

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Fisiología Animal II**



**CAPACIDAD ANGIOGÉNICA DE CÉLULAS AISLADAS  
DEL OMENTUM HUMANO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Ignacio García Gómez**

Bajo la dirección de los doctores  
Pedro Cuevas Sánchez y Javier Angulo Frutos

**Madrid, 2008**

• ISBN: 978-84-692-1071-0

©Ignacio García Gómez, 2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA ANIMAL II



**CAPACIDAD ANGIOGENICA DE  
CELULAS AISLADAS DEL OMENTUM  
HUMANO**

TESIS DOCTORAL

IGNACIO GARCIA GOMEZ

2008



Facultad de Ciencias Biológicas  
Departamento de Fisiología Animal II

# **CAPACIDAD ANGIOGENICA DE CELULAS AISLADAS DEL OMENTUM HUMANO**

Tesis presentada por **IGNACIO GARCIA GOMEZ** para optar al  
grado de Doctor en Ciencias Biológicas

## **DIRECTORES**

**Dr. Pedro Cuevas Sánchez**  
Jefe del Servicio de Histología del  
Departamento de Investigación del  
Hospital Universitario Ramón y  
Cajal de Madrid

**Dr. Javier Angulo Frutos**  
Titulado Técnico Superior del  
Servicio de Histología del  
Departamento de Investigación del  
Hospital Universitario Ramón y  
Cajal de Madrid

Madrid, 2008

*A mis padres, Carlos y Pilar, a Patricia y a mis hermanos, Borja y Carlos, por formar parte de mi vida, de mi felicidad.*

*-Sorprendernos por algo es el primer paso de la mente hacia el descubrimiento-*

Louis Pasteur (1822-1895)

**- AGRADECIMIENTOS -**

*Quisiera agradecer a todas estas personas la inestimable ayuda que me brindaron.*  
**MUCHAS GRACIAS A TODOS.**

*Gracias a mis directores de tesis, Pedro y Javier, por ser mis referentes como investigadores, por ser personas apasionadas con su trabajo, por ser personas que decidieron elegir el camino del saber como forma de vida.*

*Gracias Pedro por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi vocación como investigador estos años, durante los cuales he aprendido tantas cosas a tu lado.*

*Gracias Javier por haberme ayudado tanto en esta última etapa, por mostrarme el camino de manera tan didáctica, enseñando a ver las opciones pero dejando que uno mismo sea el que tome las decisiones. Sin tu ayuda hubiese sido imposible la realización de esta tesis.*

*Gracias Doctor Harry Goldsmith. Fue una experiencia increíble conocer a alguien de su categoría, como persona, cirujano e investigador, y comprobar la sencillez y cercanía de la que solo las personas de tanta entidad como usted poseen. Le agradezco los días que pasó por Madrid donde tuve la suerte de conocerle haciendome partícipe de la pasión por su trabajo, el cual es excepcional.*

*Gracias a mis padres, Carlos y Pilar, gracias por todo, porque sin vosotros jamás podría haber acometido esta empresa. Gracias Mama por ser como eres, por ser un ejemplo vivo de humanidad para cualquiera que te haya conocido y mucho más para tu hijo que tanto te admira. Tienes estrella e iluminas a quien se cruza en tu camino, gracias por estar siempre conmigo. Gracias Papa, por ser un triunfador en todos los aspectos de tu vida, familiar, personal y profesional, por haber sido un luchador y demostrarnos que cuando uno quiere puede, porque no hay mejor ejemplo que uno mismo, gracias por estar siempre conmigo. Os quiero.*

*Gracias Patricia, por ser parte de mí, por aguantarme una y otra vez, por tu sensibilidad, por tu bondad, por tu ilusión desbordante que me contagia tantas veces, gracias por dejarme formar parte de tu vida y hacer la mía tan feliz. Tengo mucha suerte, eres extraordinaria, tienes un don y es que sabes ser feliz. Ánimo con tus proyectos, ingeniera, que llegarás muy lejos. Gracias porque sin tu cariño y apoyo no hubiese terminado este trabajo. Te quiero.*

*Gracias a mis hermanos, Borja y Carlos, os quiero muchísimo, me habéis demostrado lo valientes que sois, es increíble lo que estáis consiguiendo, seguid así y*

*contad conmigo para lo que queráis, siempre estaré ahí para vosotros. También aprovecho para darles las gracias a Silvia y a Carolina, mucha suerte con vuestros proyectos, me encanta estar rodeado de gente tan emprendedora. Me llena de alegría ver a mis hermanos tan bien y ahí tenéis mucho que ver vosotras, muchas gracias.*

*Gracias a todas mis compañeras del Servicio de Histología. A Diana por enseñarme a trabajar con cultivos celulares, que tan necesarios han sido para la realización de esta tesis, mucho ánimo con tu tesis que ya no te queda nada. A Chantal por tu ayuda en la revisión de los textos. A Sonia por tu simpatía y a Rocío mucho ánimo con tu tesis, te aseguro que al final se consigue terminar. De manera especial quiero agradecerse a Maite, Begoña y Tina.*

*Gracias Maite por tu ayuda con toda la histología en este y otros trabajos, me siento muy orgulloso de haber compartido contigo los últimos años de tu dilatada vida laboral. Este último año ha sido muy duro para ti, espero que a partir de ahora empiecen a enderezarse las cosas y te vaya todo de maravilla, de verdad lo deseo de corazón porque te lo mereces.*

*Gracias Begoña, por tu dedicación, por toda tu ayuda sin pedir nada a cambio, has sido muy generosa conmigo y siempre te estaré agradecido. Te aprecio y valoro mucho, siempre estaré encantado de ayudarte en lo que quieras.*

*Gracias Tina, por tu ayuda incondicional siempre que la necesité, por ser tan generosa y desprendida con la gente que te rodea, eres una persona excelente. A las personas como tú estoy convencido que siempre les tiene que ir bien en la vida, por que se lo ganan a pulso todos los días.*

*Me llevo mucho de todas vosotras, por todos estos años compartidos, por todas esas horas de laboratorio interminables pero tan gratificantes.*

*Gracias a todos mis amigos, con los que he compartido tantas vivencias y experiencias, por ser personas que en su momento despertaron mi curiosidad y simpatía, lo que me llevo a conocerlas en profundidad y a descubrir personas maravillosas en cada uno de ellos. Gracias por estar ahí, me alegra poder dedicaros estas palabras al concluir esta tesis.*

*Gracias Alfonso, por ser un hermano, por compartir tantas cosas conmigo, por tener la seguridad de que siempre vas a estar ahí. Tienes muchas cosas dentro de ti, son*

*las cosas que las personas que te queremos y apreciamos más valoramos, y a veces son las que te empeñas en ocultar, deja que la gente las descubra, les harías un gran regalo.*

*Gracias Pepa, por ser como eres, por ser tan positiva, activa y vital, por haberme contagiado tu optimismo y esas ganas de vivir que tanto he necesitado durante la realización de esta tesis. Eres fantástica.*

*Gracias Fran, Alfonso (Fonsi), Raquel, Sylvi y Diego por esos momentos compartidos. Gracias Fran y Fonsi por esos viajes por el mundo, de Quebec a Budapest, pasando por Copenhague, Praga, Dublín, Amsterdam..... Lugares dónde fuisteis compañeros de viaje y siempre lo seréis, compañeros y amigos que compartimos todo en esos momentos, risas, discusiones, anécdotas, etc. La verdad es que recuerdo esos viajes con mucha emoción. Enhorabuena Fran y Raquel por vuestra próxima paternidad, Sofía va a ser una niña increíble, aunque lo tiene fácil con esos padres.*

*Gracias a la gente que ha entrado a formar parte de mi vida en esta última etapa. Gracias Javi y Diana. Javi eres un tío estupendo, siempre dispuesto a echar una mano. Gracias Diana por ayudarme en la maquetación de la tesis, tienes una energía alucinante dentro de ti, aprende a canalizarla y llegarás donde quieras. Gracias también a Juan y a Milagros por haber transmitido tantos valores a Patricia. Tenéis una hija fantástica.*

*Gracias a mis compañeros de la facultad, Jesús, Sonia, Laura, Natalie. Los años compartidos durante la carrera fueron fantásticos, me alegro de no haber perdido el contacto con vosotros y saber que os va todo tan bien.*

*Gracias a todos mis tíos por vuestro interés, por fin puedo deciros que ya he terminado la tesis.*

*Gracias a mis abuelos, Luis y Teresa, que por desgracia ya no están con nosotros. Abuelo por fin he terminado, espero que te alegres desde dónde estés ya que sé que te hacía mucha ilusión.*

*Gracias a las personas del hospital, como Arancha del servicio de hematología por su ayuda con toda la citometría, al doctor Pedro López Hervás con las muestras de omentum y al doctor Javier Blázquez por su colaboración. Gracias a Jose, Rafa, David, Silvia y Natalia con los que compartí cigarrillos, charlas y momentos muy agradables. En especial gracias a Natalia por ayudarme en el análisis de la citometría de flujo y a Silvia por estar siempre dispuesta a ayudar.*

*Gracias Fernando es un lujo haber podido trabajar contigo en algún momento.*

*Gracias a Concha, a Elena, y especialmente a Verónica, de la facultad de medicina de la autónoma por su ayuda y colaboración con algunos experimentos.*

*Gracias Mary por dejarme empezar en el mundo de la investigación durante la carrera.*

*Gracias Elisa por ser mi primera profesora, la persona que me enseñó a leer y me dejó desarrollar inquietudes como el dibujo y la pintura, prometo que algún día los retomaré.*

*Gracias a todas a aquellas personas que me han ayudado en mayor o menor medida en la realización de este trabajo, siempre les estaré agradecido.*

*Gracias por último a los animales de laboratorio, por su sacrificio. Sacrificio impuesto por nosotros pero sin el cual sería imposible el avance de la ciencia y de la humanidad.*

*Muere lentamente quien no viaja,  
quien no lee, quien no escucha música,  
quien no halla encanto en sí mismo.*

*Muere lentamente quien destruye su amor propio;  
quien no se deja ayudar.*

*Muere lentamente  
quien se transforma en esclavo del hábito  
repetiendo todos los días los mismos senderos,  
quien no cambia de rutina,  
no se arriesga a vestir un nuevo color  
o no conversa con quien desconoce.*

*Muere lentamente quien evita una pasión  
y su remolino de emociones,  
aquellas que rescatan el brillo de los ojos  
y los corazones decaídos.*

*Muere lentamente  
quien no cambia su vida cuando está insatisfecho  
con su trabajo o su amor,  
quien no arriesga lo seguro por lo incierto  
para ir detrás de un sueño, quien no se permite  
al menos una vez en la vida huir de los consejos sensatos...*

*¡Vive hoy!*

*¡Arriesga hoy!*

*¡Haz hoy!*

*¡No te dejes morir lentamente!*

*¡No te olvides de ser feliz!*

*Pablo Neruda*

Este trabajo ha sido realizado en el *Servicio de Histología del Departamento de Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid* y parcialmente subvencionado con ayuda de la *Omentum Research Foundation (San Gabriel, California, USA)* y la empresa *Action Medicines, SL. (Madrid)*.

**- INDICE -**

- <b>ABREVIATURAS</b> - .....	- 1 -
- <b>INTRODUCCION</b> - .....	- 4 -
EL OMENTUM .....	- 5 -
CELULAS MESOTELIALES .....	- 8 -
Funciones de las células mesoteliales .....	- 9 -
Reparación por medio de las células mesoteliales .....	- 10 -
Potencial de las células mesoteliales en la ingeniería de tejidos .....	- 11 -
CELULAS DE LA CAPA SUBSerosa .....	- 12 -
TRANSICION EPITELIO-MESENQUIMA .....	- 13 -
CELULAS FIBROBLASTICAS .....	- 14 -
NEOVASCULARIZACION .....	- 16 -
VASCULOGENESIS .....	- 16 -
ARTERIOGENESIS .....	- 16 -
ANGIOGENESIS .....	- 17 -
El proceso angiogénico .....	- 18 -
ENFERMEDADES ANGIOGENESIS DEPENDIENTES .....	- 20 -
Enfermedades asociadas a un exceso de angiogénesis .....	- 22 -
Enfermedades asociadas a una insuficiente angiogénesis .....	- 22 -
FACTORES DE CRECIMIENTO .....	- 22 -
LA FAMILIA DEL VEGF .....	- 22 -
Regulación de la expresión del gen del VEGF .....	- 24 -
Receptores del VEGF .....	- 25 -
Transducción de señales .....	- 27 -
Actividad biológica .....	- 29 -
LA FAMILIA DEL FGF .....	- 29 -
Mecanismos de secreción del FGF .....	- 31 -
Receptores del FGF .....	- 32 -
Transducción de señales .....	- 34 -
Actividad biológica .....	- 36 -
- <b>OBJETIVOS</b> - .....	- 37 -
- <b>MATERIAL Y METODOS</b> - .....	- 39 -
AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CELULAS PROCEDENTES DEL OMENTUM .....	- 40 -
CULTIVOS PRIMARIOS .....	- 40 -
Primera digestión enzimática .....	- 40 -
<i>Centrifugación en gradiente de densidad</i> .....	- 41 -
Segunda digestión enzimática .....	- 41 -
<i>Centrifugación en gradiente de densidad</i> .....	- 42 -
SUBCULTIVOS .....	- 43 -
Despegado de las células .....	- 43 -
Congelación .....	- 44 -
Descongelación .....	- 44 -

TECNICAS INMUNOCITOQUIMICAS .....	- 44 -
TECNICA DE INMUNOPEROXIDASA .....	- 45 -
TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA .....	- 46 -
TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA DOBLE .....	- 47 -
CITOMETRIA DE FLUJO .....	- 47 -
VALORACION DE LAS CONCENTRACIONES DE FGF-2 Y VEGF EN LOS CULTIVOS CELULARES .....	- 48 -
ANGIOGENESIS <i>IN VIVO</i> .....	- 49 -
HISTOLOGIA .....	- 50 -
FIJACION E INCLUSION EN PARAFINA .....	- 50 -
COLORACION CON HEMATOXILINA-EOSINA .....	- 51 -
TECNICA INMUNOHISTOQUIMICA .....	- 52 -
EVALUACION DE LA NEOVASCULARIZACION .....	- 53 -
ANALISIS ESTADISTICO .....	- 53 -
<b>- RESULTADOS - .....</b>	<b>- 55 -</b>
CULTIVOS CELULARES .....	- 56 -
MORFOLOGIA CELULAR .....	- 56 -
Células mesoteliales .....	- 56 -
Células de tipo fibroblástico .....	- 57 -
EXPRESION DE FILAMENTOS INTERMEDIOS .....	- 58 -
Células mesoteliales .....	- 58 -
Células de tipo fibroblástico .....	- 58 -
EXPRESION DE MARCADORES .....	- 61 -
Células mesoteliales .....	- 61 -
Células de tipo fibroblástico .....	- 61 -
EXPRESION DE FGF-2 Y VEGF .....	- 64 -
VALORACION DE LAS CONCENTRACIONES DE FGF-2 Y VEGF .....	- 64 -
ANGIOGENESIS <i>IN VIVO</i> .....	- 66 -
NEOVASCULARIZACION .....	- 66 -
EVALUACION DE LA NEOVASCULARIZACION .....	- 66 -
INMUNODETECCION DE LAS CELULAS IMPLANTADAS .....	- 68 -
ESTUDIO DE PROLIFERACION CELULAR <i>in situ</i> .....	- 69 -
<b>- DISCUSION - .....</b>	<b>- 71 -</b>
MORFOLOGIA Y CARACTERIZACION DE LOS CULTIVOS CELULARES .....	- 73 -
EXPRESION DE NESTINA EN LOS CULTIVOS CELULARES .....	- 76 -
EXPRESION Y LIBERACION DE FGF-2 Y VEGF .....	- 77 -
ANGIOGENESIS <i>in vivo</i> .....	- 79 -
<b>- CONCLUSIONES - .....</b>	<b>- 83 -</b>
<b>- BIBLIOGRAFIA - .....</b>	<b>- 86 -</b>
<b>- ANEXO - .....</b>	<b>- 114 -</b>

**- ABREVIATURAS -**

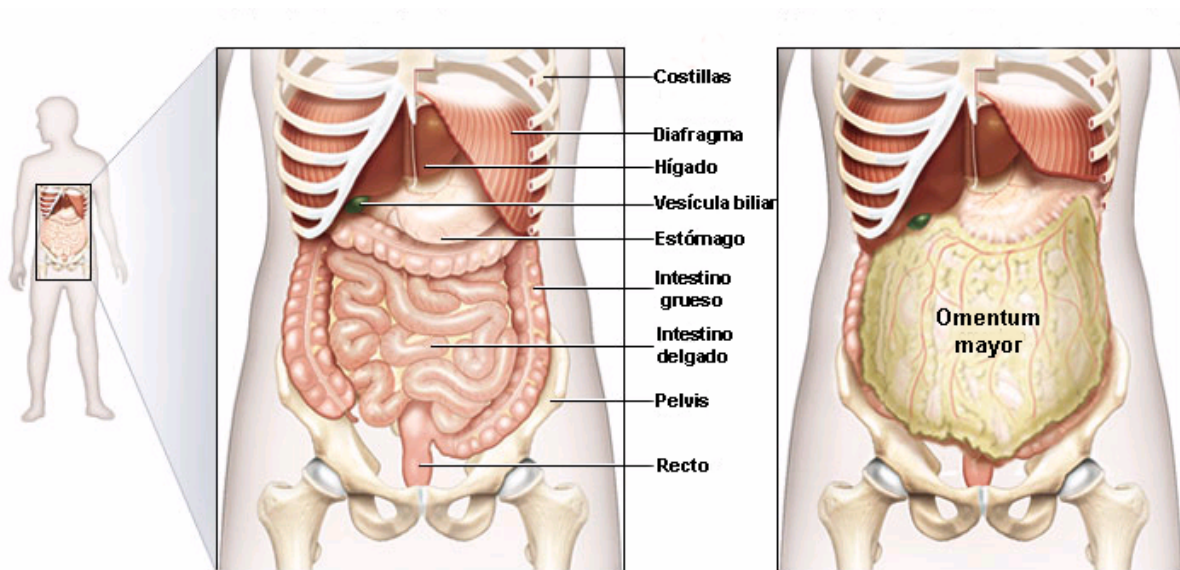
- **ABC:** complejo avidina-biotina.
- **APC:** alofocianina.
- **BMNC:** células mononucleares de médula ósea.
- **DAB:** tetrahidrocloruro de 3-3' diaminobencidina.
- **DAG:** diaciglicerol.
- **DMEM:** Dulbecco's Minimal Essential Medium.
- **DMSO:** dimetil sulfoxido.
- **EGF:** factor de crecimiento epidérmico.
- **ELISA:** ensayo de inmunoabsorbancia.
- **eNOS:** óxido nítrico sintasa endotelial.
- **EPC:** células progenitoras endoteliales.
- **ERK:** quinasas reguladas por señales extracelulares.
- **FAK:** quinasa de adhesión focal.
- **FGF:** factor de crecimiento para fibroblastos.
- **FGFR:** receptor del factor de crecimiento para fibroblastos.
- **FITC:** tioisocianato de fluoresceína.
- **GTP:** guanosín trifosfato.
- **HBSS:** Hanks Balanced Salt Solution.
- **HGF:** factor de crecimiento para hepatocitos.
- **HIF:** factor de transcripción inducido por hipoxia.
- **HRE:** elemento de respuesta a la hipoxia.
- **HS:** heparina/heparán sulfato.
- **HSPG:** heparán sulfato proteoglicanos.
- **IFN- $\gamma$ :** interferon  $\gamma$ .
- **Ig:** inmunoglobulina.
- **IGF:** factor de crecimiento de tipo insulina.
- **IL:** interleuquina.
- **IP<sub>3</sub>:** inositol 1,4,5 trifosfato.
- **JNK:** quinasa N-terminal de jun.
- **KGF:** factor de crecimiento para queratinocitos.
- **MAPK:** proteína quinasa de activación mitogénica.
- **MCP-1:** proteína-1 quimioatrayente de monocitos.
- **MEK:** quinasa MAP/ERK.
- **MFI:** media de la intensidad de fluorescencia.
- **MMP:** metaloproteasas de la matriz.
- **MSC:** células madre mesenquimales.
- **NO:** óxido nítrico.
- **NRP:** neuropilina.
- **PBMNC:** células mononucleares de médula ósea periféricas.
- **PBS:** solución tampón fosfato.
- **PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- **PE:** ficoeritrina.

- **PercP:** proteína clorofila peridina.
- **PI3K:** fosfatidil inositol 3 quinasa.
- **PIP<sub>2</sub>:** fosfatidil inositol difosfato.
- **PKB/Akt:** proteína quinasa B.
- **PKC:** proteína quinasa C.
- **PLC:** fosfolipasa C.
- **PLGF:** factor de crecimiento placentario.
- **SEM:** error estándar de la media.
- **SFB:** suero fetal bovino.
- **SIDA:** síndrome de inmunodeficiencia adquirido.
- **SNC:** suero normal de cabra.
- **TBS:** solución tampón Tris-fosfato.
- **TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento de transformación  $\beta$ .
- **TIMP:** inhibidores tisulares de metaloproteasas.
- **Tyr (Y):** tirosina.
- **VEGF:** factor de crecimiento para el endotelio vascular.
- **VEGFR:** receptor del factor de crecimiento para el endotelio vascular.
- **VHL:** Von Hippel-Lindau.

**- INTRODUCCION -**

## EL OMENTUM

El omentum, también denominado epiplón, está situado en la cavidad abdominal, y consta de dos partes, el omentum menor que une el borde izquierdo del hígado al borde derecho del esófago y el duodeno a la curvatura menor del estómago, y el omentum mayor que une la curvatura mayor del estómago con el bazo y el colon transverso, desde donde continúa como un gran delantal que recubre la cara anterior de los intestinos (Fig.1).



**Figura 1.** Esquema donde se muestran los órganos abdominales y la situación anatómica del omentum mayor recubriéndolos como un gran delantal.

El omentum es de origen mesodérmico y se desarrolla después de la rotación del estómago y posterior plegamiento y fusión del mesenterio dorsal. Una vez formado, adquiere la estructura de delantal que recubre los órganos abdominales (Liebermann-Meffert, 1983; Hosgood, 1990; Liebermann-Meffert, 2000).

El omentum es la mayor fuente de factores angiogénicos y neurogénicos, los cuales contribuyen a su efecto terapéutico en el tratamiento de úlceras crónicas en extremidades, de fasciitis de necrotización, y de pérdidas de tejidos blandos (Chamorro y col., 1993). También se ha utilizado para tratar enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Goldsmith, 2001), o para recubrir las anastomosis intestinales después de la cirugía. Se desconocen todavía algunos aspectos de la estructura histológica del omentum, y como ésta se relaciona con la eficacia del omentum como material de implante.

En 1896, Drummond y Morison intentaron aliviar la ascitis cambiando la sangre portal a la circulación sistémica a través del omentum. Desde esta descripción del uso quirúrgico del omentum, los cirujanos han extendido las aplicaciones clínicas de este tejido

para la reconstrucción orgánica. Ha existido una progresión natural en su uso a medida que se desarrollaban y mejoraban las técnicas quirúrgicas para la reconstrucción, utilizando este tejido para recubrir lesiones y defectos de órganos. De esta manera, la utilización del omentum ha tenido una evolución desde el fragmento pediculado para la reconstrucción local y regional, hasta la utilización del tejido aislado para reconstruir y revascularizar zonas distantes mediante técnicas microquirúrgicas.

La reconstrucción y revascularización de una extremidad se consiguió en 1967, cuando Goldsmith, demostró experimentalmente que un fragmento pediculado de omentum podía ser tunelizado subcutáneamente hasta la extremidad inferior. Más tarde, Casten y Alday (1971) describieron el uso del fragmento pediculado para la revascularización de la extremidad inferior y disminución del linfedema. Desde entonces, otros autores han descrito también el uso del omentum como un implante pediculado para la revascularización tanto de las extremidades inferiores (Herrera y col., 1991; Talwar y col., 1998) como de la extremidades superiores (Ala-Kulju y Virkkula, 1990).

El omentum, por su capacidad angiogénica, ha sido utilizado para la revascularización del miocardio isquémico como implante pediculado (Vineberg, 1967), para la revascularización de heridas avasculares crónicas causadas por osteomielitis (Azuma y col., 1976), para la revascularización de la médula espinal (Goldsmith y col., 1975), y como donante de arterias microvasculares para implante (Nitchter, 1989). A finales de los años 60 numerosos autores publicaron la utilización del omentum como tejido de implante. McLean fue el primero en utilizar el omentum como fragmento libre para trasplante, usando técnicas microquirúrgicas (McLean y Buncke, 1972). En 1976, Azuma y colaboradores describieron el uso del omentum para el tratamiento de la osteomielitis. En 1980, Ohtsuka y colaboradores utilizaron el omentum con resultados satisfactorios para recubrir la parte distal de la extremidad inferior en dos pacientes que tenían pérdida de tejidos blandos. Aunque Goldsmith, en 1980, fue el primero en sugerir la utilización del omentum para la revascularización de la pierna, los primeros en aplicarlo fueron Usmanov y colaboradores en 1989. Desde entonces, se han descrito numerosos casos clínicos usando el omentum para revascularizar las extremidades, observándose mejorías entre las 3 y 6 semanas (Pederson y Pribaz, 1995).

En humanos, el omentum aparece como un pliegue visceral en el peritoneo, y tradicionalmente se consideraba que estaba compuesto por múltiples láminas de células mesoteliales que rodeaban al tejido adiposo vascularizado (Sivit, 1996; Sompayrac y col., 1997). En un estudio reciente sobre la estructura del omentum se demostró que el

omentum humano estaba compuesto de dos tipos de tejidos estructuralmente diferentes: membranas finas translúcidas y áreas ricas en tejido adiposo (Wilkosz y col., 2005). También se ha observado que, tanto en el omentum de roedores como en el de humanos, existen agregados de células inflamatorias en diferentes estados de diferenciación, denominados cuerpos lechosos (Ranvier, 1874; Cui y col., 2002).

En roedores, las membranas finas translúcidas del omentum se describieron como una red con fenestraciones (Simer, 1934; Ryan y col., 1971; Zhu y col., 1997; Cui y col., 2002). En humanos, la región translúcida está formada por dos capas de células mesoteliales opuestas que no parecen asentarse sobre una membrana basal, separadas por fibras de colágena difusas y ocasionalmente células con forma de fibroblastos. Las membranas del omentum tienen como rasgo más llamativo la presencia de varias fenestraciones donde se unen las dos capas opuestas de células mesoteliales, dando la apariencia de red de pescar (Wilkosz y col., 2005). La función de las fenestraciones es todavía desconocida, pero se describieron estructuras similares en la pleura parietal del hamster separando la cavidad pleural izquierda de la derecha (Fukuo y col., 1990). Se ha sugerido que las fenestraciones podrían ser un medio de comunicación, permitiendo el transporte de fluidos y solutos entre ambos lados del espacio pleural; de hecho es bien conocida la implicación de las células mesoteliales en el transporte de solutos (Madison y col., 1979; Zocchi, 2002). Otro papel adicional de las fenestraciones podría ser el facilitar las adhesiones del omentum al peritoneo dañado o inflamado.

El área adiposa está compuesta principalmente por adipocitos inmersos en un tejido conectivo vascularizado; esta región está recubierta por una monocapa de células mesoteliales asentadas sobre una membrana basal, interrumpida por los cuerpos lechosos (Wilkosz y col., 2005). Independientemente de su localización, las células mesoteliales de la región translúcida así como de la adiposa, muestran las características típicas de células mesoteliales (Madison y col., 1979; Predescu y col., 2004).

Como se ha mencionado anteriormente, parte de la capacidad del omentum para la reparación de tejidos es debida a sus propiedades angiogénicas (Goldsmith y Steward, 1984), y neurotróficas (Chamorro y col., 1993). Sin embargo, se desconoce el mecanismo exacto, celular o molecular, responsable de la capacidad angiogénica del omentum. Se ha sugerido que los factores de crecimiento presentes en grandes cantidades en el omentum, como el factor de crecimiento para fibroblastos (FGF) (Chamorro y col., 1993) y el factor de crecimiento para el endotelio vascular (VEGF) (Zhang y col., 1997; Mandl-Weber y col., 2002) contribuirían al desarrollo del proceso angiogénico. Sin embargo, el papel de

las células mesoteliales no se ha determinado en ninguno de estos estudios, y se desconoce en que medida estas células contribuyen al éxito de los implantes de omentum. Podrían participar a través de la secreción de factores de crecimiento o mediante su incorporación al tejido reparado (Herrick y Mutsaers, 2004).

