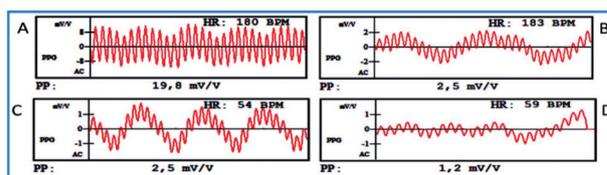


Figura 4. A-D. Patrones normales de ondas PPG. Obsérvese la menor frecuencia cardíaca (HR) en los patrones B y C frente a los A y B.

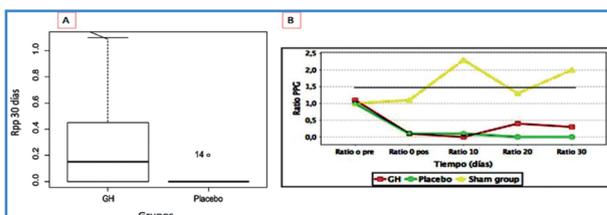


Figura 5. A. Diagrama de cajas que muestra el rpp medio alcanzado al final del tratamiento entre los grupos tratados. B. Evolución gráfica durante el periodo de 30 días de los distintos grupos. La línea azul representa la media del rpp medio del grupo sham.

Se compararon los valores de rpp basales poscirugía (T0-pos) y finales (T30) para cada uno de los grupos. Así, 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, $p = 0,81$). La evolución durante el periodo de tratamiento se muestra en la figura 5.

Las escalas clínica y funcional de valoración del daño isquémico también mostraron una mayor tendencia a una respuesta positiva en el grupo GH. Desde el punto de vista de la escala clínica, el 87,5% de los animales con GH se quedaron en escalas del 1 al 4,

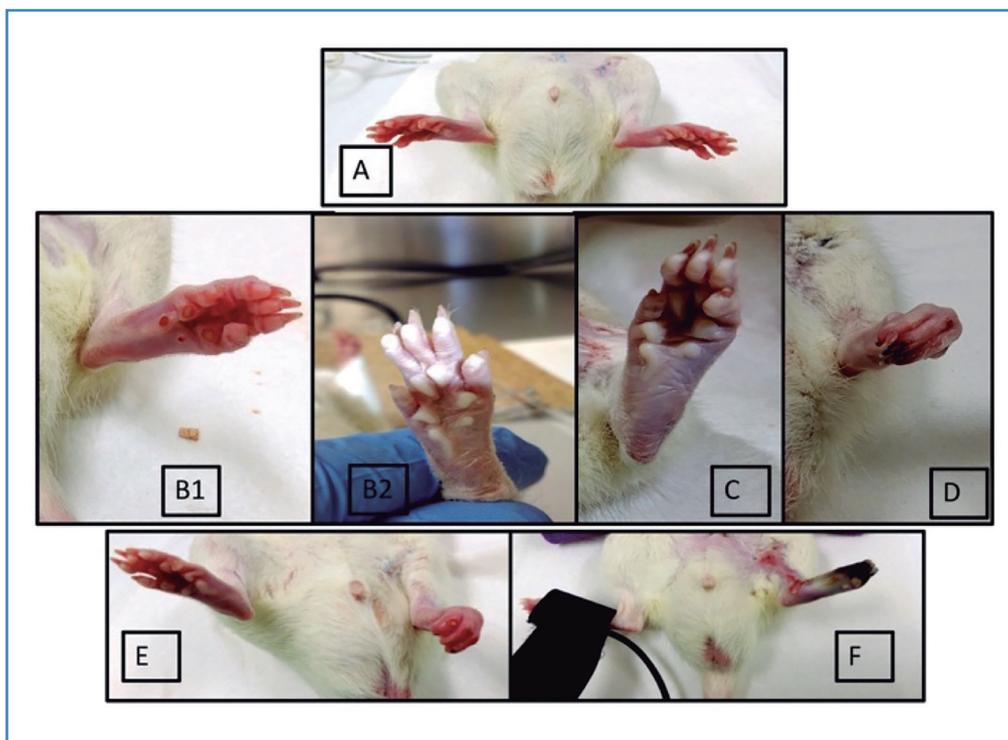


Figura 6. Imágenes fotográficas de los animales durante el seguimiento clínico. A. Patas normales (simetría). B-D. Diferentes estados clínicos de isquemia (estadios 2, 3, 4, respectivamente). E. Daño funcional severo con lesión nerviosa completa (escala 3). F. Daño clínico severo con necrosis completa y autoamputación (escala 5).