## **CELULAS MESOTELIALES**

El mesotelio une las cavidades peritoneal, pleural y pericárdica, con las superficies parietal y visceral respectivas que recubren los órganos internos y la pared corporal. El mesotelio está compuesto por una monocapa de células de tipo epitelial, apoyadas sobre una fina membrana basal, por encima de un tejido conectivo subseroso que contiene vasos sanguíneos, vasos linfáticos, células inflamatorias y células con morfología de fibroblastos (Wang, 1974; Ishihara y col., 1980). Tradicionalmente, se ha pensado que la función de la capa mesotelial consiste en proveer una superficie protectora, no adherente, para facilitar los movimientos viscerales. Actualmente, está reconocida como una membrana celular dinámica con varias funciones fisiológicas, como el transporte de fluidos y solutos, la vigilancia inmunológica y la producción de moléculas de la matriz extracelular, proteasas, citoquinas y factores de crecimiento. El mesotelio se encuentra bañado por un fluido seroso, parecido a un ultrafiltrado de plasma, y contiene proteínas sanguíneas, células inflamatorias, azúcares y varias enzimas, incluyendo amilasa y lactato deshidrogenasa (Dondelinger y col., 2000).

La reparación del tejido seroso implica la proliferación de células mesoteliales desde lugares distantes de la lesión, sugiriendo una activación difundida por el mesotelio en respuesta a mediadores o células liberadas en el fluido seroso, o mediante la comunicación intercelular (Mutsaers y col., 1997b; Mutsaers y col., 2002). La proliferación local de las células residentes que rodean una lesión es una de las fuentes para su reparación. Estudios recientes sugieren que, en la reparación de diferentes órganos en el organismo adulto, también intervienen células madre, generando un gran interés en la ingeniería tisular y celular (Bianco y Robey, 2001; Goodell, 2001; Tuan y col., 2003). Aunque todavía no han sido identificadas células madre mesoteliales, existen algunas evidencias que indican que deben existir células mesoteliales progenitoras (Herrick y Mutsaers, 2004).

Bichart, en 1827 (revisión por Whitaker y col., 1982a), fue el primero en observar que las cavidades serosas estaban unidas por una capa de células alargadas parecidas a las

de los vasos linfáticos. Minot (1883) propuso el término “mesotelio”, después de un detallado estudio de su origen embriológico que mostró esta capa como la unión epitelial de las cavidades mesodérmicas en los mamíferos. Las células mesoteliales son de origen mesodérmico, pero presentan características de células epiteliales y mesenquimales (Whitaker y col., 1992). Morfológicamente, las células mesoteliales, por lo general, son consideradas similares en las diferentes localizaciones serosas del cuerpo, así como en las diferentes especies de mamíferos (Baradi y Rao, 1976; Whitaker y col., 1980; Withaker y col., 1982a, b).

Las células mesoteliales poseen muchas características de células epiteliales, como son la forma poligonal, la presencia de filamentos intermedios de citoqueratinas (citoqueratinas 6, 8, 18, y 19) (Czernobilski y col., 1985), y la habilidad de secretar una membrana basal, pero también muestran características de células mesenquimales como la presencia de vimentina, desmina y, bajo estimulación,  $\alpha$ -actina de músculo liso (Afify y col., 2002). El análisis ultraestructural de células mesoteliales polarizadas demuestra complejos de unión intercelulares bien desarrollados, incluyendo las uniones estrechas (zonula occludens), uniones de adherencia, uniones gap y desmosomas (Pelin y col., 1994). También expresan E, N y P-cadherinas, pero al contrario que el en epitelio, la N-cadherina es la predominante (Simsir y col., 1999).

Aunque la apariencia de las células mesoteliales es principalmente escamosa, también son cuboidales en varias localizaciones del cuerpo como en los septos del mediastino pleural, en órganos como el hígado y el bazo, y en los cuerpos lechosos del omentum (Wang, 1998). Ultraestructuralmente, estas dos morfologías poseen algunas diferencias. En particular las células cuboidales poseen abundantes mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso, un aparato de Golgi bien desarrollado, microtúbulos y un gran número de microfilamentos, sugiriendo un estado metabólico más activo (Fukata, 1963; Kluge y Hovig, 1967).

### **Funciones de las células mesoteliales**

La capa mesotelial, a parte de actuar como una superficie epitelial antiadherente, posee otras muchas funciones importantes para el mantenimiento de la homeostasis serosa. Entre estas funciones se encuentran el transporte de fluidos y partículas a través de las cavidades serosas, la regulación de la migración de leucocitos en respuesta a mediadores inflamatorios, la síntesis de citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento y moléculas de la matriz extracelular, el control de la coagulación y la fibrinólisis, y la

presentación antigénica. Estas funciones normalmente se encuentran asociadas al estado fenotípico de la célula. Las células escamosas se encuentran asociadas al transporte a través de la membrana, mientras que las células cuboidales poseen un espectro de funciones más amplio (Ramsey y col., 1970; Whitaker y col., 1980; Whitaker y col., 1982a, b). Las células mesoteliales secretan glicosaminoglicanos, para proporcionar una superficie antiadherente que protege a la superficie serosa de abrasiones, infecciones y, posiblemente, de las diseminaciones tumorales (Liang y Sasaki, 2000; Bellingan y col., 2002), además producen multitud de citoquinas y factores de crecimiento que pueden regular respuestas inflamatorias y estimular la reparación de tejidos. Estímulos como productos bacterianos, asbestos, o lesiones en tejidos inducen la liberación de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas como las interleuquinas (IL), IL-1, IL-8, la proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1), e interferon  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) entre otras (Mutsaers, 2002).

Las células mesoteliales secretan factores de crecimiento que promueven la proliferación, la diferenciación y la migración de células mesoteliales y submesoteliales cerca de la zona lesionada, como el factor de crecimiento de transformación  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el FGF, el factor de crecimiento para hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento para queratinocitos (KGF), y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Martin y col., 1992; Mutsaers y col., 1997a; Jayne y col., 2000; Warn y col., 2001). También poseen la capacidad de sintetizar una gran variedad de macromoléculas de la matriz extracelular *in vitro*, así como colágena de tipo I, III y IV, elastina, fibronectina y laminina, además de producir metaloproteasas de la matriz (MMP) e inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP) (Marshall y col., 1993).

### **Reparación por medio de las células mesoteliales**

Hertzler, en 1919, fue el primero en observar como las lesiones en el peritoneo, ya fuesen grandes o pequeñas, tardaban el mismo tiempo en curarse. Concluyó que el mesotelio no se regeneraba sólo por la proliferación y migración centrípeta de las células al borde de la lesión como ocurría en el epitelio. Desde entonces, varios estudios han sido realizados para intentar esclarecer los mecanismos que regulan este proceso de regeneración utilizando numerosos modelos experimentales.

Está asumido que el proceso de regeneración comienza unas 24 horas después de la lesión, con la aparición de una población de células redondeadas en la superficie de la herida, predominantemente neutrófilos y macrófagos (Mutsaers y col., 2002). Las células

mesoteliales de los bordes de la herida comienzan a dividirse y la capa epitelial temporalmente se transforma en células con morfología fibroblástica que migran a la zona abierta de la herida (Whitaker y Papadimitriou, 1985; Mutsaers y col., 2000). Mutsaers y colaboradores (1997b) demostraron que los factores de proliferación y quimiotácticos como el HGF jugaban un papel importante estimulando este proceso regenerativo. En condiciones normales el mesotelio posee una baja capacidad de renovación, sin embargo puede ser estimulado con una gran variedad de compuestos o mediante un daño físico, produciéndose numerosas divisiones celulares.

Independientemente del tamaño del área lesionada o del tipo de lesión, la reparación serosa es completa a los 7-8 días tras la lesión, cuando la herida está cubierta de células que poseen características de células mesoteliales (Mutsaers y col., 2002). Basado en esta evidencia, varios grupos de investigación han propuesto fuentes adicionales para la regeneración de las células mesoteliales, como la transformación a partir de macrófagos (Eskeland y Kjaerheim, 1966; Ryan y col., 1973), la exfoliación de superficies adyacentes a superficies serosas para la obtención de células mesoteliales proliferativas o maduras (Whitaker y Papadimitriou, 1985; Mutsaers y col., 2000), células progenitoras presentes en el líquido seroso que se implantarían en la herida como precursores mesoteliales (Ryan y col., 1973), precursores mesenquimales subserosos que se diferenciarían en células mesoteliales y migrarían a la superficie de la lesión (Raftery, 1973; Davila y Crouch, 1993), y células precursoras circulantes procedentes de la médula ósea (Wagner y col., 1982).

### **Potencial de las células mesoteliales en la ingeniería de tejidos**

Aunque existe un vacío de información sobre el potencial de diferenciación de las células mesoteliales, durante los últimos cien años estas células han sido utilizadas para reparar tejidos y órganos dañados. Actualmente, también existen nuevas aplicaciones de estas células en procesos de ingeniería tisular como los implantes vasculares (Herrick y Mutsaers, 2004). A pesar de los numerosos estudios, todavía no se han desarrollado implantes sintéticos o biológicos ideales para sustituir arterias de pequeño calibre (Nerem y Seliktar, 2001). Cuando se han utilizado prótesis acelulares para la reconstrucción de vasos de pequeño calibre, han fracasado frecuentemente debido a que la superficie luminal es trombogénica, generando un trombo y una reoclusión del vaso tras el implante. Recubriendo la superficie luminal con células se reducía su trombogenicidad, pero esta

solución se encuentra limitada debido a la dificultad de conseguir células endoteliales autólogas, habiéndose propuesto tipos celulares alternativos con este fin.

Desde hace tiempo se sabe que introduciendo objetos en la cavidad peritoneal de la rata, el conejo o el ratón, se inicia una respuesta inflamatoria formando un tejido granuloso recubierto por una capa de mesotelio (Ryan y col., 1973; Campbell y Ryan, 1983). Basado en las propiedades fibrinolíticas y antitrombogénicas de las células mesoteliales (Louagie y col., 1986), Clarke y colaboradores (1984) propusieron que las células mesoteliales autólogas eran una buena alternativa a las células endoteliales en los implantes vasculares. A partir de entonces, varios grupos han investigado la eficacia de las células mesoteliales, normalmente procedentes del omentum, como sustitutas de las células endoteliales (Bull y col., 1988; Theuer y col., 1996; Sparks y col., 2002). De momento, el uso de células mesoteliales como sustitutas de células endoteliales continúa siendo una posibilidad que se muestra atractiva, por ejemplo, en el desarrollo de implantes de by-pass autólogos en la arteria coronaria, o en el acceso a fistulas arteriovenosas en pacientes en hemodiálisis (Herrick y Mutsaers, 2004).

## **CELULAS DE LA CAPA SUBSEROSA**

Una de las teorías sobre el origen de las células mesoteliales regenerativas propone que estas células provienen de células mesenquimales pluripotenciales de la capa subserosa que, mediante un estímulo adecuado, comienzan a diferenciarse a células mesoteliales cuando migran a un tejido lesionado. Muchos grupos han descrito la presencia de células con características de células epiteliales en la capa subserosa en biopsias de pacientes con diversas patologías (Bolen y col., 1986; Davila y Crouch, 1993), así como en varios modelos animales de experimentación (Buoro y col., 1993; Pampinella y col., 1996). Estos resultados han sido explicados por la teoría de que existe una población celular subserosa multipotencial, con habilidad para diferenciarse en cualquiera de las dos direcciones, células mesenquimales o células mesoteliales.

Actualmente, a partir de los resultados obtenidos por varios grupos, se podría confirmar la existencia de células mesenquimales subserosas pluripotenciales que podrían diferenciarse a miofibroblastos, y posiblemente a células de músculo liso o células mesoteliales; también existen nuevas evidencias que indicarían que las células mesoteliales pueden ser pluripotenciales y poseer la capacidad de diferenciarse a varios tipos celulares (Herrick y Mutsaers, 2004). Sin embargo, existen estudios que cuestionan el papel de las

células subserosas en la regeneración mesotelial (Whitaker y Papadimitriou, 1985; Mutsaers y col., 2000).

## TRANSICION EPITELIO-MESENQUIMA

Tradicionalmente, las células mesoteliales aisladas de tejidos o fluidos serosos normales poseen *in vitro* una morfología epitelial de empedrado. Sin embargo, desde hace tiempo se sabe que estas células cambian a un fenotipo fibroblástico tras varios subcultivos, reduciendo la expresión de citoqueratinas e incrementando la expresión de vimentina (Mackay y col., 1990).

Varias situaciones patológicas, como la cirrosis, la endometriosis o la inflamación serosa, producen secreciones con un gran número de células mesoteliales que probablemente procedan de la serosa irritada. *In vitro*, estas células poseen ambas morfologías, fibroblástica y epitelial, y son estables durante los primeros subcultivos (Gulyas y col., 1999). Se ha sugerido que estas dos morfologías de las células mesoteliales se deben a diferentes estados de diferenciación, y que en condiciones patológicas, los factores inflamatorios y otros mediadores dirigen las células hacia uno u otro fenotipo.

Whitaker y colaboradores (1992) sugirieron que células mesoteliales maduras podrían transformarse en células fibroblásticas *in vivo* e invadir el tejido conectivo subseroso. Esta hipótesis era inusual ya que a diferencia de las células mesenquimales del estroma, no es frecuente que las células con morfología epitelial se transformen en fibroblastos en el tejido maduro, excepto durante la regeneración de lesiones o en la progresión tumoral (Hay, 1995). Dos estudios en pacientes sometidos a diálisis peritoneal ambulatoria apoyarían este concepto:

En el primero, Yang y colaboradores (2003) demostraron que el TGF- $\beta$ 1 inducía a las células mesoteliales del omentum a transdiferenciarse en miofibroblastos *in vitro*; de esta manera los autores propusieron que las células maduras del mesotelio convertidas en miofibroblastos y los estados patológicos observados durante la diálisis peritoneal podrían ser debidos al reclutamiento de células fibrogénicas del mesotelio durante la inflamación serosa y la reparación de las lesiones.

En el segundo estudio, Yánez-Mo y colaboradores (2003) también demostraron que existían células mesoteliales humanas que experimentaban una transformación de fenotipo de célula epitelial a célula mesenquimal tras una lesión serosa en pacientes; de hecho, las biopsias realizadas a pacientes en diálisis peritoneal mostraban la presencia de

marcadores mesoteliales en células fibroblásticas que se encontraban en la capa subserosa, sugiriendo que estas células provenían de una conversión de las células mesoteliales locales, lo que cuestionaría la teoría de una capa subserosa multipotencial (Raftery y col., 1973; Bolen y col., 1986). Los autores describieron esta transformación fenotípica como “transdiferenciación”. Todavía no se sabe si estas células mesoteliales permanecen como miofibroblastos, si continúan hasta diferenciarse en células del músculo liso o si revierten a células mesoteliales de la superficie. De todas formas, tampoco se ha esclarecido del todo si las células mesoteliales que se transdiferencian son una población de células residentes en la capa mesotelial, si son una subpoblación originada en el fluido seroso, o son de origen sanguíneo procedentes del sistema circulatorio (Herrick y Mutsaers, 2004). Resulta interesante la posibilidad planteada de que la transdiferenciación sea la causa, o en parte la responsable, de los cambios patológicos observados en la capa serosa después de un trauma generado por la diálisis peritoneal, las irradiaciones, o la cirugía.

## **CELULAS FIBROBLASTICAS**

Los fibroblastos son las células más abundantes en el tejido conectivo y forman el estroma de diversos tejidos. Hasta ahora se sabía que los fibroblastos de los tejidos son una población muy heterogénea de células que, dependiendo del sitio y características fenotípicas, desempeñan papeles muy diversos en procesos fisiológicos y patológicos. No existe una nomenclatura formal para definir los subfenotipos de fibroblastos (Trelstad y Birk, 1985), de manera que una pregunta importante es ¿qué es un fibroblasto? Ultraestructuralmente, los fibroblastos son identificados en base a su morfología fusiforme (Takahashi-Iwanaga., 1994). Poseen un retículo endoplásmico y aparato de Golgi prominente, característicos de células con una gran actividad biosintética; aunque los fibroblastos han sido bastante estudiados *in vitro*, la información sobre su diferenciación *in vivo* es escasa (Sappino y col., 1990).

Los fibroblastos sintetizan componentes de la matriz extracelular como colágena y mucopolisacáridos, además de MMPs y varios factores de crecimiento, por lo que desempeñan un papel importante en mecanismos fisiológicos y patológicos. El origen de los fibroblastos ha sido siempre motivo de controversia; en principio proceden de células primitivas mesenquimales y pluripotenciales, de manera que las células del estroma, potencialmente, se pueden transformar en fibroblastos, osteoblastos, adipocitos,

condrocitos y células musculares (Jiménez y Martínez, 1992). Recientemente, se ha postulado que estas células pueden originarse de (Darby y Hewitson, 2007):

Células epiteliales que adquieren el fenotipo de fibroblastos por la transición epitelio-mesénquima como se mencionó anteriormente.

Precusores circulantes como son los fibrocitos, que fueron identificados y definidos por primera vez por Bucala y colaboradores en 1994, son células con características de células mesenquimales que proceden de la médula ósea y se localizan en la circulación periférica.

Poblaciones de células residentes. Estudios de microscopía electrónica han demostrado que en varios órganos existen poblaciones de células fibroblásticas que proliferan rápidamente en respuesta a una lesión. La proliferación y migración local desde tejidos adyacentes, en particular de la región perivascular, es el mecanismo generalmente aceptado mediante el cual crece el número de fibroblastos en tejidos (Wiggins y col., 1993).

Con el desarrollo del estudio de las células troncales o células madre ha surgido una gran cantidad de información, tanto de su biología en términos de su capacidad de proliferación y diferenciación, como en el aspecto de su uso potencial en terapia celular y medicina regenerativa, siendo la médula ósea el mejor ejemplo (Mayani, 2003). Toda esta información ha favorecido el desarrollo de nuevos conceptos y la reconsideración de conceptos clásicos (Mayani, 2003), generándose la necesidad de replantear la participación de los fibroblastos en procesos fisiológicos o regenerativos, así como en procesos patológicos, incrementándose la evidencia de que los fibroblastos de los diferentes tejidos pueden tener su origen en la médula ósea (células troncales mesenquimales y/o células troncales hematopoyéticas) (Hashimoto y col., 2004; Postlethwaite y col., 2004; Ebihara y col., 2006).

Durante la cicatrización de heridas, tradicionalmente se observó que los fibroblastos cercanos al área lesionada migraban y proliferaban, pero actualmente se piensa que también podrían provenir de otras localizaciones del organismo. También es importante recordar que en los casos de cicatrización, algunos fibroblastos incluyen miofibrillas, denominándose entonces miofibroblastos, dado que adquieren cierta similitud con las células musculares. Algunas evidencias sugieren que los miofibroblastos tienen la capacidad de contraerse, y así desempeñar un papel en la contracción de la herida (Darby y Hewitson, 2007).

## **NEOVASCULARIZACION**

El correcto funcionamiento de los tejidos del organismo requiere un aporte de sangre suficiente, a través de un sistema organizado de arterias, capilares y venas. La formación de los vasos sanguíneos es un proceso complejo que implica la interacción perfectamente coordinada de múltiples tipos celulares, jugando un papel decisivo en el desarrollo embrionario y en el periodo postnatal temprano. En etapas posteriores, continúa existiendo formación de nuevos vasos sanguíneos, como por ejemplo en el ciclo ovárico, o en la reparación de tejidos dañados.

El término angiogénesis no abarca todo el espectro de acontecimientos que conllevan al desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, de manera que referiremos como neovascularización al desarrollo de nuevos vasos sanguíneos en general. La neovascularización es el resultado de varios procesos, incluyendo vasculogénesis, arteriogénesis, y angiogénesis (Simons, 2005).

### **VASCULOGENESIS**

Vasculogénesis es la formación de los primeros vasos sanguíneos durante la embriogénesis. Empieza con la agrupación en islotes sanguíneos de angioblastos derivados del mesodermo; las células de la parte central de estos islotes sanguíneos se diferencian a células precursoras hematopoyéticas, mientras que las células más externas dan lugar a células endoteliales. A continuación, las células endoteliales maduras forman una serie de tubos endoteliales componiendo una red vascular que va aumentando en complejidad mediante un proceso angiogénico (cell sprouting) (Risau, 1997). Existen evidencias de que el proceso de vasculogénesis puede ocurrir en el adulto, mediado por las células progenitoras endoteliales (Urbich y Dimmeler, 2004).

### **ARTERIOGENESIS**

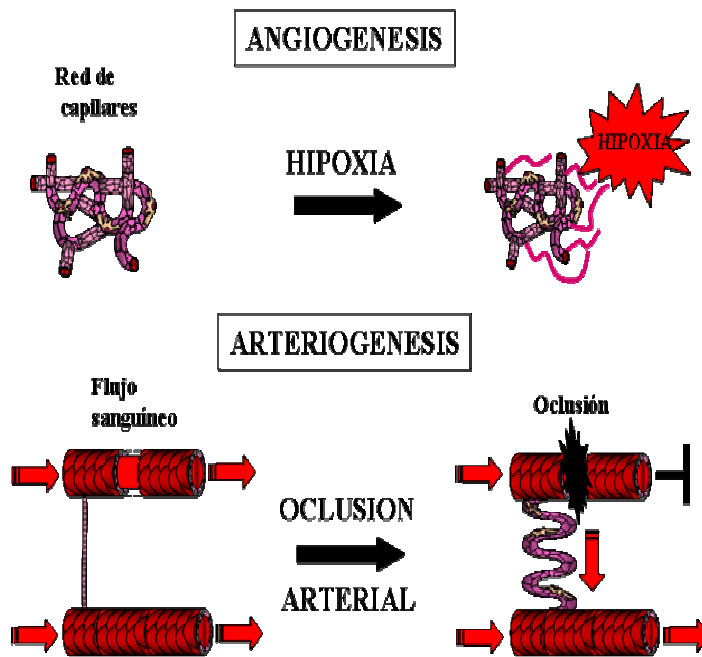
Arteriogénesis se denomina al proceso de maduración y posible formación de nuevos conductos colaterales (de Muinck y Simons, 2004). La arteriogénesis se produce normalmente en zonas con estenosis arterial, donde existe un cambio local en las fuerzas de cizallamiento, inducido por la acumulación de células mononucleares sanguíneas.

En 1669, el anatomista Lower demostró la existencia de colaterales anastomosadas en el corazón humano. En 1953, el cirujano inglés Longland, describió las arterias colaterales en la circulación de la pierna, definiendo las arterias colaterales como vasos que interconectaban diferentes zonas de perfusión. Estas arterias colaterales funcionales crecen y proliferan a partir de ramas arteriales preexistentes, mostrando un típico fenotipo tortuoso. De esta manera, el crecimiento de las arterias colaterales, a diferencia de la angiogénesis y la vasculogénesis, no es una forma de crecimiento *de novo*, sino que consiste en la remodelación de un vaso pequeño preexistente, para dar un vaso mayor, con los cambios correspondientes en su estructura; este vaso de mayor calibre podría resistir el aumento de las fuerzas de presión debidas a un incremento en la perfusión (Fig.2).

Aunque estudios previos han mostrado como una buena circulación colateral disminuye los riesgos de infarto de miocardio y de muerte por una oclusión completa de la arteria coronaria, en la mayoría de los casos este sistema no es suficiente (Hoefler y col., 2006). Esto es debido a que el rango de oclusión de la arteria suele ser mayor que la arteriogénesis que se produce. Actualmente, un área de gran interés clínico es la estimulación y aceleración de la arteriogénesis, la cual podría ayudar a proteger los tejidos sometidos a una isquemia severa, cuando la arteria principal se encuentra ocluida.

## **ANGIOGENESIS**

El término angiogénesis fue acuñado por el cirujano británico John Hunter en 1787, para describir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Tras casi doscientos años en los que la angiogénesis fue escasamente investigada, el doctor Judah Folkman en 1971 propuso la hipótesis de que el crecimiento tumoral era angiogénesis dependiente. Desde este momento las publicaciones científicas sobre la angiogénesis han aumentado de manera logarítmica (Gupta y Zhang, 2005). Actualmente, la angiogénesis se define como la formación de nuevos capilares sanguíneos a partir de otros preexistentes (Carmeliet, 2003). En adultos este proceso puede ser activado en tejidos sometidos a hipoxia, mediante la expresión del factor inducido por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ). El HIF-1 $\alpha$  activa la transcripción de numerosos genes, incluyendo entre ellos el VEGF y sus receptores (Pugh y Ratcliffe, 2003).



**Figura 2.** Se pueden observar dos formas de crecimiento vascular después del nacimiento: angiogénesis y arteriogénesis. Estos dos procesos comparten varios mecanismos, como la invasión leucocitaria, producción de factores de crecimiento, y expresión de citoquinas. Pero también existen diferencias básicas importantes en los factores implicados en estos dos procesos, así como en su resultado final. Mientras que la angiogénesis normalmente se produce en tejidos isquémicos o hipóxicos, la arteriogénesis puede observarse también en zonas alejadas del tejido isquémico, hasta 50cm. Los dos procesos pueden ocurrir conjuntamente, por ejemplo, en las enfermedades arteriales periféricas, donde se observa angiogénesis en el pie mientras la arteriogénesis ocurre en la pierna.

### El proceso angiogénico

La formación de un nuevo vaso (Fig.3) supone la activación de células endoteliales quiescentes, la degradación de la membrana basal y la matriz extracelular, la migración y la proliferación de células endoteliales, la formación de redes vasculares y la anastomosis entre ellas que permita establecer el flujo sanguíneo. Estos pasos están controlados mediante señales intracelulares y extracelulares que están perfectamente coordinadas en el tiempo y en el espacio, como se describe a continuación.

En primer lugar, el tejido dañado produce y libera factores de crecimiento que difunden a los tejidos vecinos. Estos factores de crecimiento angiogénicos se unen a receptores específicos, localizados en las células endoteliales de vasos sanguíneos cercanos. Cuando los factores de crecimiento se unen a sus receptores, las células endoteliales se activan y liberan distintas moléculas enzimáticas, como MMP y endopeptidasas extracelulares, las cuales no se expresan de forma constitutiva sino que se inducen de forma temporal, en respuesta a señales exógenas como citoquinas, factores de crecimiento o interacciones entre la célula y la matriz extracelular. Dichas enzimas provocan pequeños orificios en la membrana basal que rodea a los vasos preexistentes, aumentando la permeabilidad y permitiendo la extravasación hacia la matriz de proteínas plasmáticas como fibrinógeno y protrombina, así como de las células endoteliales que comienzan a dividirse, proliferar y migrar a través de los orificios de los vasos hacia el

tejido dañado. La destrucción del estroma circundante es esencial para permitir la proliferación y agrupación de las células endoteliales para formar el nuevo vaso. Las MMP poseen la capacidad de degradar la matriz extracelular, facilitando el movimiento y proliferación celular a través del estroma, y la liberación de factores proangiogénicos que, en condiciones normales, se encontrarían secuestrados por la matriz extracelular.

El movimiento y agrupación de las células es mediado por las interacciones de las integrinas con la matriz extracelular. Estas integrinas incluyen la  $\alpha\beta3$  que se expresa en bajos niveles de forma constitutiva en los vasos, pero es estimulada en la superficie de las células endoteliales por el VEGF. La interacción entre el VEGF y  $\alpha\beta3$  activa una vía de señalización calcio-dependiente que promueve la migración celular. Las células endoteliales se agrupan en forma de tubo para crear el nuevo vaso y se producen anastomosis entre los distintos vasos individuales, permitiendo la circulación sanguínea entre ellos. El proceso angiogénico termina con la maduración de los vasos neoformados, donde tienen un papel fundamental los pericitos. Los pericitos son células perivasculares de origen mesenquimal. Interaccionan con las células endoteliales facilitando la unión de las células en forma de tubo, así como la remodelación y estabilización del lecho vascular recién formado. En este último proceso intervienen el PDGF y las angiopoyetinas (Gerwins y col., 2000; Jain, 2003).

Existen condiciones fisiológicas en las que se produce un aumento de la angiogénesis, como en el ciclo menstrual de la mujer, la hipertrofia del tejido muscular tras ejercicio intenso, la regeneración nerviosa y ósea y el proceso normal de cicatrización de las heridas. Asimismo, la angiogénesis está implicada en el desarrollo de diferentes procesos patológicos (enfermedades angiogénesis dependientes) de distinta índole, incluyendo, enfermedades cardiovasculares, malformaciones vasculares, arteriosclerosis, artritis reumatoide, crecimiento tumoral, retinopatía diabética y psoriasis.

El cambio hacia el fenotipo angiogénico en un determinado tejido depende del balance local entre factores estimulantes e inhibidores de la angiogénesis. Para conseguir el estímulo angiogénico se requiere no sólo la regulación positiva de factores angiogénicos, sino también la negativa de los inhibidores de la angiogénesis.

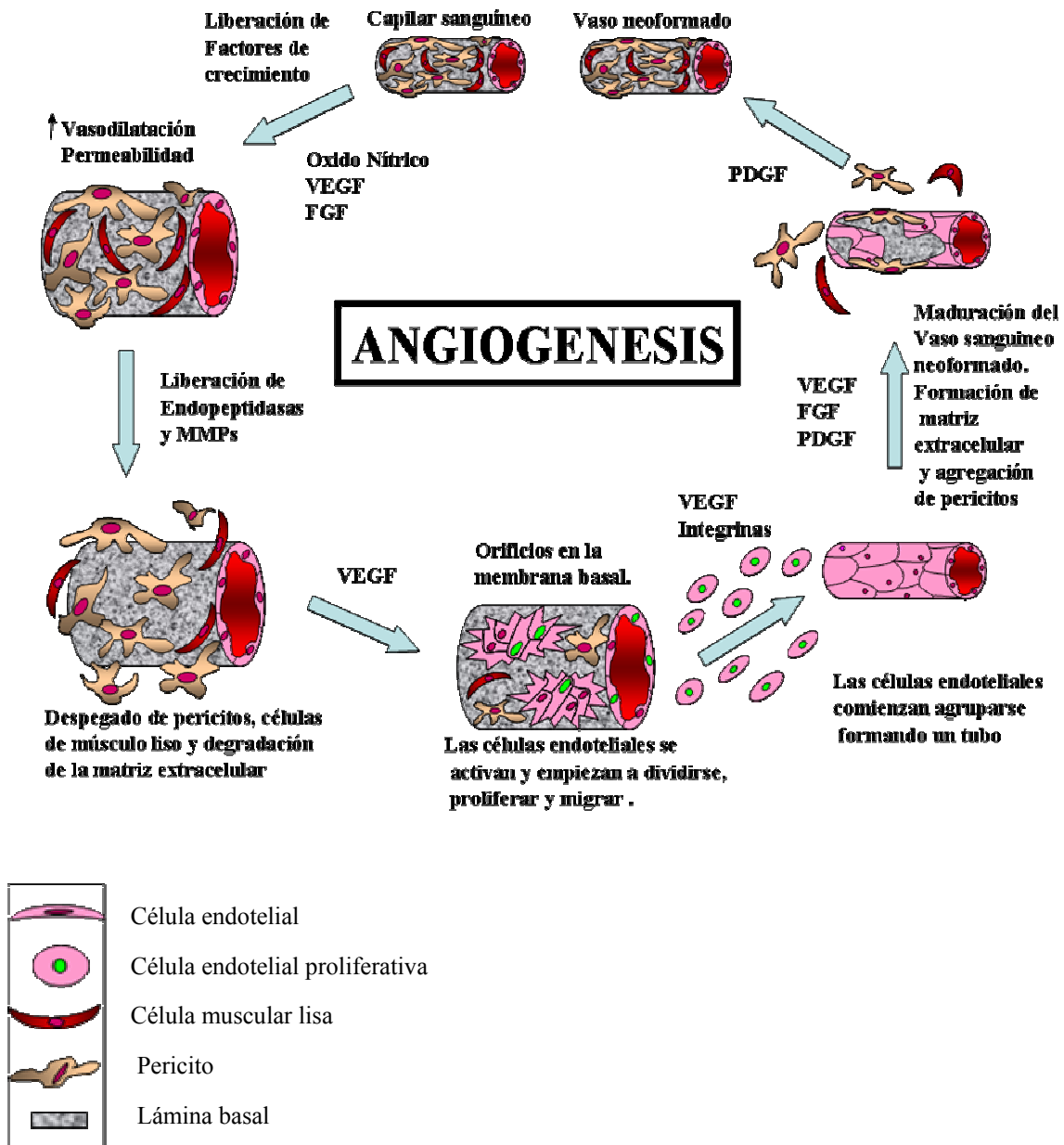


Figura 3. Esquema del proceso angiogénico.

## ENFERMEDADES ANGIOGENESIS DEPENDIENTES

En todo proceso biológico la angiogénesis está regulada por una serie de moléculas intra y extracelulares que tienen acción estimuladora o inhibidora sobre la angiogénesis, las cuales coordinadas entre sí, permiten un equilibrio perfecto. La lista de factores estimuladores e inhibidores es muy extensa (Tab.1).

Como se ha mencionado anteriormente, existen procesos patológicos en los que este balance perfecto se inclina hacia alguno de los dos sentidos, dando lugar a una angiogénesis exagerada o insuficiente (Folkman, 2001).

En 1994, la Angiogenesis Foundation ([www.angio.org](http://www.angio.org)) definió la angiogénesis como el “factor denominador” de las enfermedades más importantes que afectan a la población.

### ***Factores estimuladores e inhibidores de la angiogénesis***

<b>ESTIMULADORES</b>	<b>INHIBIDORES</b>
<u>Factores de crecimiento</u>	<u>Péptidos proteolíticos</u>
<i>VEGF (factor de crecimiento para el endotelio vascular)</i>	<i>Angiostatina</i>
<i>FGF (factor de crecimiento para fibroblastos)</i>	<i>Endostatina</i>
<i>PLGF (factor de crecimiento placentario)</i>	<u>Inhibidores enzimáticos</u>
<i>PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas)</i>	<i>TIMP (inhibidores de metaloproteasas)</i>
<i>TGF-<math>\alpha</math> (factor de transformación <math>\alpha</math>)</i>	<i>Inhibidores de la activación de plasminógeno</i>
<i>TGF-<math>\beta</math> (factor de transformación <math>\beta</math>)</i>	<u>Citoquinas</u>
<i>HGF (factor de crecimiento de hepatocitos)</i>	<i>Interferon</i>
<u>Citoquinas</u>	<i>IL-12 (interleuquina 12)</i>
<i>MCP-1 (proteína-1 atrayente de monocitos)</i>	<u>Quimioquinas</u>
<u>Quimioquinas</u>	<i>PF-4 (Factor plaquetario 4)</i>
<i>IL-8 (interleuquina 8)</i>	<u>Moléculas de matriz extracelular</u>
<u>Hormonas</u>	<i>Trombospondina</i>
<i>Estrógenos</i>	<u>Hormonas</u>
<i>Prostaglandinas E1 y E2</i>	<i>2-ME (2-metoxiestradiol)</i>
<u>Factores de crecimiento hematopoyéticos</u>	
<i>Eritropoyetina</i>	

**Tabla 1.** Factores estimuladores e inhibidores que intervienen en la angiogénesis.

### Enfermedades asociadas a un exceso de angiogénesis

Cuando el tejido dañado produce cantidades anormales de factores angiogénicos, se solapa la acción de los inhibidores endógenos, dando lugar a la formación de nuevos vasos que nutren el tejido enfermo, destruyen el tejido normal y en ocasiones, como ocurre en el caso de los tumores, permiten la diseminación del mismo a otras partes del organismo (metástasis).

La angiogénesis exacerbada se asocia a diferentes enfermedades como: cáncer, retinopatía diabética, degeneración macular senil, artritis reumatoide, complicaciones del síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA), psoriasis y otras enfermedades cutáneas (Folkman, 2001) (Fig.4).

### Enfermedades asociadas a una insuficiente angiogénesis

Cuando el tejido no puede producir cantidades adecuadas de factores angiogénicos, da lugar a una formación inadecuada de vasos, con una circulación, aporte de nutrientes y oxígeno insuficientes, lo que supone un riesgo de muerte celular. Dichas circunstancias ocurren en el infarto, enfermedades cardíacas y vasculares periféricas, infertilidad, escleroderma, úlceras y retraso de la cicatrización (Fig.4).



**Figura 4.** Enfermedades angiogénesis dependientes.

## FACTORES DE CRECIMIENTO

### LA FAMILIA DEL VEGF

El VEGF, a veces conocido como VEGF-A o factor de permeabilidad vascular (Ferrara y Henzel, 1989; Senger y col., 1983), es el miembro mejor estudiado de la familia de ligandos VEGF (Achen y Stacker, 1998; Ferrara, 2001). Estas proteínas forman parte de la familia de factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF) (Ferrara y col., 2003), un grupo de proteínas que comparten una estructura similar, con entrecruzamientos intermoleculares e intramoleculares por puentes disulfuro para dar lugar a una estructura en

lazo inconfundible (Wiesmann y col., 1997). El VEGF es un ligando para los receptores denominados receptores del factor de crecimiento para el endotelio vascular, VEGFR-1 y VEGFR-2, también conocidos como Flt-1y KDR ó Flk-1 (Ferrara y col., 2003).

Hasta la fecha se han identificado siete miembros de la familia del VEGF. El VEGF, junto con el VEGF-B, el VEGF-E y el factor de crecimiento placentario (PLGF), preferentemente, aunque no de forma exclusiva, ejercen sus efectos sobre las células endoteliales vasculares, mientras que el VEGF-C y el VEGF-D actúan sobre las células endoteliales linfáticas (Shibuya, 2001). El VEGF, el VEGF-B y el VEGF-E están involucrados en la angiogénesis y el VEGF parece ser el factor más importante en este proceso. El VEGF-C y el VEGF-D están involucrados en la linfangiogénesis (Achen y Stacker 1998; Gerwins y col., 2000). El último miembro incorporado a la familia del VEGF es el svVEGF identificado en el veneno de serpientes.

El VEGF posee al menos nueve isoformas procedentes de un único gen por splicing alternativos: VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF162, VEGF165, VEGF165b, VEGF183, VEGF189, y VEGF206 (Bates y Harper, 2002). VEGF165b es un inhibidor endógeno del VEGF, que se une a VEGFR-2, con la misma afinidad que el VEGF165, pero sin activar la cascada de señalizaciones (Woolard y col., 2004). El VEGF es producido por una gran variedad de células, entre otras, células endoteliales, macrófagos, y células T activadas. Las cuatro isoformas principales son VEGF121, VEGF165, VEGF189 y VEGF206, de las cuales el VEGF165 es el predominante. Otras isoformas descritas como el VEGF145 y VEGF183 son menos frecuentes (Houck y col., 1992). Una diferencia importante entre las distintas isoformas es su afinidad por la heparina, lo que afecta a su unión a la superficie celular y a la matriz extracelular (Ferrara, 1999). El VEGF121 no se une a la heparina y por eso es una proteína soluble, mientras que el VEGF189 y el VEGF206 tienen una fuerte afinidad por la heparina y se mantienen unidos a la matriz extracelular (Houck y col., 1992; Park y col., 1993). El VEGF165 tiene una afinidad reducida por la heparina, por lo que una proporción significativa de la proteína permanece unida mientras que la mayor parte es soluble (Achen y Stacker, 1998; Ferrara, 2001). Las isoformas unidas a la matriz extracelular pueden ser liberadas lentamente por su exposición a heparina o heparinasas, o más rápidamente por la acción de plasmina que escinde la región C-terminal para producir un fragmento activo (Houck y col., 1992), o uroquinasa (Plouet y col., 1997). Por consiguiente, el VEGF se hace disponible para las células endoteliales a través de dos mecanismos diferentes: la secreción de isoformas solubles o la escisión proteolítica de isoformas unidas a la matriz extracelular.

### Regulación de la expresión del gen del VEGF

Mientras que las diferentes formas de unión y la escisión proteolítica de las isoformas más grandes del VEGF pueden contribuir a la regulación de su actividad, el principal mecanismo de regulación parece producirse a través de la inducción o la supresión de la expresión del gen del VEGF y a la estabilidad de su ARNm (Ferrara, 1999; Shibuya, 2001). La expresión del gen del VEGF está regulada por varios factores que incluyen la hipoxia, el pH, factores de crecimiento, la transformación celular, hormonas, óxido nítrico (NO), y oncogenes, siendo la hipoxia el factor mejor estudiado. La hipoxia estimula la expresión del gen del VEGF de forma similar a como se estimula la producción de eritropoyetina por la baja tensión de oxígeno (Fig.5). En condiciones de hipoxia, los factores de transcripción inducidos por hipoxia, HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ , son estabilizados y

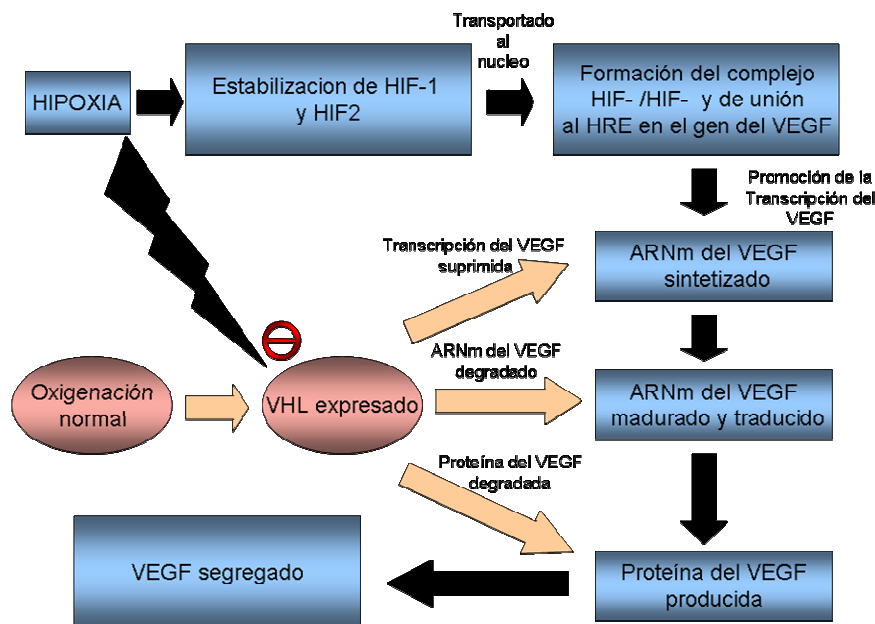


Figura 5. Estimulación de la expresión del gen del VEGF por la hipoxia.

transportados al núcleo, donde ejercen una interacción con HIF- $\beta$ . Este complejo se une entonces a una secuencia específica del gen del VEGF denominada elemento de respuesta a la hipoxia (HRE), que estimula la transcripción del gen del VEGF (Ikeda y col., 1995). La regulación de la expresión del VEGF por la tensión de oxígeno también puede implicar la inhibición del supresor tumoral, la proteína Von Hippel-Lindau (VHL), que parece suprimir la expresión del VEGF en condiciones normales de oxigenación. Se ha sugerido que la VHL también pueda actuar suprimiendo la transcripción del VEGF, o también después de la transcripción; es decir, está involucrado en la degradación del ARNm o de la proteína (Ikeda y col., 1995) (Fig.5). En las células en las que la VHL presenta una disfunción, tal como ocurre en la

enfermedad de Von Hippel-Lindau, se acumulan grandes concentraciones de VEGF como resultado de su sobreexpresión. Esto da lugar a tumores de células renales muy vascularizados, debido a la estimulación de la angiogénesis por el VEGF (Kaelin, 2003).

También se ha demostrado que varios factores de crecimiento, entre ellos el FGF (Frank y col., 1995), citoquinas y hormonas inducen la expresión del ARNm del VEGF y/o la producción de la proteína VEGF *in vitro* (Ferrara, 1999).

### **Receptores del VEGF**

Los sitios de unión del VEGF fueron identificados inicialmente en la superficie de las células endoteliales vasculares *in vitro* e *in vivo*. El VEGF se une a dos receptores tirosin quinasa (RTKs), el VEGFR-1 y el VEGFR-2; ambos poseen 7 dominios extracelulares tipo inmunoglobulina (Ig), una región transmembrana y un dominio intracelular que tiene actividad tirosin quinasa (Shibuya y col., 1990; Terman y col., 1991). El VEGFR-3 es un miembro de la misma familia de RTKs, pero no es un receptor para VEGF sino para VEGF-C y VEGF-D (Karkkainen y col., 2002). Además de estos RTKs, el VEGF interacciona con una familia de correceptores, las neuropilinas.

El VEGFR-1, también denominado Flt-1, fue el primer receptor RTK identificado como receptor del VEGF hace más de una década (de Vries y col., 1992). La función precisa de esta molécula sigue debatiéndose, aunque las últimas evidencias indican que la existencia de diferentes hipótesis planteadas sobre su función, puede ser debida, al menos en parte, al hecho de que las propiedades de señalización de este receptor pueden diferir dependiendo del momento de desarrollo del animal y del tipo celular. La expresión del VEGFR-1 está estimulada por la hipoxia, mediante el factor de transcripción HIF-1 (Gerber y col., 1997). Al VEGFR-1 se une el PLGF (Park y col., 1994) y el VEGF-B (Olofsson y col., 1998), los cuales no se unen al VEGFR-2, también se une el VEGF con mayor afinidad que al VEGFR-2 (de Vries y col., 1992). El VEGFR-1, sin embargo, tiene sólo una débil actividad tirosin quinasa. Esto, junto con los datos que indican que se pueden demostrar actividades mitogénicas y quimiotácticas del VEGF en células que sólo expresan el VEGFR-2 pero no en células que expresan sólo el VEGFR-1 (Waltenberger y col., 1994), sugiere que el VEGFR-1 no está directamente implicado en mediar estos efectos del VEGF. El VEGFR-1 parece actuar como un receptor señuelo que regula negativamente los efectos del VEGF sobre el VEGFR-2 (Park y col., 1994). Secuestrando al VEGF, el VEGFR-1 reduce el VEGF disponible para unirse al VEGFR-2. Sin embargo, hay pruebas que sugieren que el VEGFR-1 es mediador de la migración de macrófagos

inducida por el VEGF y de la supresión de la maduración de células dendríticas (Claus y col., 1990; Gabilovich y col., 1996). Así que el VEGFR-1 puede estar involucrado en los efectos mediados por el VEGF sobre células distintas de las células endoteliales, tales como los macrófagos. El VEGFR-1 también juega un papel importante en la angiogénesis producida en condiciones patológicas. El gen del VEGFR-1 también codifica para una versión más corta de esta proteína que carece de región transmembrana y de dominio intracelular (Kendall y Thomas, 1993). La función de esta forma soluble es desconocida, pero parece ser que inhibe la actividad del VEGF.

El VEGFR-2 también denominado Flk-1 ó KDR se expresa sobre todo en células endoteliales vasculares, y es el que ejerce principalmente los efectos biológicos del VEGF (Shibuya y Claesson-Welsh, 1999). Tiene una elevada afinidad por el VEGF, una potente actividad tirosin quinasa y forma homodímeros. El segundo y tercer dominios extracelulares tipo Ig están relacionados con la unión al VEGF, mientras que los dominios 4-7 tipo Ig están involucrados en la dimerización (Ferrara, 1999; Shibuya, 2001). La unión del VEGF al VEGFR-2 y la posterior homodimerización del receptor son esenciales para la estimulación de la transducción de señales intracelulares inducidas por el VEGFR-2, que es decisiva para la actividad del VEGF. El promotor del gen del VEGFR-2 no posee sitio de unión a HIF-1, lo que sugiere que la regulación positiva de este gen por la hipoxia es indirecta. La estimulación del gen del VEGFR-2 por el VEGF parece estar mediada por la unión del VEGF a este receptor y la activación de rutas de transducción de señales intracelulares. El VEGFR-2 es también un receptor para VEGF-C, VEGF-D, y VEGF-E, aunque la importancia fisiológica de estos factores está peor definida.

Las células endoteliales y algunas células tumorales expresan sitios de unión al VEGF diferentes al VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 en su superficie celular, a los que sólo se unen algunas isoformas del VEGF (Soker y col., 1996). Soker y colaboradores (1998) identificaron uno de estos receptores específico de isoformas del VEGF como neuropilina 1 (NRP-1). El otro receptor, la neuropilina 2 (NRP-2) fue identificada debido a su secuencia homóloga con NRP-1 (Neufeld y col., 2002). NRP-1 puede unirse a VEGF165, VEGF-B, PLGF-2, y algunas variantes del VEGF-E, mientras que NRP-2 se puede unir a VEGF145, VEGF165, PLGF-2 y VEGF-C. Cuando NRP-1 se coexpresa en células que poseen VEGFR-2, NRP-1 estimula la unión del VEGF165 al VEGFR-2 (Soker y col., 1998). Se ha hipotetizado que NRP-1 presenta el VEGF165 al VEGFR-2 de manera que se estimula la transducción de señales mediada por VEGFR-2 (Soker y col., 1998). Esta unión del VEGF165 a NRP-1 explicaría en parte la gran capacidad mitogénica de esta

isoforma frente al VEGF<sub>121</sub>. Los dominios intracelulares de los NRPs son cortos y no son capaces de transducir señales biológicas de manera independiente mediante su unión a VEGF.

### **Transducción de señales**

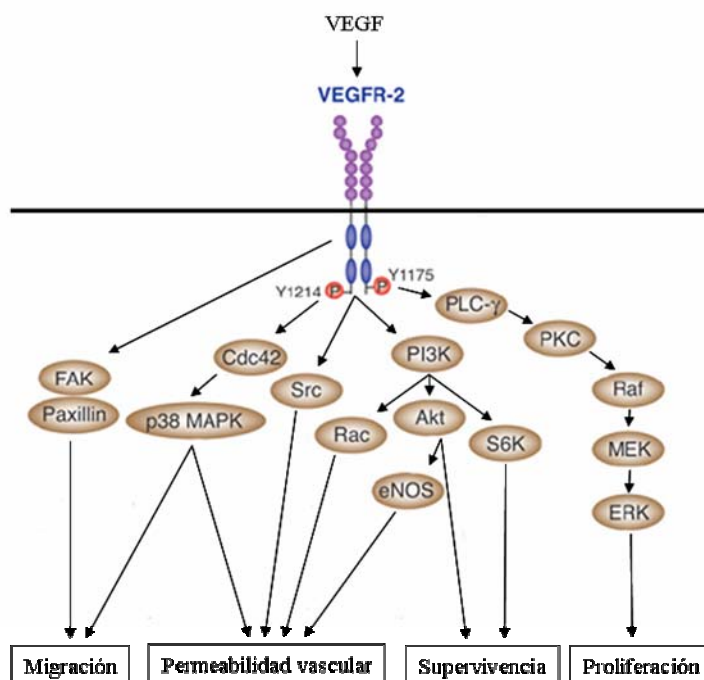
Los efectos del VEGF están mediados por la activación de varias rutas intracelulares de transducción de señales después de la unión a los VEGFR. La activación de los VEGFR sigue la misma serie de pasos, en general, que la observada con otros RTKs: unión del VEGF; dimerización del receptor del VEGF; activación de la actividad del RTK; autofosforilación del receptor del VEGF. El receptor activado inicia la cascada de transducción de señales que producen los efectos del VEGF.

El VEGFR-1 transduce señales para el crecimiento y la supervivencia de células endoteliales y pericitos, así como para la migración de macrófagos mediante la autofosforilación inducida por ligando y la activación de proteínas transductoras de señales intracelulares. Entre ellas se encuentra la fosfolipasa C (PLC $\gamma$ 1), implicada en la proliferación de células endoteliales mediante la activación de la ruta de la proteína quinasa de activación mitogénica (MAPK). También se ha descrito la unión de la subunidad p85 de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) al VEGFR-1 fosforilado (Cunningham y col., 1995). Sin embargo la activación del VEGFR-1 no se relaciona con fuertes respuestas biológicas en modelos de líneas celulares endoteliales (Ito y col., 2001).

Un exhaustivo estudio de las respuestas celulares a la activación del VEGFR-2 ha identificado, al menos, 46 moléculas de transducción de señales que sufren una fosforilación como respuesta a la unión del VEGF al VEGFR-2, y se ha demostrado, *in vitro*, que el VEGF activa la mayoría de las rutas de transducción de señales identificadas hasta la fecha (Bates y Harper, 2002). Sin embargo, la activación de alguna de estas rutas puede no ser fisiológicamente relevante y es probable que haya diferentes rutas implicadas en diferentes tipos de células (Bates y Harper 2002; Gerwins y col., 2000). Una de las funciones importantes del VEGFR-2 es la estimulación de la supervivencia y crecimiento celular del endotelio vascular y la promoción de la angiogénesis. La unión del VEGF al VEGFR-2 induce la activación de la PLC $\gamma$  (Fig.6) que hidroliza después el fosfatidil inositol difosfato (PIP<sub>2</sub>) en la membrana plasmática para producir las moléculas de transducción de señales diaciglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>). La supervivencia de células endoteliales implica la activación de la PI3K y la ruta de la proteína quinasa B (PKB, Akt) que también regula la activación de la óxido nítrico sintasa

endotelial (eNOS) (Fig.6) (Fulton y col., 1999). La eNOS juega un papel predominante en la angiogénesis inducida por VEGF y en la permeabilidad vascular (Fukumura y col., 2001). La PI3K también activa la ruta p70 S6K, involucrada en la proliferación de las células endoteliales (Viñals y col., 1999), y la proteína Rac de unión a guanósín trifosfato (GTP), implicada en la regularización de la permeabilidad vascular (Fig.6) (Ericsson y col., 2003).

El DAG está implicado en la activación de la proteína quinasa C (PKC), en particular la isoforma PKC $\beta$ . A continuación la PKC $\beta$  se fosforila y activa la ruta de las MAPK a través de la cascada c-Raf-MEK-ERK estimulando la síntesis de ADN y la proliferación de células endoteliales (Fig.6) (Takahashi y col., 2001). Por otro lado, el DAG provoca una mayor perforación de los capilares, lo que a su vez induce una mayor permeabilidad vascular, esto parece producirse mediante la activación de canales de cationes no selectivos, dando lugar a la entrada de iones de calcio (Bates y Harper, 2002). La actividad de quinasas específicas de la familia Src también es esencial para el incremento de la permeabilidad vascular mediada por el VEGF (Fig.6) (Weis y col., 2004). Otra proteína implicada en el control de la permeabilidad vascular es la p38 MAPK (Issbrucker y col., 2003). El VEGF induce la migración en las células endoteliales mediante la activación secuencial de Cdc42 y p38 MAPK (Lamallice y col., 2004) o la activación de la quinasa de adhesión focal (FAK) y Paxilina (Fig.6) (Qi y Claesson-Welsh, 2001).



**Figura 6.** Esquema de las vías de señalización del VEGFR-2. Tyr<sup>1175</sup> (Y1175) y Tyr<sup>1124</sup> (Y1124) son los sitios de autofosforilación más importantes del VEGFR-2. PLC- $\gamma$  se activa fosforilándose al unirse a Y1175. Y1124 está implicado en la activación secuencial de Cdc42 y p38 MAPK. Muchas proteínas son activadas por VEGFR-2, incluyendo FAK, PI3K y Src. La activación de estas señales de transducción conduce a varias funciones diferentes en las células endoteliales, como migración, permeabilidad vascular, supervivencia y proliferación.

### **Actividad biológica**

El VEGF tiene cuatro actividades biológicas principales que contribuyen todas ellas a la inducción de la angiogénesis y que han sido estudiadas exhaustivamente (Ferrara y col., 2003; Neufeld y col., 2001):

- Crecimiento y proliferación de células endoteliales vasculares.
- Migración de células endoteliales vasculares.
- Supervivencia de células endoteliales inmaduras mediante la prevención de la apoptosis.
- Aumento de la permeabilidad vascular.
- Vasodilatación.

Recientemente, también se ha implicado al VEGF en la linfangiogénesis (Nagy y col., 2002). Además de estas acciones sobre las células endoteliales, existe cierta evidencia de efectos sobre otros tipos de células (Ferrara y col., 2003). Entre los efectos observados sobre células obtenidas de la médula ósea, se incluyen los siguientes: promoción de la quimiotaxis de los monocitos, inhibición de la maduración de las células dendríticas, aumento de la producción de células B y generación de células mieloides inmaduras. El VEGF también parece estar involucrado en la supervivencia de las células madre hematopoyéticas durante la repoblación hematopoyética (Gerber y col., 2002).