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 ($p = 0,35$) (Fig. 6).

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 ($p = 0,24$) (Fig. 6).

DISCUSIÓN

Los modelos de isquemia animal mediante ligadura con o sin resección arterial usados frecuentemente en los artículos sobre angiogénesis, aunque fuertemente criticados por no imitar el modelo ateroesclerótico crónico, siguen siendo utilizados por su facilidad y bajo coste.

En nuestro caso, tras analizar diversos modelos de isquemia publicados (8-10), y teniendo en cuenta la

revisión crítica sobre dichos modelos experimentales efectuada por Shireman (11) y la escuela de Leiden, decidimos escoger el modelo de isquemia doble recomendado por estos últimos autores (1), ya que es el único modelo en el que la recuperación fisiológica al mes de la isquemia es lo suficientemente baja (54%, frente al 100% entre siete y 28 días de los modelos simples) como para no sesgar los resultados (1,11,12).

De igual forma, esperar 10-14 días tras la isquemia para convertir el modelo de isquemia aguda en crónica fue descartado de entrada debido a la rápida recuperación fisiológica del animal, casi máxima entre los siete y los 14 días, alcanzando una fase *plateau* el día 21 (10). Por ello, comenzamos el tratamiento el mismo día de la isquemia (1).

Como se ve en la figura 4B, las curvas se amortiguan drásticamente tras la cirugía, comenzando a mejorar a partir del día 10 de isquemia en el grupo GH frente al placebo, momento en el que la molécula angiogénica parece incrementar la angiogénesis fisiológica respecto a aplicar un placebo. Se debe señalar que el grupo GH recibió un modelo de isquemia más agresivo (modelo triple o con ligadura añadida de la

arteria epigástrica superficial caudal) con más frecuencia que el grupo placebo: 7 vs. 3 animales. Esto significa que el grupo GH fue tratado en condiciones de isquemia más severas. Esto se explica porque el estudio que presentamos está actualmente en marcha y el azar ha motivado esta situación. Aunque este hecho podría invalidar parcialmente los resultados por no ser los grupos homogéneos, refuerza la tendencia observada de mejoría angiogénica que la GH induce.

En la revisión bibliográfica realizada no hemos encontrado artículos recientes que valoren el valor de la PPG a en estas circunstancias, sin embargo, su validez ha sido previamente contrastada con la flujometría por láser doppler (13).

A pesar de las limitaciones comentadas con anterioridad, y dado que el animal se encuentra inmóvil por la sedación, el control de la temperatura de la sala es suficiente para alcanzar conclusiones fiables.

A diferencia de la onda de PPG en la práctica clínica, en el animal, debido a su alta frecuencia cardiaca 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.

Deben ser vigilados, sin embargo, y corregidos los posibles errores de sobreestimación automática de pulsatilidad, típicos con frecuencias cardiacas lentas del animal y en la reperfusión, como puede adivinarse en la figura 3C, en la que el patrón oscilante de la misma hace calcular de forma errónea la pulsatilidad en 2,5 mv/v, cuando en realidad la onda es de 1 mv/v. En nuestra serie encontramos tan solo dos errores, por lo que es un fenómeno poco frecuente. 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. 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 veno-arteriolar (14).

Aunque se aconseja realizar las pruebas hemodinámicas con vasodilatación máxima tras ejercicio

del animal (15,16), esta opción quedó descartada desde el inicio tras comprobar que había una gran influencia del comportamiento del animal así como de la cirugía en sí misma en el test *treadmill*, 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 (16).

Por tanto, todas las pruebas que miden flujo microcirculatorio deben ser interpretadas en conjunción con otros datos, y no de forma aislada.

CONCLUSIONES

La fotopletismografía ha sido escasamente utilizada para ver reperfusión tras angiogénesis en experimentación animal. En el modelo de isquemia utilizado, dicha prueba puede ofrecer un buen balance entre coste y rendimiento para las determinaciones seriadas del proceso isquémico. Se necesita un estudio de mayor tamaño para corroborar estos datos mediante pruebas más específicas.