### **LA FAMILIA DEL FGF**

El primer grupo de factores de crecimiento con potencial angiogénico, identificado y caracterizado, corresponde a la familia de los FGF o factores de crecimiento con afinidad para la heparina. Inicialmente descritos como mitógenos para fibroblastos, estos factores son hoy conocidos por ser mitógenos para una gran variedad de células que incluyen queratinocitos, osteoblastos inmaduros, oligodendrocitos y células endoteliales. Asimismo, los FGF se han visto implicados en diferentes funciones biológicas en distintos tipos celulares (Basilico y Moscatelli, 1992; Boilly y col., 2000).

En el año 1939 se obtuvo la primera evidencia de que extractos de cerebro bovino promovían la proliferación de fibroblastos *in vitro* (Gospodarowicz y col., 1978). El término factor de crecimiento para fibroblastos se acuña en 1974, año en el que Gospodarowicz descubre que la actividad mitogénica de extractos de cerebro y pituitaria bovina se debía a unos polipéptidos que inducían el crecimiento de fibroblastos y estimulaban la división de una línea celular de fibroblastos de ratón, células 3T3, a los

cuales denominó factores de crecimiento para fibroblastos (FGF). (Gospodarowicz, 1975; Lemmon y col., 1982).

Thomas y colaboradores, también del grupo de Gospodarowicz, hicieron nuevas purificaciones para aislar el componente activo de la preparación, consiguiendo el aislamiento de una proteína ácida, el factor de crecimiento para fibroblastos ácido (aFGF) y de una proteína básica, el factor de crecimiento para fibroblastos básico (bFGF) (Gospodarowicz y col., 1978; Maciag y col., 1979; Thornton y col., 1983). Un año más tarde, se describieron las estructuras primarias de estas dos proteínas y se confirmó que aFGF y bFGF eran dos proteínas distintas aunque bastante similares (Giménez-Gallego y col., 1985). Ambas comparten estructuras proteicas idénticas o estrechamente relacionadas y presentan una gran afinidad por la heparina y materiales de la matriz extracelular (Thornton y col., 1983; Maciag y col., 1984; Shing y col., 1984).

El conocimiento de la biología, estructura y mecanismo de acción de estas moléculas ha sido enorme en los últimos 10-15 años. Otros miembros de la familia de los FGF se han ido descubriendo estableciéndose un sistema numérico para denominarlos. El aFGF y bFGF se han denominado FGF-1 y FGF-2 respectivamente. Posteriormente se han descubierto FGF-3 (INT-2), (Dickson y col., 1984), FGF-4 (K-FGF/HST), (Sakamoto y col., 1986) y FGF-5 (Zhan y col., 1988), los cuales se describieron como oncogenes. El FGF-6 se identificó con una secuencia base similar a la de FGF-4 (Marics y col., 1989). FGF-7 (KGF) se aisló como mitógeno específico de queratinocitos usando las técnicas clásicas de purificación de proteínas de los fibroblastos (Burgess y Maciag, 1989; Rubin y col., 1989). FGF-8 fue purificado como un factor de crecimiento inducido por andrógenos (Tanaka y col., 1992; Crossley y Martin, 1995; Sun y col., 1999) y FGF-9 se identificó como un factor estimulante de las células gliales (Miyamoto y col., 1993; Colvin y col., 2001). El subgrupo FGF-11-14, parece actuar en dianas intracelulares y su mecanismo de acción es todavía desconocido (Grose y Dickson, 2005). El resto de los miembros de la familia de los FGF se han ido descubriendo gracias a herramientas bioinformáticas y PCR de bases homólogas, de forma que dicha familia es hoy en día una de las mayores familias de factores de crecimiento, formada por 23 miembros con un 15-85% de la secuencia homóloga (Miyake y col., 1998; Ohbayashi y col., 1998; Lu y col., 1999; Nishimura y col., 1999; Xu y col., 1999; Yamashita y col., 2000; Kirikoshi y col., 2000; Nakatake y col., 2001).

En el embrión, los FGF son los principales reguladores de la comunicación mesénquima-epitelio y de la organogénesis, y en la vida adulta los FGF continúan

regulando la homeostasis de los tejidos, jugando a su vez un papel importante en la cicatrización de las heridas, reparación de los tejidos, metabolismo del colesterol y regulación del fosfato sérico. Las alteraciones en la señalización de los FGF pueden causar un amplio espectro de enfermedades como síndromes olfatorios, alteraciones esqueléticas, trastornos del fosfato y cáncer. La diversidad de estas patologías refleja las funciones vitales que los FGF tienen en la biología humana y han sido fundamentales para aumentar el conocimiento y los mecanismos de acción de los FGF.

Los distintos miembros de la familia de los FGF varían entre ellos de tamaño entre los 17-34 KDa. Todos ellos comparten una secuencia de 120 aminoácidos, mostrando aproximadamente entre un 16-65% de secuencias idénticas. Están formados por 12 láminas  $\beta$  antiparalelas plegadas, organizadas en estructura de pirámide trigonal. La localización y conformación de los pliegues de las distintas lamina  $\beta$  es lo que caracteriza a cada FGF. Así mismo las regiones C- y N-terminal de los FGF son muy flexibles y divergentes entre ellas, contribuyendo a dicha especificidad (Bikfalvi y col., 1997; Mohammadi y col., 2005).

El FGF-1 y el FGF-2 son polipéptidos de cadena simple con 140 y 146 aminoácidos respectivamente. Ambos FGF son proteínas estructuralmente relacionadas con una homología del 55% entre sus secuencias proteicas, lo que indica un gen ancestral común (Lemmon y col., 1982; Mohammadi y col., 2005). Otra característica estructural es la ausencia de una secuencia guía hidrofóbica para cada uno de los péptidos, por lo que no se conoce bien su modo de exportarse, aunque se han descrito nuevos mecanismos que explicarían su salida de la célula, como se describe a continuación.

### **Mecanismos de secreción del FGF**

Hasta la fecha, aún no es bien conocido el mecanismo de secreción de los FGF en condiciones fisiológicas. Se ha propuesto que los FGF recién sintetizados en los animales adultos, al carecer de una secuencia de secreción, quedarían secuestrados en el interior de la célula, y serían liberados al medio extracelular solamente en caso de daño celular. De esta manera, la aparición de los FGF en el medio extracelular induciría la división de las células allí presentes, provocando así la regeneración del tejido lesionado. También se propuso que el heparán sulfato de la matriz extracelular podría ser un mecanismo de seguridad adicional para evitar la presencia de FGF libres en los tejidos. En caso de daño celular, el FGF secuestrado también podría ser liberado mediante la degradación del

heparán sulfato por heparinasas presentes en el medio debido a la rotura celular (Bikfalvi y col., 1997; Lemmon y col., 1982; Mohammadi y col., 2005).

Aún no se ha aclarado la cuestión de como la presencia de FGF en los tejidos de forma fisiológica no induce una profunda desorganización, pero existen dos aspectos teóricos que podrían contribuir a ello (Wu y col., 2000; Dailey y col., 2005): por una parte, la gran afinidad de los FGF al heparán sulfato, componente de la matriz extracelular, explica que en el organismo estos factores no se comporten como factores de crecimiento solubles, sino como factores inmovilizados. Esta inmovilización no les inactiva por completo, pero limita enormemente el número de células a las que pueden acceder. Por otro lado, en el organismo, a diferencia de lo que sucede en los estudios *in vitro*, las células están expuestas simultáneamente a la acción de varios factores de crecimiento, por lo que la respuesta depende de todo el conjunto de señales que están recibiendo en ese momento determinado (Bikfalvi y col., 1997).

En el caso de los procesos tumorales, los FGF pueden ejercer sus efectos en las células endoteliales, siendo responsables de la densa trama vascular necesaria para el desarrollo del tumor de un modo paracrino, gracias a la liberación de dichos factores secretados por las células tumorales o por las células del estroma, o bien por la movilización desde la matriz extracelular. Asimismo, el FGF-2 también puede ejercer su acción de forma autocrina desde las células endoteliales, según han demostrado numerosos estudios *in vitro* e *in vivo*. El gen humano del FGF-2 codifica distintas isoformas con pesos moleculares de 18 y 24 KDa. Ambas isoformas presentan actividad angiogénica pero, a diferencia de otros FGF, son liberadas por un camino alternativo, vía exocitosis independiente del aparato de Golgi. Por otro lado, las isoformas con alto peso molecular tienden a localizarse en el núcleo, y las de 18 KDa están en el citosol (Klein y col., 1996).

### **Receptores del FGF**

Los FGF median su acción uniéndose y activando una familia de cuatro RTKs, denominados receptores del factor de crecimiento para fibroblastos (FGFR); estos receptores son de alta afinidad para los FGF (Coughlin y col., 1988). Los FGF también se unen a la heparina o heparán sulfato proteoglicanos (HSPG), estos receptores son receptores de baja afinidad que no transmiten ninguna acción biológica, pero dicha unión es imprescindible para la activación de los receptores de alta afinidad (Shing y col., 1984; Burgess y Maciag, 1989; Lee y col., 1989; Jaye y col., 1992; Mohammadi y col., 2005).

Como todos los RTKs, los cuatro miembros FGFR están compuestos de un dominio extracelular de unión al ligando, de un dominio transmembrana y de un tercer dominio citoplasmático que contiene la actividad catalítica tirosín quinasa, además de secuencias reguladoras adicionales. La región extracelular de unión al ligando de los FGFR está compuesta por tres dominios tipo Ig, llamados D1-D3, una zona de siete u ocho residuos ácidos en la unión entre D1 y D2, llamada “acid box”, y una región cargada positivamente en D2, que es el lugar de unión para la heparina (Fig.8) (Shing y col., 1984; Isacchi y col., 1990; Seno y col., 1990; Givol y Yayon, 1992).

Los FGFR tienen una variedad de isoformas con un dominio extracelular compuesto por dos o tres dominios tipo Ig y formas solubles de FGFR que proceden también de distintas formas de segregación en el tercer dominio D3, variando significativamente la especificidad del receptor. La forma alternativa de segregación de D3, existe en FGFR-1, FGFR-2 y FGFR-3, pero no en el FGFR-4 (Partanen y col., 1991). Se sabe que el exón 7 del gen de FGFR-2 codifica la mitad N-terminal de D3, dando lugar a la isoforma “a”, mientras que los exones 8 y 9 codifican la mitad C-terminal de D3, dando lugar a las isoformas “b” y “c” respectivamente (Miki y col., 1992; Spivak-Kroizman y col., 1994; Wang y col., 1995). Las distintas isoformas de los FGFR tienen distintas especificidades de unión, por ejemplo FGFR-2b se une al FGF-7 y FGF-10 y no al FGF-2, y el FGFR-2c se une al FGF-2 y FGF-18, pero no al FGF-7 ni FGF-10. La tabla 2 resume la especificidad de los distintos FGFR con los distintos FGF (Lee y col., 1989; Givol y Yayon, 1992; Jaye y col., 1992; Ornitz y col., 1996).

<b>FGFR isoformas</b>	<b>Ligandos</b>
<i>FGFR-1b</i>	FGF-1, -2, -3 y -10
<i>FGFR-1c</i>	FGF-1, -2, -4, -5 y -6
<i>FGFR-2b</i>	FGF-1, -3, -7, -10, y -22
<i>FGFR-2c</i>	FGF-1, -2, -4, -6, -9, -17 y -18
<i>FGFR-3b</i>	FGF-1 y -9
<i>FGFR-3c</i>	FGF-1, -2, -4, -8, -9, -17, -18, y -23
<i>FGFR-4</i>	FGF-1, -2, -4, -6, -8, -9, -16, -17, -18, y -19

**Tabla 2.** Ligandos específicos de las isoformas de los FGFR (Eswarakumar y col., 2005).

Asimismo se ha visto que las distintas isoformas pueden expresarse en distintas células, así el FGFR-2b se expresa exclusivamente en las células epiteliales, y el FGFR-2c en las mesenquimales (Ibrahimi y col., 2004).

El papel de los receptores de baja afinidad de heparina ha sido muy discutido desde que se descubrió que la heparina promovía la actividad del FGF-1 en las células endoteliales (Burgess y Maciag, 1989; Schlessinger y col., 1995). Los modelos iniciales presuponían que la heparina/heparán sulfato (HS) interaccionaba únicamente con el FGF, interviniendo de las siguientes formas: estabilizando y protegiendo a los FGF de una posible degradación térmica, proteolítica o pH-dependiente, o funcionando como reservorio de FGF que podría ser liberado para la interacción con FGFR, facilitando la unión FGFR-FGF (Shing y col., 1984; Mohammadi y col., 2005). Posteriormente, se ha demostrado que el HS es imprescindible para la señalización de los FGF, sugiriendo que promueve la unión del FGF-FGFR interaccionando con los dos a la vez (Rapraeger y col., 1991; Ornitz y col., 1992).

La dimerización del receptor, inducida por el ligando, es un requisito fundamental para la activación de las proteínas quinasas, ya que acerca los dominios citoplasmáticos del receptor entre sí, permitiendo su autofosforilación, subsiguiente activación de la tirosina quinasa e iniciación de la corriente de señalización (Coughlin y col., 1988; Plotnikov y col., 1999; Mohammadi y col., 2005). Se han descrito distintos modelos de dimerización, pero todos ellos coinciden en la formación inicial de un dímero de FGF promovido por la heparina que posteriormente inducirá la dimerización del FGFR (Plotnikov y col., 1999).

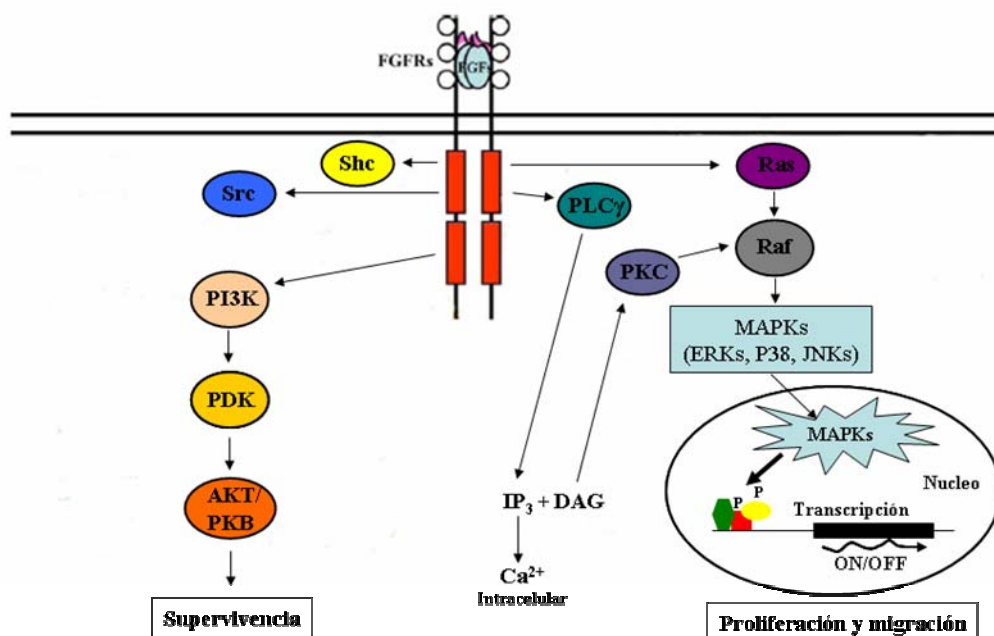
### **Transducción de señales**

Los FGF, a través de su unión a sus receptores FGFR, activan un gran número de moléculas de señalización que desempeñan distintas funciones en procesos del desarrollo embriológico y de la homeostasis de los tejidos. Cuando mutan o se expresan inadecuadamente, producen diversas patologías que varían desde trastornos morfogénicos hasta cáncer (Klint y Claesson-Welsh, 1999; Cross y Claesson-Welsh, 2001).

La unión del FGF a su receptor activa numerosas vías de transducción de señales que son generalmente interdependientes entre ellas. Estudios genéticos y bioquímicos han ayudado a dilucidar algunas de las vías activadas simultáneamente por FGF en la mayoría de las células. La vía más conocida es la Ras-MAPK (Fig.7) (Halfon y col., 2000; Hanafusa y col., 2002). La activación de los FGFR estimula la vía de la PLC $\gamma$  que permite la liberación de calcio intracelular y la regulación del complejo de proteínas quinasas

dependientes de calcio/calmodulina. También activan la vía de la PI3K/AKT/PKB que posee un efecto antiapoptótico (Fig.7). Por último, los FGFR estimulados activan las MAPK, una familia de proteínas que incluyen las ERK, responsables de la acción mitogénica y de la migración celular. Las MAPK, p38 y JNK, están generalmente asociadas a la respuesta inflamatoria, pero la respuesta producida varía en función del tipo celular (Jaye y col., 1992). Las MAPK activadas son transportadas al núcleo donde fosforilan los factores de transcripción que van a regular los genes diana (Fig.7). En algunas células los FGF también activan las vías Shc y Src (Klint y Claesson-Welsh, 1999; Schlessinger, 2000; Hanafusa y col., 2002; Dailey y col., 2005).

Las diferentes respuestas biológicas producidas por el FGF no pueden ser explicadas simplemente por la activación de los receptores, las cascadas de señales de transducción, o la modulación de la expresión génica. Todos los pasos que siguen a la unión del ligando y la activación del receptor son parte de una complicada red de señalizaciones reguladas por múltiples factores, incluyendo la presencia de abundantes moléculas específicas de transducción, interacciones con otras vías de señalización, y la disponibilidad de genes diana para ser activados o reprimidos. Las respuestas biológicas específicas que posee una célula en respuesta al FGF, dependen de la interrelación entre todos estos factores (Dailey y col., 2005).



**Figura 7.** Vías de señalización de los FGF. La PLC $\gamma$  activada produce inositol trifosfato (IP $_3$ ) y diacilglicerol (DAG). El IP $_3$  facilita la salida de calcio del retículo endoplásmico, mientras que el calcio y la DAG activan la PKC. La señalización vía PI3K/AKT/PKB posee efecto antiapoptótico. Las MAPKs activadas se translocan al núcleo donde fosforilan factores de transcripción (P) que regulan genes diana. En algunos tipos celulares también se fosforilan las proteínas Shc y Src.

### Actividad biológica

Existen numerosas evidencias que demuestran que diferentes miembros de la familia FGF, pero sobre todo FGF-1 y FGF-2, pueden inducir *in vitro* un fenotipo pro-angiogénico en las células endoteliales, similar al proceso angiogénico *in vivo* (Montesano y col., 1986; Gualandris y col., 1996). Dicho proceso incluye la regulación por parte de los FGF de la proliferación y migración de las células endoteliales, producción de proteasas e integrinas, expresión de receptores de la cadherina y producción de uniones gap intercelulares. Se sabe, que la activación de FGFR-1 y FGFR-2 por los factores de crecimiento FGF-1, FGF-2 y FGF-4, lleva a la proliferación celular (Presta y col., 2005).

La degradación de la matriz extracelular representa un paso importante durante la primera fase del proceso angiogénico. Los FGF-1, FGF-2 y FGF-4 estimulan la producción de MMP en las células endoteliales, permitiendo la actividad proteolítica en el frente de migración de dichas células (Carmeliet, 2000; Cross y Claesson-Welsh, 2001).

Los FGF-1, FGF-2 y FGF-8b intervienen también en la migración de las células endoteliales al estimular la quimiotaxis. La migración y proliferación de las células endoteliales está limitada por uniones laterales célula-célula y por interacciones con la matriz extracelular, procesos mediados por receptores de cadherinas e integrinas. El FGF-2 regula la expresión de diferentes integrinas ( $\alpha V\beta 3$ ) y cadherinas. Estos datos sugieren que los FGF son capaces de inducir tanto la dispersión de las células endoteliales, necesaria para los primeros pasos de la angiogénesis, como su interacción necesaria para la formación de nuevos vasos. Lo mismo ocurriría con la matriz extracelular, que en las primeras fases es degradada por las proteasas inducidas por los FGF, y posteriormente los FGF son capaces de inducir la producción de varios componentes de la matriz extracelular que contribuyen a la maduración vascular (Cross y Claesson-Welsh, 2001).

El FGF-2 y FGF-8b intervienen en la morfogénesis de las células endoteliales mediante la activación de la maquinaria proteolítica y el cruce con la vía de señalización del receptor VEGFR-1 (Kumar y col., 1998; Cross y Claesson-Welsh, 2001).

El factor de crecimiento FGF-2, como se describía anteriormente, es un potente factor angiogénico, pero también ha demostrado tener capacidad para estimular la formación de vasos linfáticos, directamente mediante la estimulación y proliferación de las células endoteliales linfáticas o indirectamente aumentando la concentración de otros factores linfangiogénicos.

**- OBJETIVOS -**

El objetivo de este estudio, es evaluar la capacidad angiogénica de células aisladas del omentum humano que ayuden a comprender a nivel celular las propiedades de revascularización demostradas por el omentum como tejido de implante. Para ello se ha planteado:

- ❖ El desarrollo de un método sencillo y eficaz para el aislamiento y cultivo de células mesoteliales y de células fibroblásticas a partir de muestras de omentum humano.
- ❖ El estudio de la morfología y la caracterización de las células obtenidas en los cultivos.
- ❖ La evaluación de la capacidad angiogénica de las células mesoteliales y de las células fibroblásticas, determinando la secreción y expresión de factores angiogénicos *in vitro*, así como su efecto en un modelo experimental de angiogénesis *in vivo*.

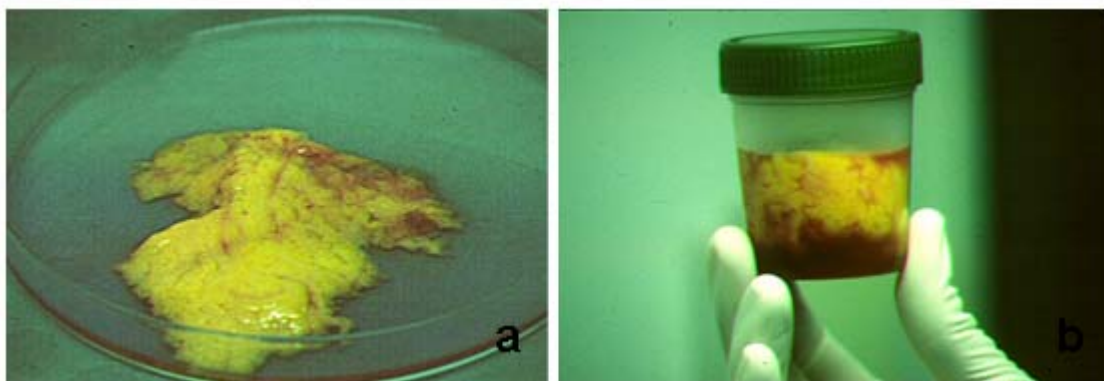
**- MATERIAL Y METODOS -**

## AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CELULAS PROCEDENTES DEL OMENTUM

### CULTIVOS PRIMARIOS

Las muestras de omentum de un peso aproximado de 20 g a 50 g, fueron obtenidas de nueve pacientes sometidos a laparotomía por diversas patologías benignas, tras firmar un consentimiento informado en el Departamento de Cirugía General y Digestiva del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid. Cinco de los pacientes eran varones y tres eran mujeres, con una media de edad de  $32 \pm 6$  años. Los fragmentos de omentum fueron transportados al laboratorio en un recipiente estéril conteniendo Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) (Gibco BRL, Paisley, Scotland, UK), suplementado al 1% con antibióticos y antimicóticos (penicilina G sódica,  $1 \times 10^4$  unidades/ml; estreptomicina sulfato,  $1 \times 10^4$   $\mu\text{g/ml}$ ; anfotericina B, 25  $\mu\text{g/ml}$ ) (Gibco BRL) (Fig.8).

Para mantener las condiciones de esterilidad se utilizó una campana de flujo laminar vertical, donde se realizó una doble digestión enzimática para seleccionar las dos poblaciones celulares con las que se realizaron los experimentos.



**Figura 8.** *a) Fragmento de omentum. b) Primera digestión enzimática en una solución de colagenasa tipo I al 0,075%.*

### Primera digestión enzimática

El fragmento de omentum se lavó varias veces con DMEM y se procedió a una primera digestión enzimática, con colagenasa tipo I (Gibco BRL) al 0,075% en Hanks Balanced SALT Solution (HBSS) (Sigma, Saint Louis, MO, USA), durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se añadió DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino

(SFB) (Gibco BRL) y 1% de antibiótico-antimicótico, y se realizó una centrifugación a 300 x g durante 10 minutos. Tras esta centrifugación se obtuvo por un lado el fragmento de omentum parcialmente digerido (zona superior del tubo) y por otro lado un pellet celular (zona inferior del tubo). El fragmento de omentum fue retirado para realizar una segunda digestión enzimática y continuar con el protocolo de aislamiento celular con el fin de obtener células de tipo fibroblástico. El pellet celular se resuspendió con DMEM y se recogió para continuar con el aislamiento de las células mesoteliales.

#### Centrifugación en gradiente de densidad

El pellet celular recogido tras la primera digestión se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos. A continuación, y tras lavado con DMEM, se descartó el sobrenadante, repitiendo este proceso dos veces. Seguidamente, se procedió a la centrifugación en gradientes de densidad en Ficoll-paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), para descartar los eritrocitos y restos celulares. Se añadieron 4 ml de la suspensión celular sobre 5 ml de Ficoll en un tubo de 15 ml, teniendo cuidado de no mezclar las dos fases. Posteriormente, se centrifugó a 670 x g durante 30 minutos, obteniéndose una fase intermedia que contenía las células mononucleares que fueron recogidas y transferidas a otro tubo donde se añadió DMEM y se centrifugó 5 minutos a 300 x g. El proceso de lavado con DMEM se repitió dos veces. Las células lavadas, se sembraron en un flask de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, utilizando como medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico-antimicótico. A las 2 horas se cambió el sobrenadante a otro flask de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> para descartar algún fibroblasto que pudiera contaminar el cultivo, ya que estos se adhieren rápidamente al plástico del flask de cultivo. Una vez finalizado este proceso, las células se incubaron en una estufa a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

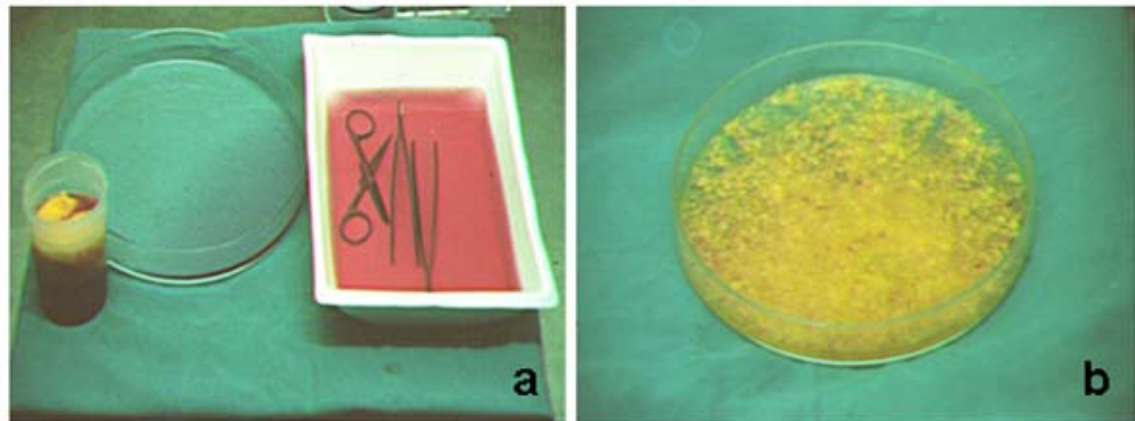
Antes de llegar a confluir, las células se despegaron con tripsina (Sigma) y se pasaron a varios flask de cultivo para expandir la población, obteniendo varios subcultivos.

#### **Segunda digestión enzimática**

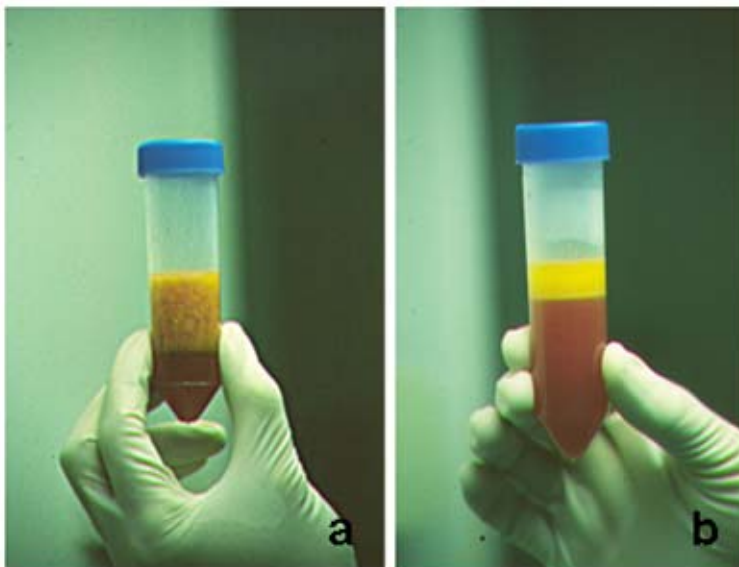
El fragmento de omentum, parcialmente digerido, se lavó con DMEM y se procedió a su disgregación mecánica con unas tijeras estériles (Fig.9a), obteniendo trozos tan pequeños como para poder ser aspirados por una pipeta de 10 ml en la campana de flujo laminar vertical. Una vez troceada la muestra (Fig.9b), se realizó una segunda digestión enzimática con colagenasa tipo I al 0,075% (Fig.10a). Tras esta segunda exposición a la

colagenasa, la digestión resultante después de 30 minutos fue completa, obteniéndose una papilla.

Al terminar el tiempo de digestión, se añadió DMEM suplementado con SFB al 10%, y se realizó una centrifugación a 300 x g 10 minutos; tras esa centrifugación (Fig.10b) se descartó la fase grasa (fase superior) y fue seleccionado el pellet celular.



**Figura 9.** a) Material estéril para la disgregación mecánica. b) Muestra de omentum disgregada.



**Figura 10.**

a) Segunda digestión enzimática con una solución de colagenasa tipo I al 0,075%.

b) Muestra digerida tras 30 minutos de incubación y centrifugación a 300 x g 10 minutos.

#### Centrifugación en gradiente de densidad

Una vez recogida la suspensión celular tras la segunda digestión, los siguientes pasos se realizaron en una campana de flujo laminar horizontal. Se centrifugó la suspensión a 300 x g durante 5 minutos y se lavó el pellet con DMEM. Este proceso se repitió dos veces. A continuación, se procedió a la centrifugación en gradientes de

densidad en Ficoll, para descartar los eritrocitos y restos celulares, añadiendo 4 ml de la suspensión celular sobre 5 ml de Ficoll en un tubo de 15 ml, teniendo cuidado de no mezclar las dos fases. Posteriormente, se centrifugó a 670 x g durante 30 min, obteniéndose una fase intermedia donde se encuentran situadas las células mononucleares que fueron recogidas y transferidas a otro tubo donde se añadió DMEM. Se centrifugó a 300 x g 5 minutos repitiendo este proceso dos veces. Una vez lavadas las células, se sembraron en un flask de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, utilizando como medio de cultivo DMEM suplementado con el 10% de SFB y 1% de antibiótico-antimicótico. Se cambió el sobrenadante a las 24 horas, para seleccionar los fibroblastos, ya que estos se adhieren rápidamente al plástico del flask de cultivo, de esta manera se descartaron las células que todavía seguían en suspensión. Una vez finalizado este proceso, se dejaron incubando las células en una estufa a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>.

Antes de llegar a confluir, las células se despegaron con tripsina y se pasaron a varios flasks de cultivo para expandir la población, obteniendo así varios subcultivos.

## **SUBCULTIVOS**

Cuando los cultivos primarios llegaron a confluir, se procedió a despegar las células con tripsina para la obtención de los subcultivos. Este proceso se repitió hasta el 4º subcultivo, cuando se emplearon para la realización de los experimentos o se congelaron alícuotas para su posterior utilización.

### **Despegado de las células**

Una vez que los cultivos llegaron a confluir, se procedió a despegar las células. Para ello, primero se lavaron con HBSS 3 minutos, para después retirar el HBSS y añadir una solución con 0,5% de tripsina diluida en HBSS, incubando 5 minutos a 37°C. A continuación, se añadió DMEM suplementado con SFB al 10% para parar la reacción. Se retiró todo el sobrenadante donde estaban las células despegadas en suspensión y se llevó a un tubo estéril para centrifugar 5 minutos a 300 x g, descartando el sobrenadante y seleccionando el pellet celular. Posteriormente, se añadió DMEM y se resuspendieron las células para lavarlas, centrifugando de nuevo 5 minutos a 300 x g. Este proceso se repitió dos veces. Una vez lavadas las células, se procedió a su conteo con un hemocitómetro para sembrarlas a una densidad adecuada para el subcultivo ( $\sim 5 \times 10^5$  células/flask 75 cm<sup>2</sup>), para utilizarlas en algún experimento o para congelarlas ( $\sim 1 \times 10^6$  células/vial).

### **Congelación**

Las células fueron sometidas a un proceso de congelación para su posterior utilización cuando fuese necesario. Una vez despegadas las células, se contaron y se pipeteó el volumen necesario para conseguir  $1 \times 10^6$  células; a continuación se centrifugó a  $300 \times g$  5 minutos, descartando el sobrenadante y resuspendiendo las células con  $900 \mu\text{l}$  de SFB en un criotubo, posteriormente se añadieron  $100 \mu\text{l}$  del crioprotector dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma). A continuación se colocó el vial en una cubeta de congelación y se introdujo en un congelador de  $-80^\circ\text{C}$ . A las 24 horas, se pasó el vial a un contenedor de nitrógeno líquido donde se conservaron las células hasta su uso, apuntando el pase en el que se encontraba el subcultivo.

### **Descongelación**

Se extrajo el vial de células congeladas del contenedor de nitrógeno líquido y se descongelaron rápidamente en un baño a  $37^\circ\text{C}$ . Una vez descongeladas, se pipeteó la solución celular pasándola a un tubo estéril donde se añadió lentamente DMEM suplementado con SFB al 10%. Posteriormente, se centrifugó a  $300 \times g$  durante 5 minutos, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet celular con DMEM para eliminar los restos que pudiesen quedar de DMSO, repitiéndose el proceso dos veces. Una vez lavadas, se sembraron en un flask de  $75 \text{ cm}^2$ , al que se le añadió DMEM suplementado con SFB al 10% y antibiótico-antimicótico al 1%, llevándolas a un incubador a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$ .

## **TECNICAS INMUNOCITOQUIMICAS**

Para la realización de las técnicas inmunocitoquímicas, las células en cultivo se sembraron sobre cubreobjetos de cristal en una placa multipocillo de 24 pocillos. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anticuerpo policlonal anti-FGF-2 (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA), anticuerpo monoclonal anti-VEGF (Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo monoclonal anti-pan-citoqueratinas conjugado con tioisocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma), anticuerpo monoclonal anti-vimentina (Dako, Glostrup, Denmark), y anticuerpo policlonal anti-nestina (Chemicon International, Temecula, USA).

Se utilizaron dos técnicas diferentes para revelar los anticuerpos primarios. Una técnica de inmunoperoxidasa para los anticuerpos primarios anti-FGF-2 y anti-VEGF y una técnica de inmunofluorescencia para los anticuerpos primarios anti-vimentina, anti-citoqueratinas y anti-nestina.

Las células en las que se realizaron las técnicas inmunocitoquímicas para FGF-2 y VEGF permanecieron 24 horas antes de fijarlas con DMEM sin SFB ni antibiótico-antimicótico.

## **TECNICA DE INMUNOPEROXIDASA**

Las células cultivadas en los cubreobjetos de cristal fueron fijadas con paraformaldehído al 4%, durante 10 minutos, lavando a continuación con una solución tampón fosfato (PBS) dos veces durante 5 minutos. Seguidamente, se permeabilizaron las células con una solución al 0,1% de tritón X-100 (Sigma) y tampón Tris-fosfato (TBS) a pH=7,6 durante 5 minutos. Se lavaron dos veces con la solución de TBS, y se procedió a incubar durante 15 minutos con una solución de bloqueo al 5% de suero normal de cabra (SNC) (Vector, Burlingame, CA, USA) y 0,001% de tritón X-100 en TBS, para inhibir las uniones inespecíficas. Seguidamente, se añadió el anticuerpo primario, en su caso el anti-FGF-2 diluido 1:50, o el anti-VEGF diluido 1:50, en una solución de TBS al 0,001% de tritón X-100 y 5% de SNC, dejándolos toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se procedió a realizar dos lavados con TBS, incubando a continuación con los anticuerpos secundarios, Biotin conjugated Goat x Rabbit IgG (Zymed, San Francisco, CA, USA) en el caso del anti-FGF-2, y Biotin conjugated Goat x Mouse IgG (Zymed) en el caso del anti-VEGF, durante 45 minutos a temperatura ambiente. Una vez terminada la incubación, se realizaron dos lavados con TBS antes de añadir el complejo avidina-biotina (ABC) (ABC Staining System; Santa Cruz Biotechnology), para amplificar la señal, dejándolo 45 minutos a temperatura ambiente, y realizando después los correspondientes lavados con TBS. Para el revelado se utilizó un cromógeno, el tetrahidrocloruro de 3-3' diaminobencidina (DAB) (DAB Substrate System; Dako), que actúa como substrato para la peroxidasa conjugada con los anticuerpos secundarios. Esto da lugar a un precipitado insoluble y coloreado, revelando de esta manera los sitios a los que el anticuerpo primario se ha unido. Dejamos actuar la DAB durante 3 minutos, parando la reacción con agua destilada. Una vez revelados, los cubreobjetos se sumergieron durante 5 segundos en hematoxilina (Dako) para dar una coloración de contraste. Después, se realizó la deshidratación sumergiendo los

cubreobjetos, primero en alcohol al 96%, después en alcohol al 100% y por último en xilol para poder montar los cubreobjetos en portaobjetos con medio de montaje DePeX (BDH, Poole, Inglaterra). Una vez montados, los cubreobjetos se fotografiaron con una cámara fotográfica Olympus C5060 en un microscopio óptico.

Los controles negativos se hicieron en cubreobjetos que fueron incubados sin el anticuerpo primario, realizando el resto del protocolo de la misma manera.

## **TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA**

Las células cultivadas en los cubreobjetos de cristal fueron fijadas con paraformaldehído al 4%, durante 10 minutos, lavando a continuación con PBS dos veces durante 5 minutos. Luego, se permeabilizaron las células con una solución al 0,1% de tritón X-100 y TBS a pH=7,6 durante 5 minutos, y se lavaron dos veces con la solución de TBS. Posteriormente, se incubaron durante 15 minutos con una solución de bloqueo al 5% de SNC y 0,001% de tritón X-100 en TBS, para inhibir las uniones inespecíficas. Después se añadió el anticuerpo primario anti-*nestina* diluido 1:50 en una solución de TBS al 0,001% de tritón X-100 y 5% de SNC, dejándolo toda la noche a 4°C. Al día siguiente se procedió a realizar dos lavados con TBS, incubando a continuación con el anticuerpo secundario Alexa fluor 488 chicken anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) durante 45 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz; una vez terminada la incubación se realizaron dos lavados con TBS, y se procedió a su montaje en portaobjetos con el medio acuoso Mowiol (Sigma) conteniendo colorante Hoescht (Sigma), un colorante vital que tiñe inespecíficamente todos los núcleos celulares. Los resultados se analizaron y fotografiaron con una cámara fotográfica Olympus C5060 en el microscopio de fluorescencia. Las imágenes obtenidas se procesaron con el programa informático Adobe Photoshop CS2 (Adobe systems incorporated, USA) para combinarlas.

Los controles negativos se hicieron en cubreobjetos que fueron incubados sin el anticuerpo primario, realizando el resto del protocolo de igual modo.

## **TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA DOBLE**

Se realizó un doble marcaje en las células con los anticuerpos primarios, anti-pan citoqueratinas, y anti-vimentina. Las células cultivadas en los cubreobjetos de cristal fueron fijadas con paraformaldehído al 4%, durante 10 minutos, lavando a continuación con PBS dos veces durante 5 minutos. Luego se permeabilizaron las células con una solución al 0,1% de tritón X-100 y tampón TBS a pH=7,6 durante 5 minutos, y se lavaron dos veces con la solución de TBS. A continuación, se procedió a incubar durante 15 minutos con una solución de bloqueo al 5% de SNC y 0,001% de tritón X-100 en TBS, para inhibir las uniones inespecíficas. Después, se añadió el anticuerpo primario policlonal anti-pan citoqueratinas conjugado con FITC diluido 1:50 en una solución de TBS al 0,001% de tritón X-100 y 5% de SNC, dejándolo durante 1 hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se realizaron dos lavados con TBS, y se añadió el otro anticuerpo primario anti-vimentina diluido 1:100 en una solución de TBS al 0,001% de tritón X-100 y 5% de SNC, incubando toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron dos lavados con TBS, incubando a continuación con el anticuerpo secundario Alexa fluor 594 chicken anti-mouse IgG durante 45 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Una vez terminada la incubación se realizaron dos lavados con TBS, y se procedió al montaje de los cubreobjetos en portaobjetos con medio acuoso Mowiol conteniendo colorante Hoescht. Los resultados se analizaron y fotografiaron con una cámara fotográfica Olympus C5060 en el microscopio de fluorescencia. Las imágenes obtenidas se procesaron con el programa informático Adobe Photoshop CS2 (Adobe systems incorporated, USA) para combinarlas.

Los controles negativos se hicieron en cubreobjetos que fueron incubados sin los anticuerpos primarios, realizando el resto del protocolo del mismo modo.

## **CITOMETRIA DE FLUJO**

La citometría de flujo se realizó en un citómetro de flujo FACSort (Becton/Dickinson Biosciences; BDB, San José, CA, USA) con dos láseres de emisión a 488 nm y 650 nm y cuatro detectores de fluorescencia (FL1, FL2, FL3, y FL4). Las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos. Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron los siguientes: CD45 conjugado con FITC (Serotec, Oxford, UK); CD117 conjugado con ficoeritrina (PE) (BDB); HLA-DR

conjugado con proteína clorofila peridina (PercP) (BDB); CD34 conjugado con alofocianina (APC) (BDB); CD34 conjugado con FITC (BDB); CD34 conjugado con PE (BDB) y CD13 conjugado con PE (Dako).

Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células fueron incubadas en suspensión a temperatura ambiente durante 10 minutos con los anticuerpos mencionados. Los controles negativos fueron realizados con un control de isotipos de inmunoglobulinas de ratón. La adquisición de los datos fue realizada con el citómetro FACSsort, utilizando como soporte informático el programa CELLQuest PRO (BDB) adquiriendo al menos  $2 \times 10^4$  eventos por tubo. El análisis de los datos se realizó con el programa informático Paint-A-Gate (BDB). Para evaluar cuantitativamente la expresión de los antígenos utilizados, se calculó la media de la intensidad de fluorescencia (MFI), expresada en unidades lineales y arbitrarias, en una escala de 0 a 1023. Una población celular fue considerada como positiva para un marcador determinado cuando su MFI era mayor que la MFI más tres veces la desviación estándar de la autofluorescencia obtenida para la misma población celular.

## **VALORACION DE LAS CONCENTRACIONES DE FGF-2 Y VEGF EN LOS CULTIVOS CELULARES**

Se valoraron las concentraciones de FGF-2 y VEGF en los sobrenadantes de los medios de cultivos de células mesoteliales y células fibroblásticas mediante un ensayo de inmunoabsorbancia (ELISA). Para ello se sembraron las células en una placa multipocillo de 24 pocillos a una densidad de  $20 \times 10^4$  células por pocillo, dejándolas proliferar 4 días. El medio de cultivo utilizado fue DMEM, SFB al 10% y antibiótico-antimicótico al 1% y se cambió cada dos días. Una vez pasados los 4 días, el medio de cultivo se cambió por DMEM sin SFB ni antibióticos durante 24 horas, tras las cuales se retiró el DMEM de los pocillos recogiendo en tubos de centrifuga, y se centrifugó a  $300 \times g$  durante 10 minutos para eliminar restos celulares. Terminada la centrifugación, se recogió el sobrenadante y se congeló a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

Para medir la concentración de FGF-2 y VEGF que tenían los sobrenadantes de los medios de cultivos, se descongelaron las muestras y se realizaron ELISAs para el FGF-2 y para el VEGF empleando sendos kits comerciales, siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). La absorbancia se determinó en un lector de placas a una longitud de onda de 490 nm para el FGF-2 y a una longitud de onda

de 450 nm para el VEGF. Los datos se expresaron en pg de proteína por ml. Como medio control se utilizó DMEM.

## ANGIOGENESIS *in vivo*

Los estudios realizados con animales fueron realizados de acuerdo con las normas establecidas por la Unión Europea para el manejo y manipulación de animales de experimentación.

Para el estudio de angiogénesis *in vivo*, se utilizaron 17 ratas Sprague-Dawley de 250-300 g. Para anestesiarlas, se les inyectó por vía intraperitoneal una mezcla de ketamina (Pfizer, Alcobendas, España) (25 mg/ml), valium (Roche Farma, Leganes, España) (2 mg/ml) y atropina (B.Braun medical s.a., Rubí, España) (0,1 mg/ml) a una dosis de 3 ml/Kg. A continuación, se realizó un implante de esponjas de colágena estériles de 10x10x10 mm (Curaspon Dental, Clinimed Holding, Zwanenbourg, Holanda) (Fig.11), en un bolsillo subcutáneo abierto en la zona dorsal (Fig.12).

Las esponjas contenían los siguientes tratamientos:

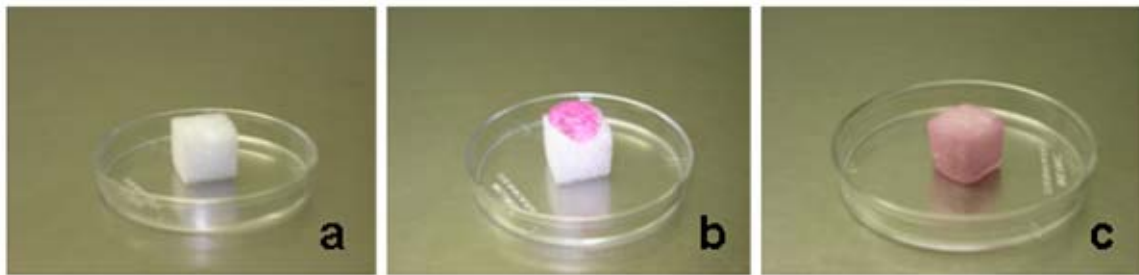
Grupo A (n=9), grupo vehículo, 200 µl de DMEM.

Grupo B (n=4), 200 µl de una suspensión celular con  $75 \times 10^3$  células mesoteliales en DMEM.

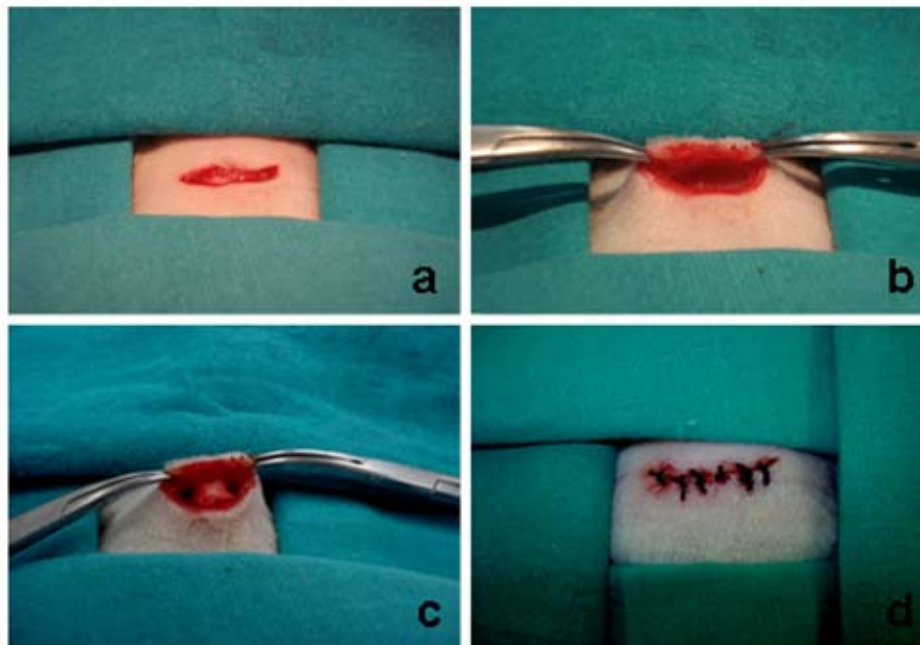
Grupo C (n=4), 200 µl de una suspensión celular con  $75 \times 10^3$  células fibroblásticas en DMEM.

Con la finalidad de que se absorbiese todo el volumen añadido a las esponjas, estas se incubaron con los tratamientos durante 2 horas en condiciones estériles, en un incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Una vez implantada la esponja se suturó la piel. Tras 7 días de evolución, los animales se volvieron a anestesiar, y las esponjas fueron extraídas para su estudio histológico.



**Figura 11.** *a) Esponja de colágena estéril de 10x10x10 mm. b) Tratamiento aplicado a la esponja en un volumen de 200  $\mu$ l. c) Esponja con el tratamiento absorbido tras 2 horas de incubación.*



**Figura 12.** *a) Incisión superficial en el dorso de la rata. b) Realización del bolsillo subcutáneo. c) Implante subcutáneo de la esponja. d) Sutura del bolsillo subcutáneo.*

## HISTOLOGIA

### FIJACION E INCLUSION EN PARAFINA

Tras su extracción, las esponjas fueron fijadas por inmersión en paraformaldehído al 4% durante 3 días, antes de su inclusión en parafina. Para ello, se realizaron dos lavados de 30 minutos en PBS. A continuación, se deshidrataron las muestras con diferentes lavados en alcohol a concentraciones crecientes: dos lavados de 30 minutos en alcohol al 70%, seguidos de dos lavados de 30 minutos en alcohol al 80%, y del mismo modo con alcohol al 96% y con alcohol al 100%. Después, se pasaron las muestras a xilol durante

aproximadamente 1 hora, realizando dos cambios hasta que las muestras comenzaron a transparentarse, momento en el que se pasaron al primer baño en parafina en una estufa a 60°C; pasadas 2 horas, se cambiaron al segundo baño en parafina en una estufa a 60°C, dejándolas durante toda la noche. Al día siguiente, se pasaron las muestras a unos moldes donde se realizó un tercer baño de parafina en una estufa a 60°C. Con esa misma parafina se hicieron los bloques para poder cortarlos en el microtomo. Para ello, se sacaron de la estufa y se enfriaron en hielo, de manera que solidificase la parafina.

Una vez realizados, los bloques de parafina se cortaron en el microtomo en secciones de 5 a 7  $\mu\text{m}$ ; los cortes se pusieron en un baño con agua destilada a 45°C, y se recogieron en portaobjetos de silano, almacenándolos en una estufa a 37°C, hasta que se colorearon con hematoxilina-eosina, o se realizaron las técnicas inmunohistoquímicas.

## **COLORACION CON HEMATOXILINA-EOSINA**

Para la coloración de los cortes con hematoxilina-eosina, se procedió a la desparafinización de los cortes, sumergiendo los portaobjetos en una cubeta con xilol durante 10 minutos, dos veces. A continuación, se rehidrataron sumergiéndolos durante 5 minutos en cubetas con alcoholes de concentración decreciente, comenzando con alcohol al 100%, siguiendo con alcohol al 96%, alcohol al 80%, alcohol al 70%, y alcohol al 50%, pasando por último a una cubeta con agua destilada.

Una vez rehidratados los cortes, se sumergieron en una cubeta con hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Germany) durante 7 minutos. A continuación, se pasaron a una cubeta con agua 5 minutos y se sumergieron en solución etanol-clorhídrico (ácido clorhídrico 0,07 N en etanol al 70%) durante 30 segundos. Seguidamente se lavaron con agua y se sumergieron en bicarbonato sódico durante 30 segundos, pasándolos a agua de nuevo durante 5 minutos, y posteriormente a alcohol al 80% otros 5 minutos. Después, se sumergieron en eosina 3 minutos, pasándolos después a alcohol al 96% 5 minutos, alcohol al 100% 5 minutos, y xilol durante 10 minutos; por último se montaron los portaobjetos cubriéndolos con un cubreobjetos de cristal con medio de montaje DePeX. Una vez montados, los cortes histológicos se analizaron y fotografiaron con una cámara fotográfica Olympus C5060 en el microscopio óptico.

## TECNICA INMUNOHISTOQUIMICA

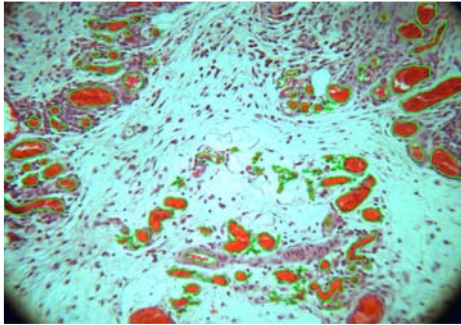
Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anticuerpo monoclonal anti-Ki67 (Dako), anticuerpo monoclonal anti-CD34 humano, y anticuerpo monoclonal anti-citoqueratinas humano, clon AE1/AE3 (Dako).

Para la realización de las técnicas inmunohistoquímicas, se pusieron los cortes histológicos en una estufa a 60°C durante 30 minutos. Después se procedió a desparafinar, sumergiendo los portaobjetos en una cubeta con xilol durante 10 minutos, dos veces. A continuación se rehidrataron sumergiéndolos en cubetas con alcoholes de concentración decreciente, comenzando con alcohol al 100% 5 minutos, siguiendo con alcohol al 96% 5 minutos, alcohol al 80% 5 minutos, alcohol al 70% 5 minutos, y alcohol al 50% 5 minutos, pasando por último a una cubeta con agua destilada. El desenmascaramiento antigénico se realizó introduciendo los cortes histológicos en una olla a presión, en una solución de citrato sódico a pH=6, dejándolos durante 3 minutos a máxima presión, esperando después unos 45 minutos a que los cortes se atemperen para poder continuar con el protocolo. A continuación, se hicieron dos lavados antes de poner los cortes en una cubeta con una solución de metanol con agua oxigenada al 0,5% durante 10 minutos para inhibir las peroxidases endógenas que pudieran dar lugar a falsos positivos. Terminado este paso, se realizaron dos lavados en TBS a pH=7,6 y se procedió a incubar durante 1 hora con una solución de bloqueo al 5% de SNC y 0,001% de tritón X-100 en TBS, para inhibir las uniones inespecíficas. Terminada la incubación con la solución de bloqueo, se procedió a añadir los anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal anti-Ki67 dilución 1:50, anticuerpo monoclonal anti-CD34 humano 1:50, o anticuerpo monoclonal anti-citoqueratinas humano 1:50 y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron los cortes histológicos dos veces con TBS, antes de añadir el anticuerpo secundario que, para estos tres anticuerpos primarios, fue el mismo: Biotin conjugated Goat x Mouse IgG, y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se lavaron dos veces con TBS, y se añadió el complejo ABC, para amplificar la señal, dejándolo a temperatura ambiente 1 hora; posteriormente se realizaron dos lavados con TBS. Para el revelado se empleó DAB, dejándola actuar durante 7 minutos, parando la reacción con agua. Para la coloración de contraste, se sumergieron los cortes durante 30 segundos en hematoxilina, antes de proceder a la deshidratación, sumergiendo los cortes histológicos, primero en alcohol al 96% durante 5 minutos, después en alcohol al 100% 5 minutos y por último en xilol 20 minutos, para poder montar los portaobjetos con medio de montaje

DePeX. Una vez montados los portaobjetos se analizaron y fotografiaron con una cámara fotográfica Olympus C5060 en el microscopio óptico.

Los controles negativos se hicieron en cortes histológicos que fueron incubados sin el anticuerpo primario, realizando el resto del protocolo por igual.

## EVALUACION DE LA NEOVASCULARIZACION



**Figura 13.** *Contaje del número de vasos en una imagen adquirida con el programa de histomorfometría Motic Images Advanced 3.0.*

Los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, tanto de las esponjas con vehículo como de los grupos de las esponjas con células mesoteliales o fibroblásticas, fueron analizados para determinar el número de vasos sanguíneos y el porcentaje del área de vascularización. Para ello se cogieron 3 preparaciones histológicas de cada esponja y se adquirieron, con una resolución de 800x600 píxeles, cinco campos visuales con el objetivo x20 del microscopio óptico usando la cámara MoticCam 1300 (Micro-Optic Industrial Group Co., Ltd) con el programa informático de histomorfometría Motic Images Advanced 3.0 (Micro-Optic Industrial Group Co., Ltd). Una vez adquiridas todas las imágenes, se procedió a realizar las medidas con el programa Motic Images Advanced 3.0 (Fig.13).