RESPONSABILIDADES ÉTICAS

Este experimento fue aprobado por el Comité de Ética en Experimentación Animal (CEEA) de Galicia, con número de proyecto ES150780275701, así como por la Xunta de Galicia, adhiriéndose a las directrices del ARRIVE, y se realizó de acuerdo con el Acta de 1986 del Reino Unido sobre Animales (Procedimientos Científicos) y las recomendaciones relacionadas de la Directiva UE 2010/63/UE para experimentos con animales, y la guía sobre el cuidado y utilización de los animales de laboratorio del National Institute of Health (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los autores declaran haber contribuido al artículo como sigue:

- Concepción y diseño del estudio: Diego Caicedo, Pablo Devesa y Jesús Devesa.

- Adquisición, análisis e interpretación de los datos: Diego Caicedo, Pablo Devesa, Amalia Pazos y Laura Romero.
- Borrador del artículo y revisión crítica del contenido intelectual: Diego Caicedo, Jesús Devesa, Manuel Martínez y Víctor M. Arce.

Todos los autores han aprobado la versión definitiva que se presenta.

FINANCIACIÓN

El presente trabajo ha sido financiado por la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascul ar (beca de investigación).

BIBLIOGRAFÍA

1. Hellingman AA, Bastiaansen AJNM, De Vries MR, et al. Variations in surgical procedures for hind limb ischaemia mouse models result in differences in collateral formation. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2010;40(6):796-803. DOI: 10.1016/j.ejvs.2010.07.009
2. Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, et al. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev* 2009;89(4):1177-215. DOI: 10.1152/physrev.00024.2009
3. Caicedo D, Díaz O, Devesa P, et al. Growth hormone (GH) and cardiovascular system. *Int J Mol Sci* 2018;19(1):290. DOI: 10.3390/ijms19010290
4. Dobrucki LW, Tsutsumi Y, Kalinowski L, et al. Analysis of angiogenesis induced by local IGF-1 expression after myocardial infarction using microSPECT-CT imaging. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48(6):1071-9. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.10.008
5. Caicedo D, Devesa P, Arce VM, et al. Chronic limb-threatening ischemia could benefit from growth hormone therapy for wound healing and limb salvage. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2018;12(2):53-72. DOI: 10.1177/1753944717745494
6. Lejay A, Choquet P, Thaveau F, 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. DOI: 10.1016/j.ejvs.2014.12.010
7. Stabile E, Susan Burnett M, Watkins C, et al. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation* 2003;108(2):205-10. DOI: 10.1161/01.CIR.0000079225.50817.71
8. Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, et al. Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol* 1998;152(6):1667-79.
9. Layman H, Sacasa M, Murphy AE, et al. Co-delivery of FGF-2 and G-CSF from gelatin-based hydrogels as angiogenic therapy in a murine critical limb ischemic model. *Acta Biomater* 2009;5(1):230-9. DOI: 10.1016/j.actbio.2008.07.024
10. Sachdev U, Cui X, Tzeng E. HMGB1 and TLR4 mediate skeletal muscle recovery in a murine model of hindlimb ischemia. *J Vasc Surg* 2013;58(2):460-9. DOI: 10.1016/j.jvs.2012.11.071
11. Shireman PK, Quinones MP. Differential necrosis despite similar perfusion in mouse strains after ischemia. *J Surg Res* 2005;129(2):242-50. DOI: 10.1016/j.jss.2005.06.013
12. Orbay H, Zhang Y, Hong H, et al. Positron emission tomography imaging of angiogenesis in a murine hindlimb ischemia model with 64Cu-labeled TRC105. *Mol Pharm* 2013;10(7):2749-56. DOI: 10.1021/mp400191w
13. Widmer LW, Vikatmaa P, Aho P, et al. Reliability and repeatability of toe pressures measured with laser Doppler and portable and stationary photoplethysmography devices. *Ann Vasc Surg* 2012;26(3):404-10. DOI: 10.1016/j.avsg.2011.10.011
14. Silva H, Ferreira HA, Da Silva HP, et al. The venoarteriolar reflex significantly reduces contralateral perfusion as part of the lower limb circulatory homeostasis in vivo. *Front Physiol* 2018;9:1123. DOI: 10.3389/fphys.2018.01123
15. Hoefer IE, Van Royen N, Jost MM. Experimental models of arteriogenesis: Differences and implications. *Lab Anim (NY)* 2006;35(2):36-44. DOI: 10.1038/labon0206-36
16. Bondke A, Hillmeister P, Buschmann IR. Exact assessment of perfusion and collateral vessel proliferation in small animal models. *Circ Res* 2007;100(8). DOI: 10.1161/01.RES.0000266608.88805.8b