## ANALISIS ESTADISTICO

El programa informático InStat 2.0 (GraphPad software, Inc. San Diego, USA) fue utilizado para realizar los análisis estadísticos. Se efectuaron dos tipos de análisis estadísticos. Cuando se analizaron dos grupos se empleó el análisis *t* de Student, análisis paramétrico que asume poblaciones gaussianas y con iguales desviaciones estándar. Cuando se analizaron más de dos grupos se empleó un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, utilizando el post-test Student-Newmann-Keuls. Se consideró un valor de *p* inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ) como significativo, un valor de *p* inferior a 0,01 ( $p < 0,01$ ) como muy significativo y un valor de *p* inferior a 0,001 ( $p < 0,001$ ) como extremadamente

significativo. Los resultados fueron representados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).

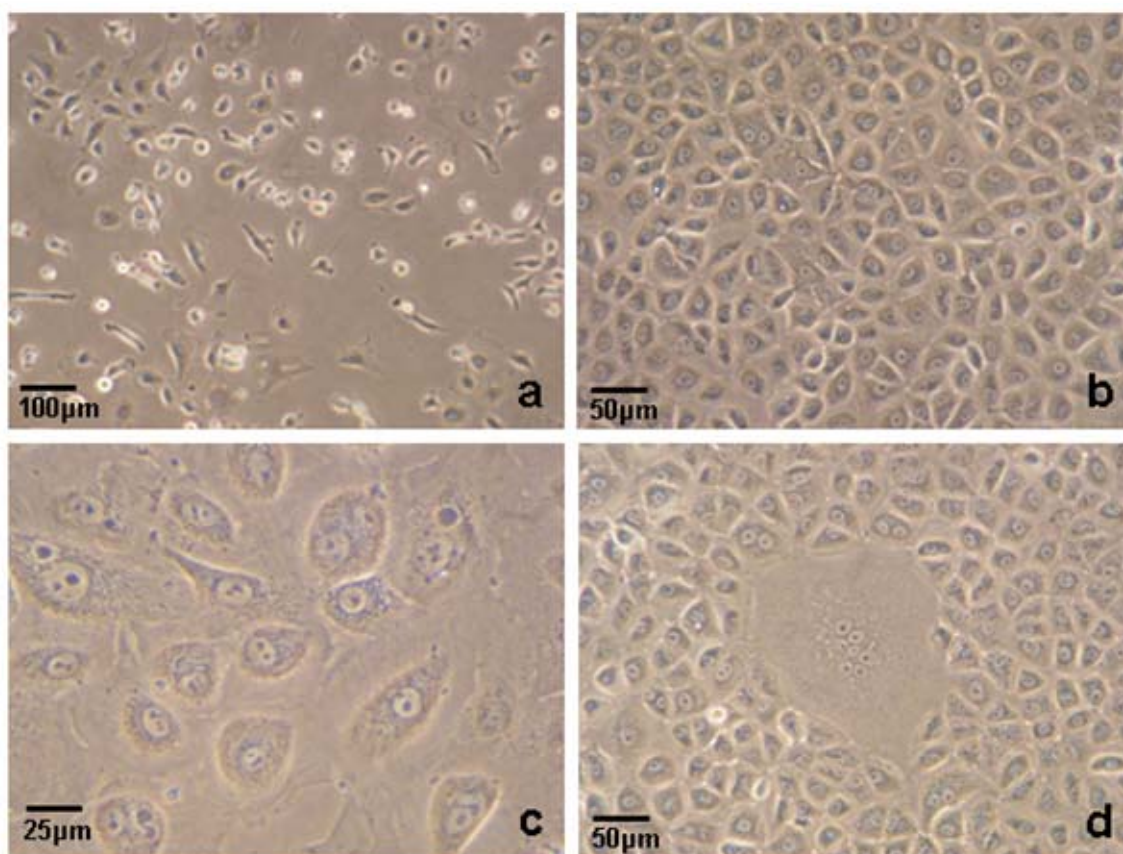
**- RESULTADOS -**

## CULTIVOS CELULARES

### MORFOLOGIA CELULAR

#### Células mesoteliales

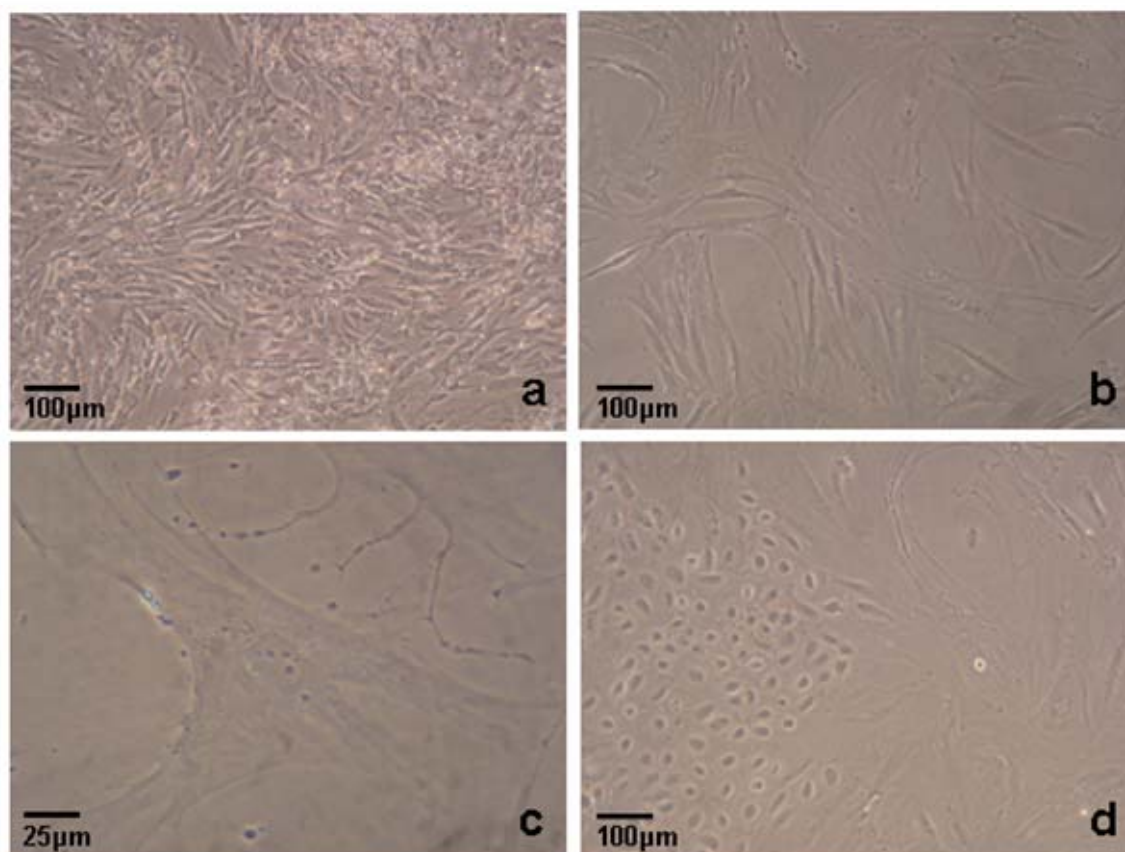
Las células mesoteliales obtenidas tras la primera digestión enzimática de las muestras de omentum mostraron una gran capacidad de proliferación, llegando a confluir entre los días 4 y 6, y se expandieron hasta el quinto subcultivo. Al confluir, estas células presentaban una morfología típica de empedrado en un microscopio de contraste de fases (Fig.14b). No se observaron grandes diferencias entre el primer y cuarto subcultivo, aunque a partir del tercero, comenzaron a aparecer algunas células grandes y polinucleadas; esta morfología es típica de células senescentes (Fig.14d).



**Figura 14.** Fotografías de cultivos de células mesoteliales. Microscopía de contraste de fases. **a)** Cultivo de células mesoteliales en expansión. **b)** Cultivo de células mesoteliales donde se aprecia la forma de empedrado que adquieren las células al confluir. **c)** Morfología cuboidal de las células mesoteliales. **d)** Célula polinucleada de gran tamaño (morfología típica de célula senescente).

### Células de tipo fibroblástico

En los cultivos de tipo fibroblástico, aislados después de una segunda digestión de la muestra de omentum, y tras cambiar el medio a las 24 horas para seleccionar las células adherentes, se comprobó como su capacidad de proliferación hasta llegar a confluir fue de 4 a 6 días, similar a las células mesoteliales; en algunos subcultivos este periodo de tiempo llegó a los 8, 9 días. Poseen una morfología fusiforme típica de fibroblastos. En el cultivo primario las células eran pequeñas, entrelazándose unas con otras al llegar a confluir (Fig.15a), mientras que en los subcultivos se observó como las células iban aumentando su tamaño. También se obtuvieron algunos cultivos mixtos (Fig.15d), apreciándose las diferencias en la morfología de estos dos tipos celulares. Estos cultivos no fueron utilizados para la realización de los experimentos.



**Figura 15.** Fotografías de cultivos de células fibroblásticas. Microscopía de contraste de fases. **a)** Cultivo de células fibroblásticas entrelazadas al llegar a confluir en el cultivo primario. **b)** Cultivo de células fibroblásticas donde se aprecia la morfología fusiforme. **c)** Fotografía de una célula fibroblástica. **d)** Cultivo mixto de fibroblastos y células mesoteliales. En esta fotografía podemos apreciar la diferencia de tamaño y morfología de los dos tipos celulares.

## EXPRESION DE FILAMENTOS INTERMEDIOS

### Células mesoteliales

En los resultados obtenidos con la técnica de la inmunofluorescencia doble realizada para citoqueratinas y vimentina, se comprobó que todos los cultivos de células mesoteliales coexpresaban ambos filamentos intermedios, tanto en el cultivo primario como en el resto de los subcultivos (Fig.16c). Estos estudios confirmaron el fenotipo típico de las células mesoteliales, como es poseer características de células epiteliales (expresión de filamentos intermedios de citoqueratinas) y de células mesenquimales (expresión de filamentos intermedios de vimentina).

Por otra parte, se comprobó la existencia de algunas células en estos cultivos que expresaban intensamente filamentos intermedios de nestina (Fig.16d y 16e).

### Células de tipo fibroblástico

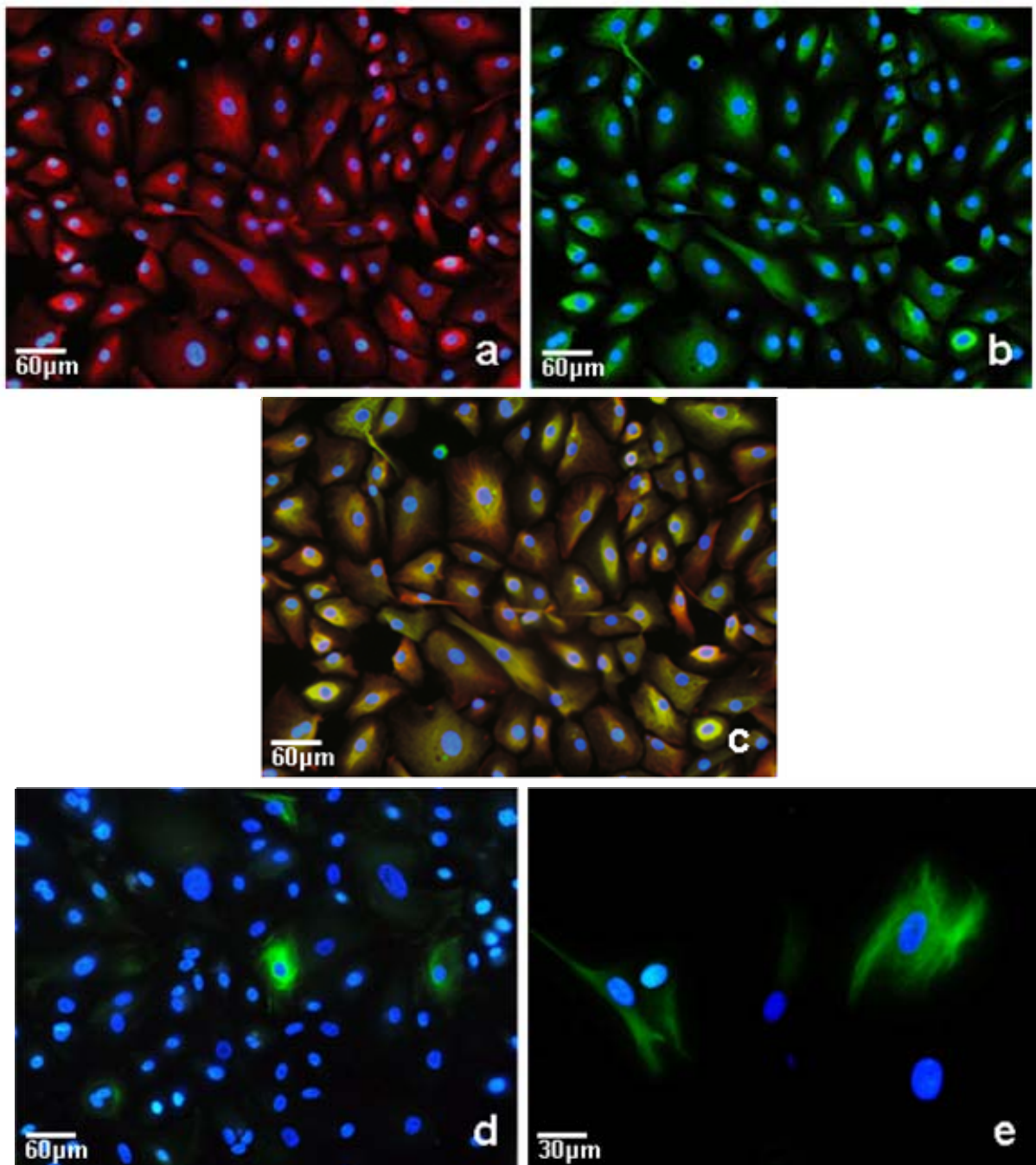
La técnica de la inmunofluorescencia doble, realizada para citoqueratinas y vimentina, reveló que los cultivos de células de tipo fibroblástico expresaban vimentina y no expresaban citoqueratinas, confirmándose esta característica de las células mesenquimales, aunque se observó la presencia de un escaso número de células positivas para vimentina y citoqueratinas (Fig.17c).

La técnica de inmunofluorescencia, realizada para la detección de nestina, resultó positiva en algunas células del cultivo, como ocurrió con las células mesoteliales (Fig.17d y 17e).

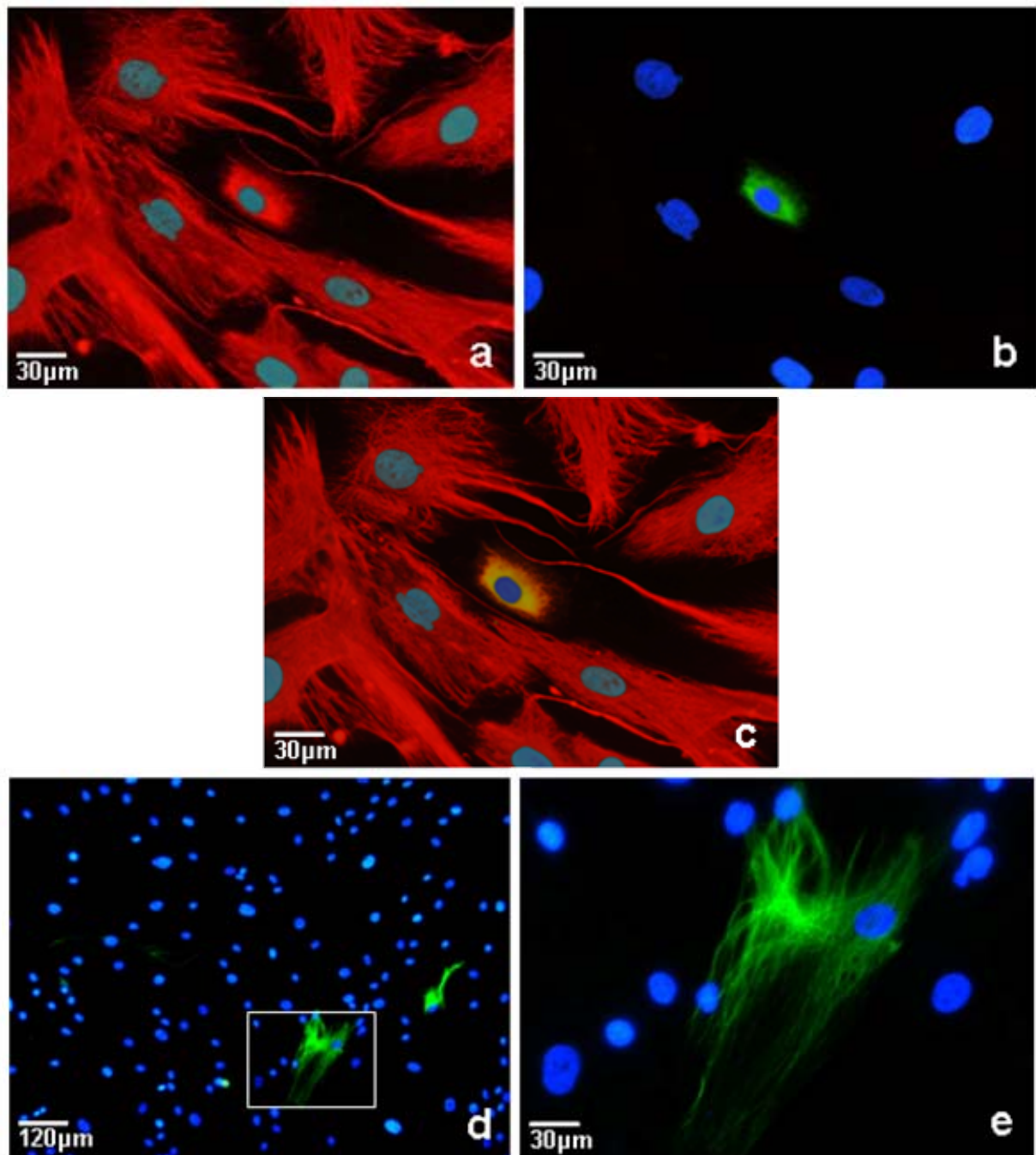
La siguiente tabla muestra la expresión de los filamentos intermedios de las células en cultivo.

Filamentos intermedios	Células mesoteliales	Células fibroblásticas
Vimentina	+++	+++
Citoqueratinas	+++	+
Nestina	+	+

**Tabla 3.** En esta tabla se resume la detección de filamentos intermedios observada en las células en cultivo, tanto en los cultivos de células mesoteliales como en los cultivos de las células fibroblásticas. +++ Indica expresión en 100% de las células del cultivo. + Indica <5% de expresión en las células del cultivo.



**Figura 16.** Visualización de la expresión de vimentina y citoqueratinas en cultivos de células mesoteliales mediante la técnica de inmunofluorescencia doble. Microscopía de fluorescencia. **a)** Expresión de vimentina (rojo), observándose que todas las células son positivas para este filamento intermedio; los núcleos marcados con Hoescht aparecen en azul. **b)** Expresión de citoqueratinas (verde), observándose que todas las células son positivas para este filamento intermedio; los núcleos marcados con Hoescht pueden verse en azul. **c)** Combinación de las fotografías a) y b) donde se observa la expresión de vimentina y citoqueratinas en la misma imagen. Las células que coexpresan ambos filamentos intermedios muestran un color amarillo como consecuencia de la fusión de ambas fluorescencias; como se puede ver todas las células coexpresan vimentina y citoqueratinas; los núcleos marcados con Hoescht pueden verse en azul. **d)** Se puede observar la expresión de nestina (verde) en algunas células mesoteliales; los núcleos marcados con Hoescht aparecen en azul. **e)** Expresión de nestina (verde) en algunas células mesoteliales vistas a mayor aumento.



**Figura 17.** Visualización de la expresión de vimentina y citoqueratinas en cultivos de células fibroblásticas mediante la técnica de inmunofluorescencia doble. **a)** Expresión de vimentina (rojo), observándose que todas las células son positivas para este filamento intermedio; los núcleos marcados con Hoescht pueden verse en azul. **b)** Expresión de citoqueratinas (verde), observándose una célula positiva para este filamento intermedio; los núcleos marcados con Hoescht se visualizan en azul. **c)** Combinación de las fotografías a) y b) donde se observa la expresión de vimentina y citoqueratinas en la misma imagen. La célula que coexpresa ambos filamentos intermedios muestra un color amarillo como consecuencia de la fusión de ambas fluorescencias; como se puede ver solo hay una célula que coexpresa vimentina y citoqueratinas; los núcleos marcados con Hoescht aparecen en azul. **d)** Se puede observar la expresión de nestina (verde) en algunas células fibroblásticas; los núcleos marcados con Hoescht pueden verse en azul. **e)** Fotografía a mayor aumento de la zona recuadrada en la fotografía d) donde puede verse en detalle la expresión de nestina (verde) en una célula fibroblástica; los núcleos marcados con Hoescht aparecen en azul.

## EXPRESION DE MARCADORES

### Células mesoteliales

Al analizar las células mesoteliales por citometría de flujo, se observó que estas células se distribuían de manera homogénea como una única población celular. Fueron negativas para los marcadores CD34 (antígeno de membrana que se expresa selectivamente en células progenitoras hematopoyéticas humanas), CD13 (aminopeptidasa N, es una peptidasa que se encuentra en la membrana de algunos tipos celulares), CD45 (marcador pan-leucocitario), CD117 (receptor tirosin quinasa que se suele utilizar para identificar células progenitoras de la médula ósea) y HLA-DR (molécula de histocompatibilidad tipo II) en todos los subcultivos analizados (Fig.18).

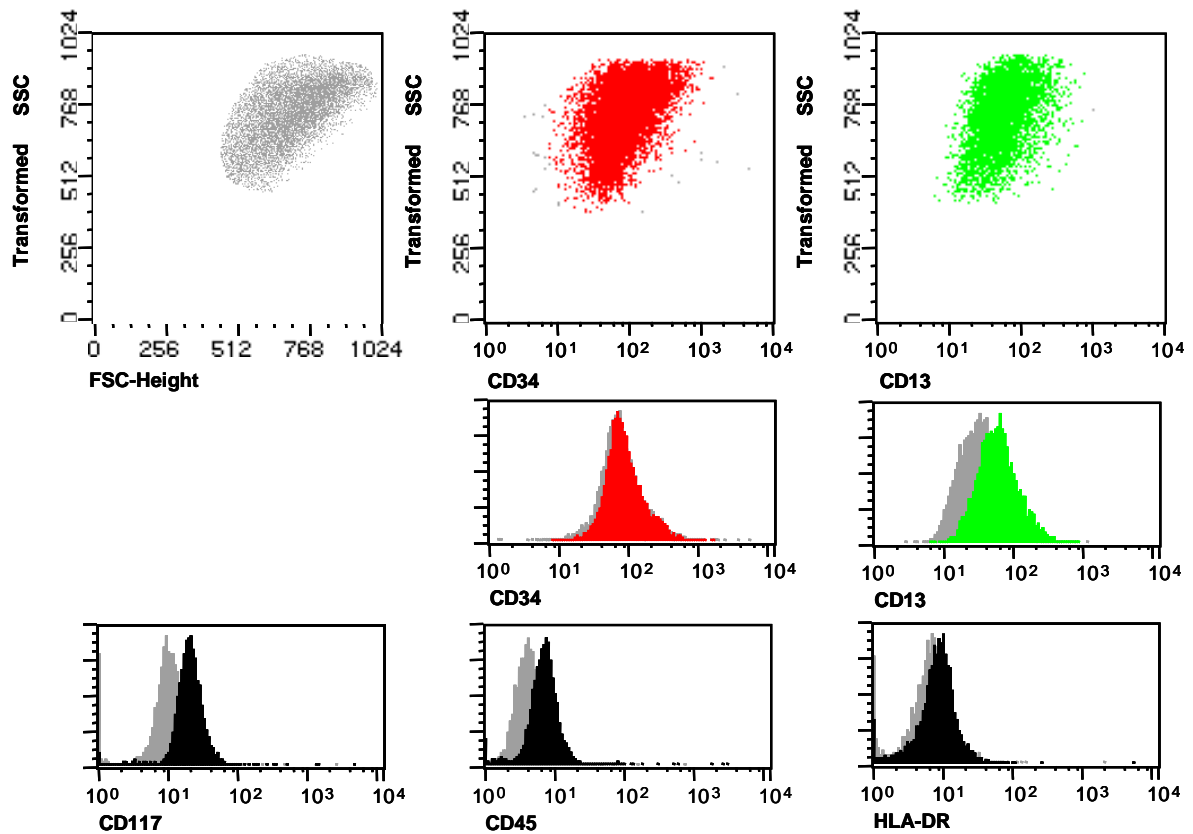
### Células de tipo fibroblástico

Al analizar las células fibroblásticas por citometría de flujo, también se observó una distribución homogénea de las células como una única población celular. Fueron negativas para los marcadores CD45, CD117 y HLA-DR, y positivas para CD13 y CD34 en todos los subcultivos (Fig.19). Se utilizó el CD34 conjugado con varias fluorescencias para corroborar los resultados obtenidos con este marcador.

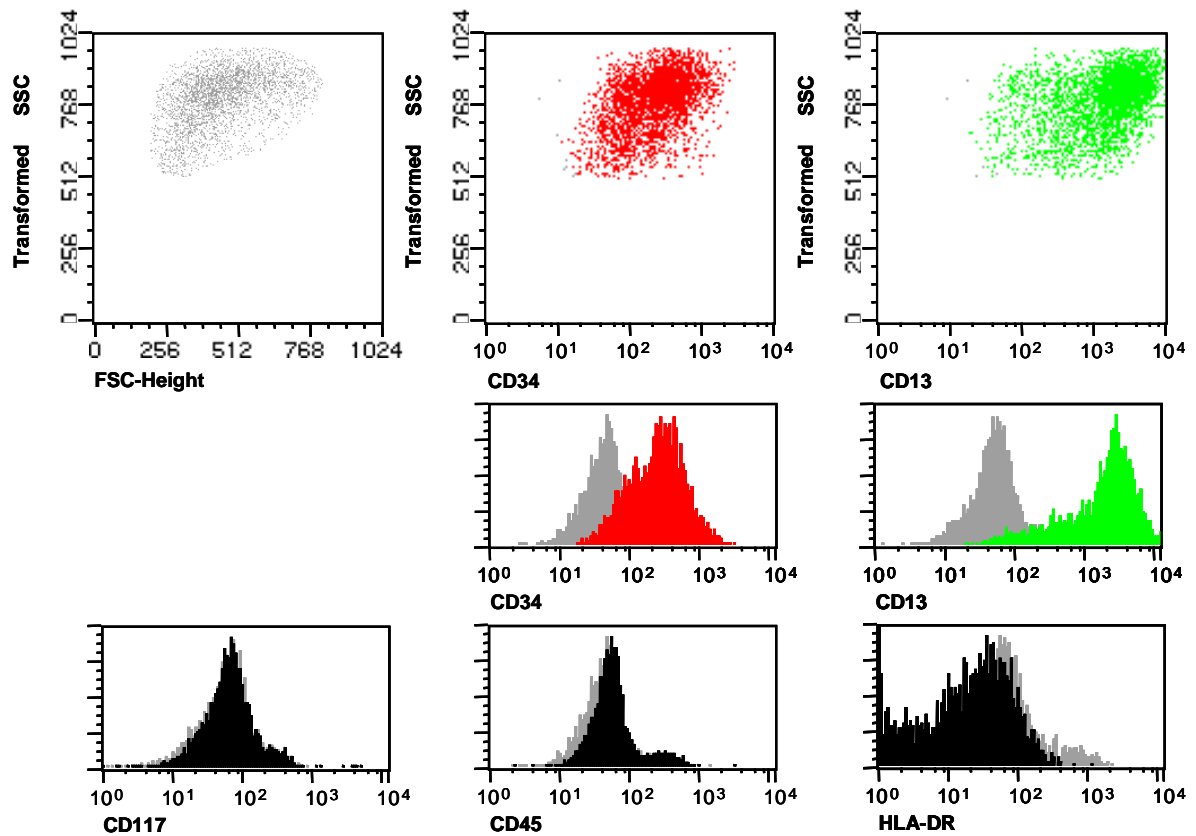
La siguiente tabla muestra la expresión de los marcadores detectados por citometría de flujo en los cultivos celulares.

	Células Mesoteliales	Células fibroblásticas
<b>CD45</b>	-	-
<b>CD117</b>	-	-
<b>HLA-DR</b>	-	-
<b>CD34-FITC</b>	X	+
<b>CD34-PE</b>	-	+
<b>CD34-APC</b>	-	+
<b>CD13</b>	-	+

**Tabla 4.** En esta tabla, se resume la expresión de los marcadores utilizados en la citometría de flujo en los cultivos de células mesoteliales y en los cultivos de las células fibroblásticas. + Indica >90% expresión del marcador. - Indica ausencia de expresión del marcador. X Indica la no utilización de ese marcador.



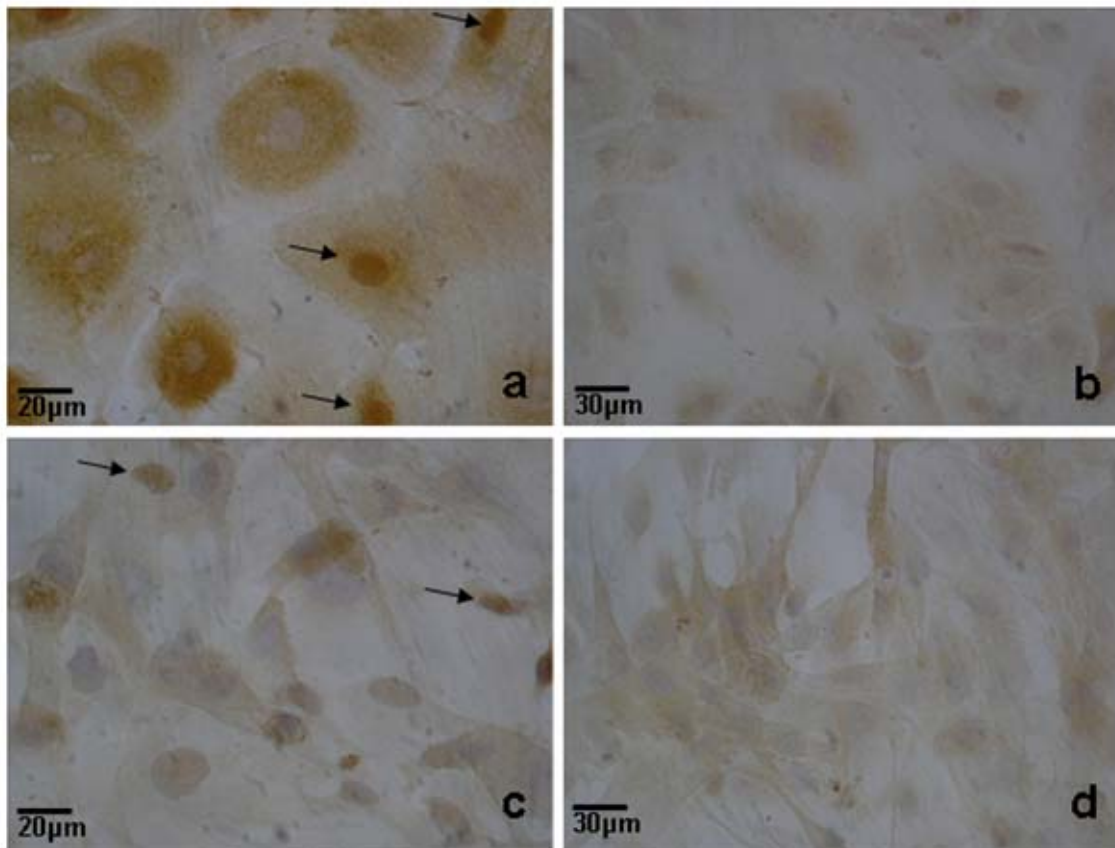
**Figura 18.** Diagramas de dispersión e histogramas representativos de los resultados obtenidos en la citometría de flujo realizada con las células mesoteliales. En el primer diagrama de dispersión se puede ver el tamaño y complejidad de las células, observándose una distribución homogénea, como corresponde a una única población celular. En el segundo y tercer diagrama de dispersión se puede observar como la población celular es negativa para CD34 (rojo) y para CD13 (verde), representado también en los histogramas inferiores, en donde se puede ver como el marcador es negativo respecto a la autofluorescencia basal de estas células (gris). En los siguientes tres histogramas se puede ver como las células mesoteliales son negativas para CD117, CD45 y HLA-DR (negro).



**Figura 19.** Diagramas de dispersión e histogramas representativos de los resultados obtenidos en la citometría de flujo realizada con las células fibroblásticas. En el primer diagrama de dispersión se puede ver el tamaño y complejidad de las células, observándose una distribución homogénea, como corresponde a una única población celular. En el segundo y tercer diagrama de dispersión se observa el marcaje positivo en la población celular para CD34 (rojo) y para CD13 (verde), representado también en los histogramas inferiores, en donde se puede ver la positividad del marcador respecto a la autofluorescencia basal de estas células (gris). En los tres histogramas siguientes se puede ver como la población de células fibroblásticas es negativa para CD117, CD45 y HLA-DR (negro).

## EXPRESION DE FGF-2 Y VEGF

Los ensayos realizados con la técnica de la inmunoperoxidasa revelaron que tanto las células mesoteliales como las células fibroblásticas expresaban FGF-2 y VEGF (Fig.20). En el caso del FGF-2, se detectaron células, tanto mesoteliales como fibroblásticas, que mostraban una localización nuclear de este factor (Fig.20a y 20c).



**Figura 20.** Fotografías que muestran la expresión de FGF-2 y VEGF en células mesoteliales y fibroblásticas en cultivo. Microscopía óptica. **a)** Expresión de FGF-2 en células mesoteliales (células teñidas de marrón) donde se puede ver su localización nuclear en alguna célula del cultivo como indican las flechas. **b)** Expresión de VEGF en células mesoteliales (células teñidas de marrón). **c)** Expresión de FGF-2 en células fibroblásticas (células teñidas de marrón) donde se puede ver su localización nuclear en varias células del cultivo como indican las flechas. **d)** Expresión de VEGF en células fibroblásticas (células teñidas de marrón).

## VALORACION DE LAS CONCENTRACIONES DE FGF-2 Y VEGF

Mediante los ensayos de inmunoabsorbancia (ELISA), se demostró la producción y liberación al medio de FGF-2 y VEGF por las células mesoteliales y las células fibroblásticas. Tanto en los sobrenadantes de los cultivos de células mesoteliales como en

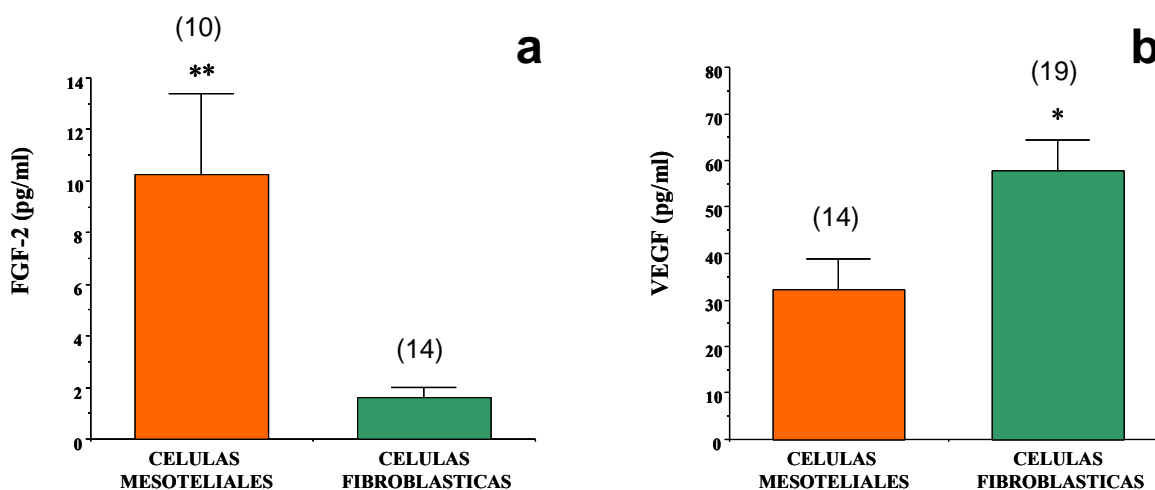
los de las células fibroblásticas se obtuvieron concentraciones más elevadas de VEGF que de FGF-2 (Tab.5).

Al comparar las concentraciones obtenidas para FGF-2 y VEGF en los cultivos de las células mesoteliales con la obtenida en los cultivos de las células fibroblásticas, se observó una concentración de FGF-2 significativamente más elevada en los cultivos de las células mesoteliales (Fig.21a). Sin embargo, en los sobrenadantes de los medios de cultivos de células fibroblásticas se obtuvieron concentraciones medias de VEGF significativamente más altas que en las células mesoteliales (Fig.21b).

La siguiente tabla muestra las concentraciones de FGF-2 y VEGF obtenidas en los sobrenadantes de los medios de cultivo.

	Células mesoteliales	Células fibroblásticas
<b>FGF-2 pg/ml</b>	10,23 ± 3,16 ** (10)	1,62 ± 0,39 (14)
<b>VEGF pg/ml</b>	32,20 ± 6,72 (14)	57,92 ± 6,71* (19)

**Tabla 5.** En esta tabla se muestran las medias +/- SEM de las concentraciones obtenidas para FGF-2 y VEGF en pg/ml. Entre paréntesis se indica el número de muestras valoradas procedentes de los cultivos de células mesoteliales obtenidos de 3 pacientes y de los cultivos de células fibroblásticas obtenidos de 3 pacientes. \*Indica una  $p < 0,05$ , \*\*indica una  $p < 0,01$  mediante un análisis t de Student no pareado.

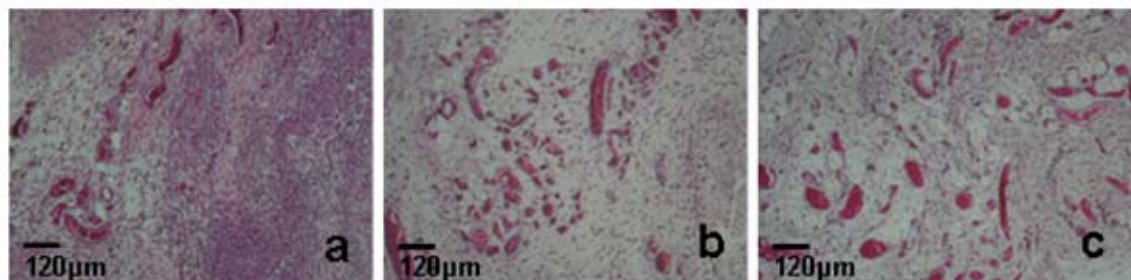


**Figura 21. a)** Comparación de las concentraciones de FGF-2 en los sobrenadantes de medios de cultivo de células mesoteliales y de células fibroblásticas. **b)** Comparación de las concentraciones de VEGF en los sobrenadantes de medios de cultivo de células mesoteliales y de células fibroblásticas. Entre paréntesis se indica el número de muestras valoradas procedentes de los cultivos de células mesoteliales obtenidos de 3 pacientes y de los cultivos de células fibroblásticas obtenidos de 3 pacientes. \* Indica una  $p < 0,05$ , \*\* indica una  $p < 0,01$  mediante un análisis t de Student no pareado.

## ANGIOGENESIS *in vivo*

### NEOVASCULARIZACION

En los cortes histológicos de las esponjas que contenían células mesoteliales o fibroblásticas de omentum humano implantadas en el dorso de las ratas, se observó una gran actividad angiogénica. La coloración con hematoxilina-eosina demostró una intensa neovascularización tras siete días de implante subcutáneo, con gran cantidad de vasos sanguíneos funcionales (aquellos que muestran presencia de eritrocitos en el lumen) (Fig.22b y 22c). En los cortes histológicos de las esponjas implantadas que sólo contenían el vehículo, se observó una escasa neovascularización con poca presencia de vasos sanguíneos funcionales (Fig. 22a). No se apreciaron evidencias de rechazo al no localizarse acúmulos de células inflamatorias en ninguno de los cortes histológicos analizados en los diferentes grupos.



**Figura 22.** Fotografías de cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. Microscopía óptica. **a)** Sección histológica de una esponja con vehículo. **b)** Sección histológica de una esponja del grupo con células mesoteliales, donde se puede apreciar gran cantidad de vasos sanguíneos funcionales. **c)** Sección histológica de una esponja del grupo con células fibroblásticas donde también se puede apreciar gran cantidad de vasos sanguíneos funcionales.

### EVALUACION DE LA NEOVASCULARIZACION

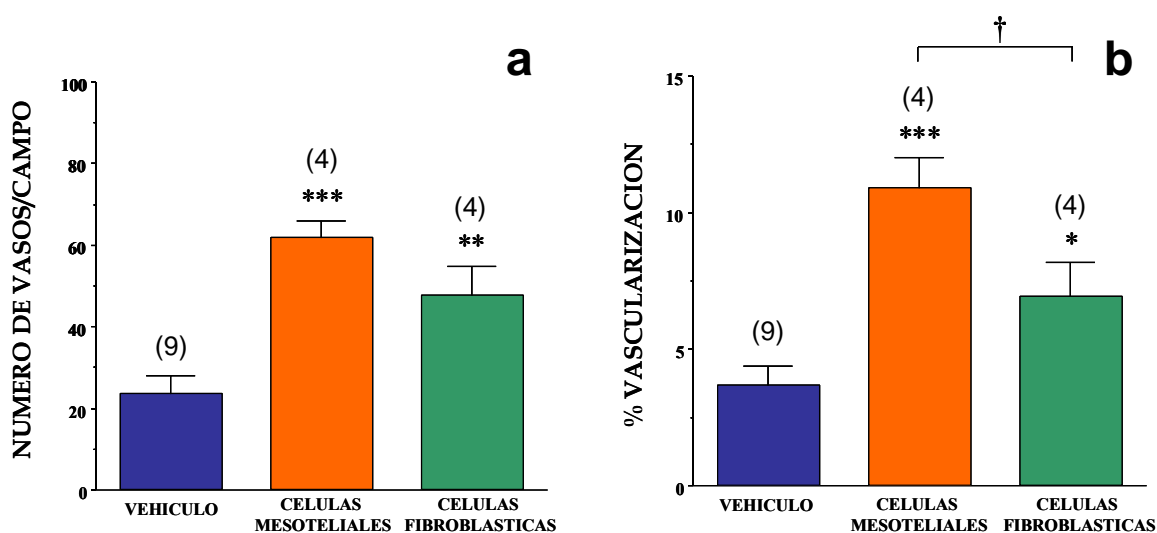
Utilizando el programa informático de histomorfometría, se determinó el número de vasos sanguíneos presentes en los cortes histológicos de las esponjas, comprobándose como efectivamente, la neovascularización observada en las esponjas con células mesoteliales o fibroblásticas era mucho mayor que en las esponjas vehículo (Tab.6). La comparación del número de vasos funcionales en las esponjas con células mesoteliales, con células fibroblásticas o con el vehículo, corroboró los estudios histológicos, encontrándose

mayor número de vasos sanguíneos en los grupos con células que en el grupo con vehículo (Fig.23).

El área de vascularización, calculada como el porcentaje de área ocupada por vasos sanguíneos funcionales sobre el área total del campo visual (Tab.6), fue significativamente mayor en las esponjas con células mesoteliales o fibroblásticas que en las esponjas con vehículo. En las esponjas con células mesoteliales se observó un porcentaje de vascularización más elevado que en las esponjas con células fibroblásticas (Fig.23).

Esponjas	Vehículo (9)	Células mesoteliales (4)	Células fibroblásticas (4)
Nº de vasos/campo	23,52 ± 4,49	61,8 ± 4,26***	47,5 ± 7,39**
% de vascularización	3,66 ± 0,74	10,9 ± 1,14*** †	6,92 ± 1,28*

**Tabla 6.** Número de vasos y porcentaje de vascularización en los cortes histológicos de las esponjas con vehículo, con células mesoteliales o con células fibroblásticas implantadas en los animales. El número entre paréntesis indica el número de animales analizados. \* Indica una  $p < 0,05$ , \*\* indica una  $p < 0,01$ , \*\*\* indica una  $p < 0,001$  respecto al grupo vehículo y † indica una  $p < 0,05$  respecto al grupo con células fibroblásticas mediante un ANOVA de un factor seguida de un análisis Student-Newmann-Keuls.



**Figura 23.** a) Representación del número de vasos sanguíneos funcionales presentes en las esponjas tras siete días de implante. b) Representación del área de vascularización de las esponjas. El número entre paréntesis indica el número de animales analizados. \* Indica una  $p < 0,05$ , \*\* indica una  $p < 0,01$ , \*\*\* indica una  $p < 0,001$ , respecto al vehículo y † indica una  $p < 0,05$  respecto al grupo de las células fibroblásticas mediante un ANOVA de un factor seguida de un análisis Student-Newmann-Keuls.

## INMUNODETECCION DE LAS CELULAS IMPLANTADAS

El análisis inmunohistoquímico de los cortes histológicos de las esponjas con células mesoteliales reveló la presencia de células positivas para citoqueratinas humanas tras siete días de implante, algunas de estas células se observaron en el endotelio de vasos sanguíneos (Fig.24a y Fig.24b).

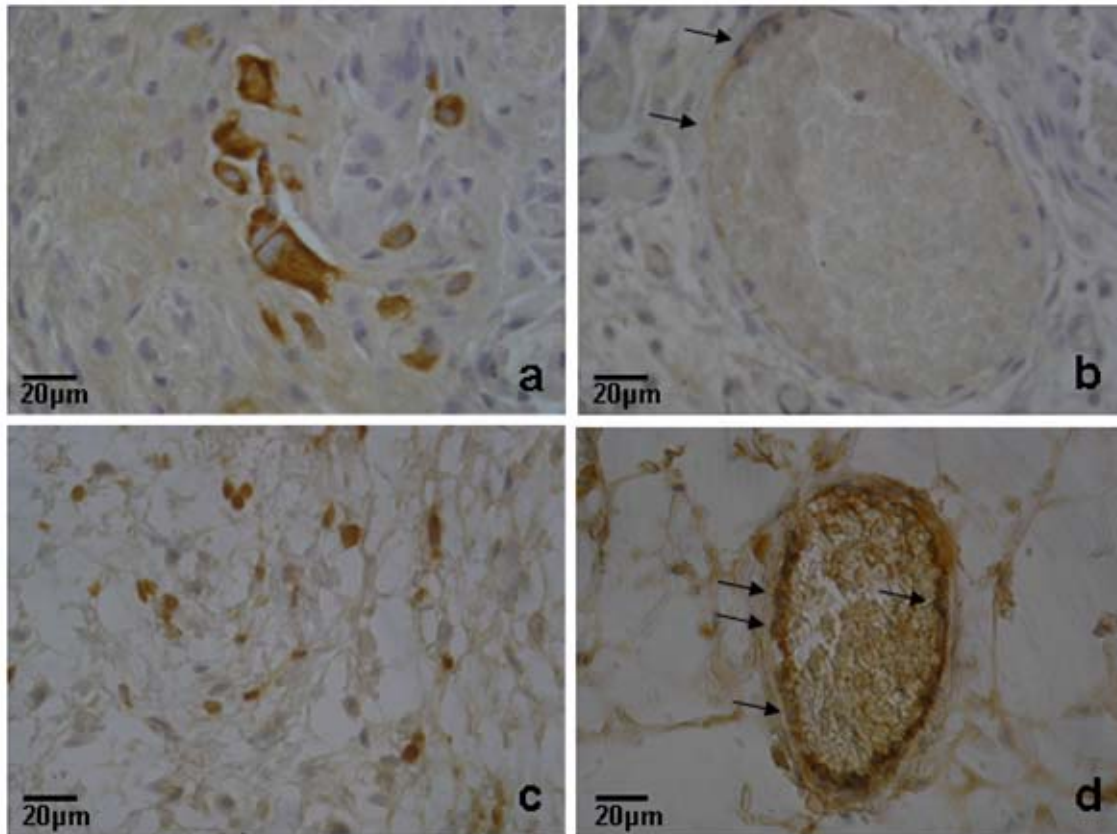
En los cortes histológicos de las esponjas con células fibroblásticas se localizaron células positivas para CD34 humano (Fig.24c), algunas de estas células se observaron en el área perivascular y en el endotelio de vasos sanguíneos funcionales (Fig.24d).

En los grupos que se implantaron esponjas con vehículo no se observó presencia de células positivas para ninguno de los anticuerpos utilizados.

En la siguiente tabla se puede ver de manera resumida la expresión de los marcadores utilizados para la localización de las células implantadas.

Anticuerpo	Control	Células Fibroblásticas	Células mesoteliales
CD34	-	+	X
Citoqueratinas	-	X	+

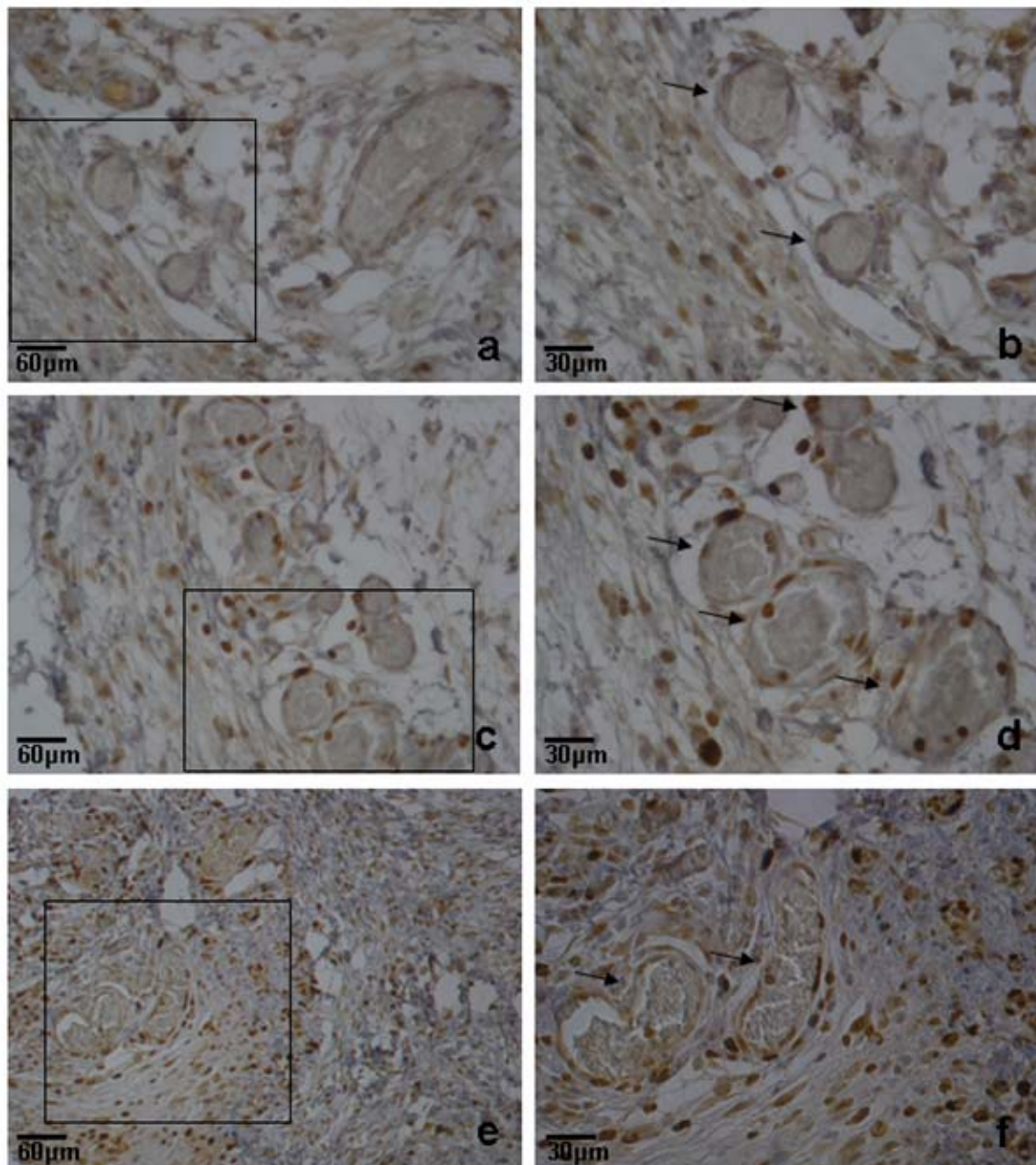
**Tabla 7.** Detección de CD34 y citoqueratinas para localizar las células mesoteliales y las células fibroblásticas en las esponjas implantadas en los animales. + Indica la presencia de células positivas en las preparaciones histológicas de las esponjas. – Indica ausencia de células positivas en las preparaciones histológicas de las esponjas. X Indica la no utilización de ese anticuerpo.



**Figura 24.** Detección y localización de citoqueratinas y CD34 humanos por técnicas inmunohistoquímicas. Microscopía óptica. **a)** Localización de células positivas para citoqueratinas (células teñidas de marrón) en las esponjas implantadas subcutáneamente con células mesoteliales. **b)** Vaso sanguíneo donde se localizan células positivas para citoqueratinas en el endotelio indicadas por las flechas. **c)** Células positivas para CD34 (células teñidas de marrón) localizadas en las esponjas implantadas subcutáneamente con células fibroblásticas. **d)** Vaso sanguíneo donde se localizan células positivas para CD34 en el endotelio indicadas por las flechas.

## ESTUDIO DE PROLIFERACION CELULAR *in situ*

El análisis de la proliferación celular *in situ* mediante la detección inmunohistoquímica del marcador de proliferación celular Ki67, reveló la existencia de células proliferantes en las esponjas de todos los grupos. Sin embargo, tanto en el grupo con células mesoteliales como en el grupo con células fibroblásticas, la cantidad de células positivas para Ki67 fue mayor (Fig.25c, 25d, 25e y 25f). Además, una gran proporción de células positivas para Ki67 se localizaban en el endotelio de los vasos sanguíneos funcionales, mientras que en el grupo de esponjas con vehículo, se encontraron pocas células positivas para Ki67 en los vasos sanguíneos (Fig.25a y 25b).



**Figura 25.** Detección del marcador de proliferación Ki67 en cortes histológicos de esponjas implantadas subcutáneamente en ratas mediante técnicas inmunohistoquímicas. Microscopía óptica. **a)** Secciones histológicas de esponjas con vehículo, en donde se puede observar la presencia de células positivas para Ki67 (células teñidas de marrón). **b)** Fotografía vista a mayor aumento de la zona recuadrada en la fotografía a) donde se puede ver en detalle la ausencia de células positivas en los vasos sanguíneos como indican las flechas. **c)** Secciones histológicas de esponjas del grupo con células fibroblásticas, donde se puede observar la presencia de células positivas para Ki67. **d)** Fotografía vista a mayor aumento de la zona recuadrada en la fotografía c) donde se puede ver en detalle la presencia de células positivas para Ki67 en los vasos sanguíneos como indican las flechas. **e)** Preparaciones histológicas de esponjas del grupo con células mesoteliales, donde se puede observar la presencia de células positivas para Ki67. **f)** Fotografía vista a mayor aumento de la zona recuadrada en la fotografía e) donde se puede ver en detalle la presencia de células positivas para Ki67 en los vasos sanguíneos como indican las flechas.

**- DISCUSSION -**

A lo largo de los años, numerosos estudios han demostrado el efecto terapéutico del omentum en el tratamiento de varias enfermedades. Como se ha mencionado anteriormente, esta eficacia terapéutica así como la habilidad de este tejido en la reparación tisular es atribuida a su capacidad para promover la angiogénesis (Goldsmith y col., 1984). La capacidad angiogénica del omentum queda patente en dos estudios clínicos recientes. Maloney y colaboradores (2003) realizaron su estudio en pacientes que sufrían lesiones graves con pérdida de tejido e isquemia o con riesgo de sufrir episodios isquémicos en las extremidades. Utilizaron fragmentos libres de omentum para la reconstrucción y la revascularización de las lesiones y consiguieron una reparación progresiva y estable sin necesitar más intervenciones quirúrgicas. Horch y colaboradores (2007), utilizaron un fragmento libre de omentum en combinación con cirugía de by-pass venoso para salvar la extremidad de un paciente de 78 años con una enfermedad arterial oclusiva. Este paciente presentaba una ulceración circular de 10x20 cm en la parte inferior de la pierna izquierda y consiguieron una curación completa de la herida siendo estable en el seguimiento realizado durante los tres años siguientes. Las angiografías realizadas mostraron la reconstrucción arterial con las anastomosis microquirúrgicas y la perfusión de los vasos del fragmento de omentum implantado. A pesar de las numerosas aplicaciones terapéuticas publicadas en la literatura científica con el omentum, actualmente, el mecanismo exacto de la revascularización temprana observada en estos estudios es desconocido. Sin embargo, se ha sugerido la implicación de varios factores de crecimiento presentes en grandes cantidades en el omentum como el FGF (Chamorro y col., 1993), y el VEGF (Zhang y col., 1997; Mandl-Weber y col., 2002). Por otro lado, el papel de las células que componen este tejido no ha sido determinado, y no se sabe en que medida estas células contribuyen al éxito de este tipo de implantes, si a través de la secreción de factores de crecimiento o mediante su incorporación al tejido reparado (Herrick y Mutsaers, 2004).

En humanos, el omentum aparece como un pliegue visceral en el peritoneo y tradicionalmente se pensaba que estaba compuesto por múltiples láminas de células mesoteliales que rodeaban al tejido adiposo vascularizado (Sivit, 1996; Sompayrac y col., 1997). En un estudio reciente sobre la estructura del omentum, se demostró que el omentum humano estaba compuesto de dos tipos de tejidos estructuralmente diferentes: membranas finas translúcidas, y áreas ricas en tejido adiposo (Wilkosz y col., 2005). La región translúcida esta formada por dos capas de células mesoteliales opuestas, que no parecen asentarse sobre una membrana basal, separadas por fibras difusas de colágena y ocasionalmente células con forma de fibroblastos; el rasgo más llamativo de las

membranas del omentum es la presencia de varias fenestraciones donde se unen las dos capas opuestas de células mesoteliales, dando la apariencia de red de pescar (Wilkosz y col., 2005). La función de estas fenestraciones todavía es desconocida. En el presente estudio, se ha analizado la capacidad de promover la angiogénesis de las células mesoteliales y de las células fibroblásticas del omentum. Con esta finalidad se llevó a cabo su aislamiento y expansión *in vitro*, se realizaron estudios de morfología y caracterización, se analizó su capacidad de síntesis y liberación de factores angiogénicos, y por último, se evaluó su capacidad de inducir angiogénesis en un modelo experimental *in vivo*.

## **MORFOLOGIA Y CARACTERIZACION DE LOS CULTIVOS CELULARES**

Se han descrito varios protocolos de aislamiento para la obtención de cultivos celulares a partir de fragmentos de omentum (Stylianou y col., 1990; Ogata y col., 2004; Yung y col., 2006). En el presente trabajo, se optó por seguir el protocolo de la doble digestión (Stylianou y col., 1990; Ogata y col., 2004), introduciendo algunas modificaciones, para el aislamiento de células mesoteliales y células fibroblásticas derivadas del omentum humano.

El protocolo de la doble digestión se basa en una digestión diferencial para obtener estos dos tipos celulares. Debido a que las células mesoteliales forman parte de la superficie de las membranas finas que componen el omentum, una digestión débil del tejido consigue desprender este tipo celular. Posteriormente se realiza una digestión completa para obtener las células fibroblásticas. Una primera digestión excesiva lleva a la contaminación de los cultivos de células mesoteliales por células fibroblásticas (Fig.15d) (Yung y col., 2006). Para evitar esta contaminación por fibroblastos se decidió utilizar colagenasa en vez de tripsina, ya que la colagenasa es una enzima con menor capacidad de disgregación del tejido. En otros procesos descritos de aislamiento celular no se realiza centrifugación en gradientes de densidad con Ficoll; esta centrifugación en gradientes de densidad permite seleccionar las células mononucleares descartando los restos celulares y otros tipos celulares indeseables, eludiendo gran cantidad de impurezas a la hora de sembrar el flask de cultivo. El protocolo de aislamiento celular realizado en este estudio proporciona una manera eficiente de obtener cultivos de células mesoteliales y de células fibroblásticas a partir de muestras de omentum humanas, evitando de una manera sencilla los problemas de contaminación.

A los pocos días de la obtención de los cultivos de células mesoteliales, se observó la morfología típica de empedrado (Fig.14b) que adquieren este tipo de células cuando se expanden *ex vivo* (Yung y col., 2006). Además, también se detectó la presencia de células polinucleadas de gran tamaño durante la evolución de los subcultivos, aspecto que adquieren las células mesoteliales senescentes (Fig.14d) (van Hinsbergh y col., 1990). El estudio de filamentos intermedios reveló la expresión de vimentina y citoqueratinas (Fig.16c), propiedad única de este tipo de células. Aunque las células mesoteliales tienen un origen mesodérmico y expresan por ello filamentos intermedios de vimentina, también expresan filamentos intermedios de citoqueratinas característicos de las células epiteliales (Ferrandez-Izquierdo y col., 1994). Al analizar estos cultivos celulares por citometría de flujo, se apreció una distribución homogénea de las células, lo que sugiere la existencia de una única población celular (Fig.18), sin la presencia de contaminación por otros tipos celulares. En cuanto al análisis por citometría de flujo de los marcadores utilizados, CD45, HLA-DR, CD117, CD34 y CD13 no se observó expresión de ninguno de ellos (Fig.18). La ausencia de expresión de estos marcadores confirma que los cultivos obtenidos de la primera digestión enzimática de las muestras de omentum eran cultivos de células mesoteliales.

Los cultivos obtenidos de la segunda digestión enzimática de las muestras de omentum, poseían una morfología fusiforme típica de las células fibroblásticas (Fig.15a). Al estudiar la expresión de los filamentos intermedios se observó como todas las células de los cultivos analizados expresaban vimentina (Fig.17a) y no expresaban citoqueratinas, a excepción de un número muy limitado de células de cada cultivo (Fig.17c). Sin embargo, al analizarlos por citometría de flujo, constituían una población celular homogénea caracterizada por expresar CD34 y CD13, y no expresar CD45, CD117 y HLA-DR (Fig.19).

El CD13 o aminopeptidasa N es una metaloproteasa de unión a membrana de tipo II, se expresa en células de varios orígenes tisulares como el epitelial, el endotelial, el nervioso y el hematopoyético (Gabrilovac y col., 2004) y ha sido observada en poblaciones de fibroblastos (Piela-Smith y Korn, 1995). Existen estudios que demuestran la relación de la expresión de esta aminopeptidasa con el proceso angiogénico (Hashida y col., 2002). Todos los cultivos celulares de tipo fibroblástico analizados, se caracterizaron por mostrar expresión de CD13 (Fig19.)

El CD34 (proteína transmembrana glicosilada que expresan las células progenitoras hematopoyéticas y las células endoteliales (Fina y col., 1990; van de Rijn y Rouse, 1994))

fue rotundamente positivo en todos los cultivos de células fibroblásticas, confirmandose al utilizar distintos anti-CD34 (Fig19.). La expresión de CD34 ya había sido previamente descrita en fibroblastos submesoteliales (Jiménez-Heffernan y col., 2004). Mediante un estudio inmunohistoquímico para la caracterización de subpoblaciones de fibroblastos en el tejido peritoneal, estos autores observaron una expresión uniforme de CD34 que producía la impresión de una capa continua justo debajo de la capa mesotelial. El origen de estos fibroblastos intersticiales ha sido investigado por varios grupos, pero su linaje todavía no ha sido determinado. Una de las hipótesis que se baraja sobre el origen de los fibroblastos, argumenta que estas células provienen de una subpoblación de leucocitos circulantes que expresan CD34 (Bucala y col., 1994), ya que poblaciones de fibroblastos positivas para CD34 han sido observadas en el tejido conectivo de varios órganos (van de Rijn y Rouse, 1994; Suster, 2000). Sin embargo, estos leucocitos circulantes denominados fibrocitos poseen expresión de CD45 (determinando su origen leucocitario), y de HLA-DR (molécula de histocompatibilidad tipo II) (Bucala y col., 1994). Las células fibroblásticas de los cultivos analizados en el presente trabajo no expresaron estos marcadores, de manera que o bien los fibroblastos de la capa submesotelial del omentum han perdido la expresión de CD45 y HLA-DR al entrar a formar parte del tejido, o bien no proceden de fibrocitos circulantes.

Otra hipótesis sobre el origen de los fibroblastos intersticiales implica la conversión local del tejido epitelial a través de la transición epitelio-mesenquima, lo cual es evidente durante la reparación fibrosa tras un daño tisular (Iwano y col., 2002). De acuerdo con esta hipótesis, existen evidencias de la presencia de células fibroblásticas que coexpresan vimentina y citoqueratinas en la capa submesotelial en pacientes sometidos a diálisis peritoneal (Jiménez-Heffernan y col., 2004). En el presente trabajo también se encontraron algunas células que coexpresan estos dos filamentos intermedios en los cultivos de tipo fibroblástico del omentum (Fig.17c). La existencia de estas células en número reducido, pero sistemáticamente presentes en todos los cultivos analizados, sugiere que podrían ser células de origen mesotelial, aunque este hecho también podría estar relacionado con la presencia de células mesoteliales progenitoras como se explica a continuación.

## EXPRESION DE NESTINA EN LOS CULTIVOS CELULARES

La función de la expresión de nestina en distintos tipos celulares todavía está siendo investigada (Michalczyk y Ziman, 2005). Estudios recientes han demostrado que la nestina puede interactuar con los tres componentes principales del citoesqueleto (microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos), lo que le atribuiría un papel importante en la coordinación de los cambios sufridos en el desarrollo de la célula, incluyendo la división celular (Herrmann y Aebi, 2000). La nestina fue identificada por primera vez en las células progenitoras que daban lugar a neuronas y glia en la neurogénesis temprana del sistema nervioso central y periférico (Zimmerman y col., 1994; Wiese y col., 2004). Posteriormente, la expresión de nestina ha sido detectada en células progenitoras de otros tejidos, como músculo (Kachinsky y col., 1994), corazón (Kachinsky y col., 1995), páncreas (Delacour y col., 2004; Street y col., 2004), y folículos pilosos (Li y col., 2003). También se ha detectado expresión de nestina en tejidos adultos como la piel y el sistema nervioso central, pero siempre restringida a áreas de regeneración (Johansson y col., 2002; Li y col., 2003; Wiese y col., 2004). Aunque todavía no está claro qué factores regulan *in vitro* e *in vivo* la expresión de nestina, se considera que la nestina representa un marcador característico de células progenitoras multilineaje, por lo que su presencia podría indicar la multipotencialidad y el potencial regenerativo de las células (Lendahl y col., 1990; Wiese y col., 2004).

La presencia de células positivas para nestina, tanto en los cultivos de células mesoteliales (Fig.16d) como en los cultivos de células tipo fibroblástico (Fig.17d), sugiere la existencia de células indiferenciadas con características de progenitoras pluripotenciales entre los componentes celulares básicos del omentum. Sin embargo, aunque estas células son constantes en todos los cultivos, su número representa un porcentaje pequeño de las células en cultivo. A pesar de que todavía no han sido identificadas células madre mesoteliales, existen algunas evidencias que indican la existencia de células mesoteliales progenitoras (Herrick y Mutsaers, 2004). Fundamentándose en estas evidencias, varios grupos de investigación han propuesto fuentes adicionales para la regeneración del mesotelio; células progenitoras presentes en el líquido seroso que se establecerían en la herida como precursores mesoteliales (Ryan y col., 1973) o precursores mesenquimales subserosos que se diferenciarían a células mesoteliales y migrarían a la superficie de la lesión (Raftery, 1973; Davila y Crouch, 1993), aunque otros estudios cuestionan el papel

de estas células subserosas en la regeneración mesotelial (Whitaker y Papadimitriou, 1985; Mutsaers y col., 2000).

No hay antecedentes sobre la existencia de células positivas para nestina en cultivos celulares derivados de omentum humano. La presencia constante de estas células en los dos tipos celulares aislados lleva a pensar que se trataría de células análogas que posiblemente estén implicadas en la generación de fibroblastos y células mesoteliales en el omentum, aportando una nueva evidencia a las teorías de la existencia de células madre mesoteliales. El aislamiento y estudio de las propiedades de estas células positivas para nestina podría aportar algo de luz a los mecanismos de regeneración tisular ocurridos en el omentum tras una lesión en el tejido.

En los cultivos de células mesoteliales todas las células del cultivo coexpresan vimentina y citoqueratinas (Fig.16c), lo que lleva a pensar que las células positivas para nestina coexpresarían estos dos filamentos intermedios. En los cultivos de fibroblastos, el pequeño grupo de células que coexpresan ambos filamentos intermedios (Fig.17c) podría estar constituido por las mismas células que expresan nestina, aunque este es un punto que queda por confirmar.

## **EXPRESION Y LIBERACION DE FGF-2 Y VEGF**

El VEGF y el FGF-2 son dos de los factores proangiogénicos más potentes que se conocen. El VEGF induce el crecimiento, proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales vasculares, así como el aumento de la permeabilidad vascular y la vasodilatación, contribuyendo a la inducción de la angiogénesis (Neufeld y col., 2001; Ferrara y col., 2003). También existen varios estudios que demuestran que el FGF-2, puede inducir *in vitro* un fenotipo proangiogénico en las células endoteliales, similar al proceso angiogénico *in vivo* (Montesano y col., 1986; Gualandris y col., 1996). Dicho proceso incluye la regulación de la proliferación y migración de las células endoteliales, producción de proteasas e integrinas, expresión de receptores de la cadherina y producción de uniones gap intercelulares.

La administración de factores de crecimiento como el VEGF y el FGF-2 se ha considerado una estrategia terapéutica para conseguir la neovascularización en un tejido. El tratamiento mediante la administración de estos factores de crecimiento ha producido esperanzadores resultados en modelos animales y en algunos ensayos clínicos preliminares, pero su interpretación debe ser realizada con cautela (Henry y Abraham,

2000). Se ha demostrado que el VEGF induce una respuesta angiogénica caracterizada por la formación de largos vasos con una pared fina, no estabilizados por pericitos, que son excesivamente permeables a las proteínas plasmáticas (Pettersson y col., 2000). Estos vasos neoformados son anormales y producen un escaso beneficio. El VEGF y el FGF-2 son capaces de estimular la angiogénesis a corto plazo, pero ninguno de estos dos factores individualmente es capaz de mantener los vasos neoformados. Esto ha llevado a la consideración de proponer estrategias terapéuticas alternativas basadas en la combinación de múltiples factores de crecimiento utilizados de forma complementaria y coordinada, la terapia celular o la combinación de ambas.

La presencia de grandes cantidades de FGF y de VEGF en el omentum ya ha sido demostrada. (Chamorro y col., 1993; Zhang y col., 1997; Mandl-Weber y col., 2002). Los presentes resultados muestran la expresión de FGF-2 y de VEGF en todos los cultivos celulares de células mesoteliales y fibroblásticas analizados (Fig.20). Además se detectó expresión nuclear de FGF-2 en los dos tipos de cultivos (Fig.20a y 20c). Esta localización nuclear de FGF-2 sugiere la presencia de isoformas de alto peso molecular del FGF-2 en el núcleo, que correspondería a una actividad potencialmente mitogénica (Klein y col., 1996). Nachtsheim y colaboradores (2006) estudiaron la inmunolocalización de FGF-2 y VEGF en el omentum. Estos autores comprobaron que la expresión de FGF-2 era evidente en las células mesoteliales que forman la capa mesotelial del omentum, mientras en la capa submesotelial sólo se encontró expresión en algunas células del endotelio capilar. Sin embargo, la expresión de VEGF fue detectada en varias localizaciones como en el mesotelio, en el tejido adiposo y en los vasos sanguíneos. En el presente estudio, se ha determinado que el factor angiogénico secretado en mayor cantidad es el VEGF, tanto en las células mesoteliales como en las células fibroblásticas (Tab.5). Al comparar los niveles de secreción en estos dos tipos celulares se apreció como las células fibroblásticas apenas secretaban FGF-2, sin embargo secretaban mayores cantidades de VEGF que las células mesoteliales (Fig.21a y 21b). Las células mesoteliales secretaron niveles apreciables de los dos factores angiogénicos estudiados (Fig.21a y 21b). Varios estudios han acreditado la secreción de VEGF y FGF-2 por las células mesoteliales, estudiando la alteración en la expresión de estos dos factores y su implicación en los procesos patológicos derivados de la diálisis peritoneal (Ogata y col., 2001; Mandl-Weber, 2002). La diálisis peritoneal a largo plazo esta asociada con alteraciones estructurales y funcionales severas en la membrana peritoneal (Krediet, 1999). En pacientes sometidos a diálisis peritoneal, se ha sugerido como causa principal de la alta permeabilidad y de la fibrosis peritoneal el daño

causado en el mesotelio (Ogata y col., 2001). El VEGF parece tener una implicación importante en la modificación de las características de la membrana peritoneal, y el FGF-2 está implicado en la proliferación de los fibroblastos peritoneales contribuyendo de esta manera al proceso de fibrosis. También existen estudios que confirman la expresión de VEGF en los fibroblastos peritoneales, y su implicación en los procesos de fibrosis mediante la modulación de su expresión en estas células (Diamond y col., 2005).

### **ANGIOGENESIS *in vivo***

Las esponjas implantadas en ratas con células mesoteliales o con células fibroblásticas humanas, muestran una clara neovascularización, aumentando de manera evidente el número de vasos y el área de neovascularización con respecto a las esponjas con vehículo (Fig.22). La capacidad para estimular la angiogénesis de estos dos tipos celulares fue similar. No se encontraron indicios de rechazo ya que no se detectaron acúmulos de células inflamatorias en los cortes histológicos de las esponjas estudiadas, descartando que la angiogénesis observada en se deba a la acción de las células inflamatorias.

Los resultados *in vitro* demostraron que las células mesoteliales eran capaces de secretar FGF-2 y VEGF (Fig.21a y 21b). La liberación de estos factores pudo promover un entorno angiogénico en la zona del implante, que sería responsable del aumento de la neovascularización en comparación con las esponjas vehículo. En este trabajo se estudió la secreción de estos dos factores proangiogénicos, pero las células mesoteliales también son capaces de secretar otros factores de crecimiento relacionados con la angiogénesis como el TGF- $\beta$ , PDGF, factor de crecimiento de tipo insulina (IGF), HGF, EGF y KGF (Mutsaers, 2002; Herrick y Mutsaers, 2004), que podrían contribuir a la neovascularización observada. En los sobrenadantes de los medios de cultivo de las células fibroblásticas, se comprobó que secretan principalmente VEGF (Fig.21b), pudiendo generar estas células un entorno angiogénico en los implantes *in vivo*, estimulando la proliferación de las células endoteliales. La formación de un nuevo vaso (Fig.3) supone la activación de células endoteliales quiescentes. Al estudiar la proliferación celular *in situ* mediante la detección del marcador de proliferación Ki67, se observó como en las esponjas que llevaban células mesoteliales o fibroblásticas existían vasos sanguíneos en los que las células endoteliales se encontraban en estado proliferativo (Fig.25d y 25f), sin detectarse apenas la presencia de células positivas para Ki67 en las esponjas con vehículo (Fig.25b).

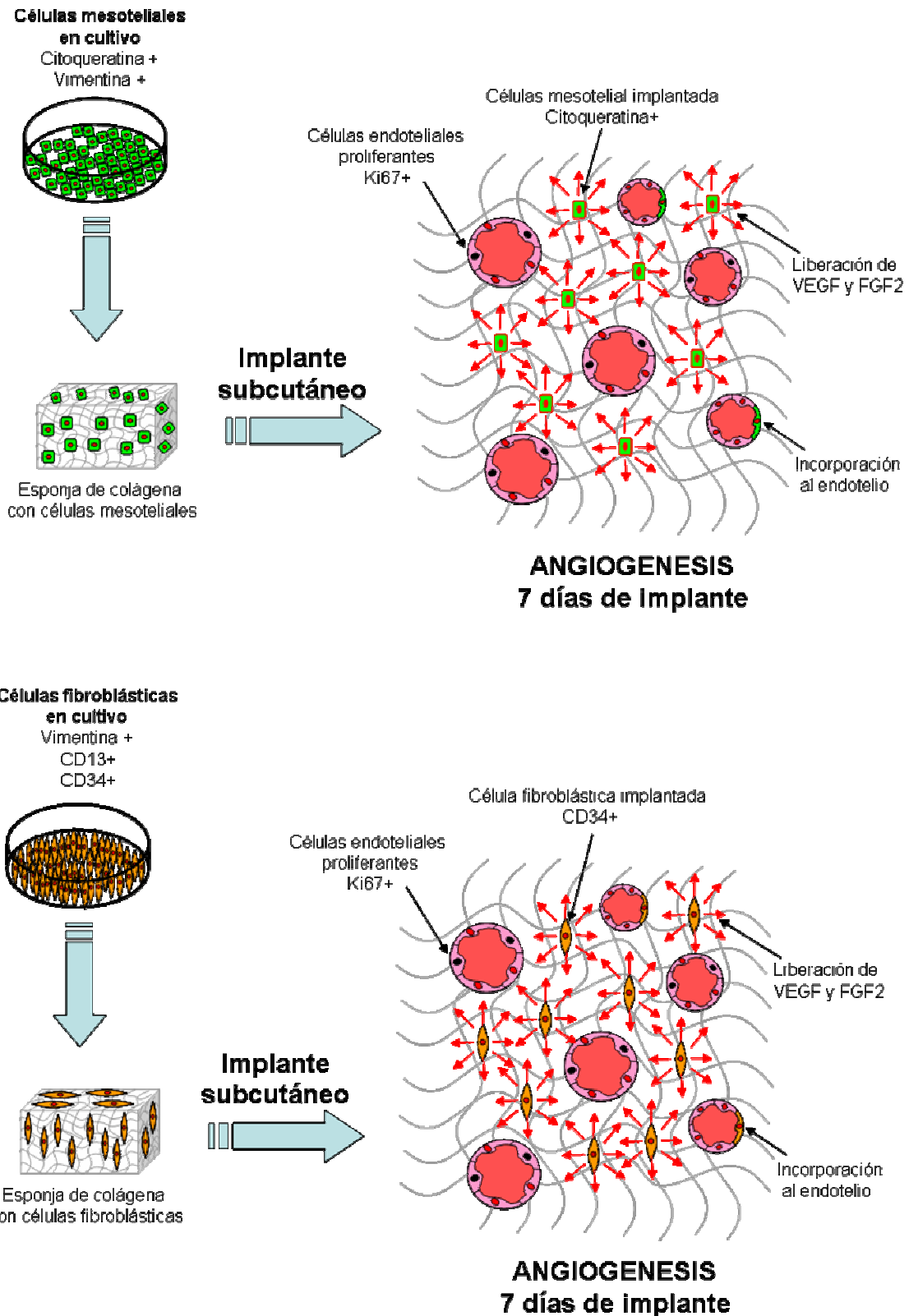
En la inmunodetección de las células mesoteliales en las esponjas se realizó una inmunolocalización para citoqueratinas humanas que reveló la presencia de las células mesoteliales en las esponjas implantadas (Fig.24a). Esto confirmó su supervivencia tras siete días de implante, y permitió apreciar la localización de estas células en el endotelio de algunos vasos sanguíneos (Fig.24b). Lo que no se puede confirmar es si estas células incorporadas al endotelio se diferenciaron a células endoteliales, aunque existen evidencias de células derivadas del mesotelio transdiferenciadas a células endoteliales en el hígado, que conservan una expresión transitoria de citoqueratinas (Herrick y Mutsaers, 2004).

La inmunodetección de las células fibroblásticas se demostró mediante la presencia de células positivas para CD34 (Fig.24c) en las esponjas, localizándose células implantadas en el endotelio de algunos vasos sanguíneos (Fig.24d). Este resultado no dejó lugar a dudas sobre la procedencia de estas células, ya que el anticuerpo empleado para detectar el CD34 es exclusivamente humano, sin reacción cruzada con rata. Se ha publicado la presencia de una población celular de células humanas positivas para CD34 y CD13 y negativas para CD45 en la grasa subcutánea (Planat-Benard y col., 2004). En el mencionado estudio, se demostró la capacidad de estas células positivas para CD34 y CD13 de promover la angiogénesis y se propuso que esta población celular estaba constituida por células progenitoras de células endoteliales, participando en la formación de vasos sanguíneos *in vivo* (Planat-Benard y col., 2004). En el presente trabajo, se detectaron las células implantadas en el endotelio de los vasos, pero al igual que ocurre con las células mesoteliales, sería necesario un marcaje específico de endotelio para determinar si estas células se han diferenciado en células endoteliales.

Una de las estrategias empleadas para conseguir la neovascularización en un tejido es la terapia celular. Con este propósito se han utilizado varios tipos celulares, como las células mononucleares de médula ósea (BMMNC) (Hamano y col., 2001), obtenidas mediante una extracción por punción en cresta ilíaca o aislándolas de sangre periférica, estimulando su movilización desde médula ósea (PBMNC) (Iba y col., 2002). También se han propuesto las células progenitoras endoteliales (EPC) aisladas de médula ósea, sangre periférica o cordones umbilicales (Yang y col., 2004) y las células madre mesenquimales (MSC) aisladas de médula ósea o grasa (Al-Khaldi y col., 2003; Kim y col., 2007). La implicación de las células mesoteliales de rata para promover la angiogénesis ha sido estudiada previamente en un modelo experimental de infarto de miocardio. Los buenos resultados obtenidos en ese estudio proponen a las células mesoteliales como un tipo celular a tener en cuenta para futuras aplicaciones en terapia celular (Elmadbouh y col.,

2005). Asimismo, en el estudio de Planat-Benard y colaboradores (2004), se propusieron las células fibroblásticas humanas positivas para CD34 y CD13 aisladas de grasa subcutánea como candidatas para su aplicación en terapias celulares de neovascularización. En la terapia celular, el implante de células en tejidos isquémicos induce una angiogénesis terapéutica, pero en algunos pacientes es ineficaz. Además de la pobre respuesta biológica en algunos casos, se suma la baja supervivencia de las células implantadas y la dificultad para conseguir el suficiente número de células a implantar (Zhou y col., 2007).

Las evidencias clínicas muestran que los implantes de omentum constituyen una terapia eficaz en la revascularización de extremidades en patologías que producen una isquemia (Ala-Kulju y Virkkula., 1990; Herrera y col., 1991; Talwar y col., 1998; Maloney y col., 2003; Horch y col., 2007). El presente estudio muestra una manera sencilla y eficaz de obtener células mesoteliales y células fibroblásticas a partir de muestras de omentum. Por un lado las células mesoteliales se caracterizaron por la expresión de vimentina y citoqueratinas, y por otro lado, las células fibroblásticas se caracterizaron por la expresión de vimentina y los marcadores CD13 y CD34, demostrándose la capacidad de ambos tipos celulares para secretar FGF-2 y VEGF *in vitro* y de promover la angiogénesis en un modelo experimental *in vivo* (Fig.26). Demostrada la capacidad angiogénica de las células mesoteliales y de las células fibroblásticas derivadas del omentum humano, se puede proponer que estas células tendrían una participación activa en la angiogénesis implicada en los efectos terapéuticos del omentum. Estos dos tipos celulares contribuirían a la promoción de la angiogénesis mediante su incorporación al endotelio en la formación de nuevos vasos sanguíneos y de forma paracrina, generando un entorno angiogénico por la secreción de factores de crecimiento (FGF-2 y VEGF).



**Figura 26.** Representación de la promoción de la angiogénesis en las esponjas tras siete días de implante subcutáneo en las esponjas con células mesoteliales y en las esponjas con células fibroblásticas. Se puede apreciar la inmunolocalización de las células implantadas y la generación de un entorno angiogénico mediante la liberación de factores de crecimiento que estimula la proliferación de las células endoteliales, además en ambos casos también se puede apreciar la incorporación de las células implantadas al endotelio de los vasos sanguíneos.

**- CONCLUSIONES -**

El presente trabajo permite concluir que:

- ❖ El método de aislamiento utilizado resulta una forma sencilla y eficaz para la obtención de cultivos de células mesoteliales y de cultivos de células fibroblásticas a partir de muestras de omentum humano.
- ❖ Los cultivos de células mesoteliales obtenidas a partir de muestras de omentum humano son una población celular homogénea, caracterizada por la expresión de filamentos intermedios de vimentina y citoqueratinas.
- ❖ Los cultivos de células fibroblásticas obtenidas a partir de muestras de omentum humano son una población celular homogénea, caracterizada por la expresión de filamentos intermedios de vimentina y por la expresión de los marcadores CD34 y CD13.
- ❖ Se demuestra la presencia de células positivas para nestina en los cultivos de células mesoteliales y células fibroblásticas derivadas del omentum, lo que sugiere la existencia de células indiferenciadas o progenitoras en este tejido, aunque se necesitan estudios más profundos para dilucidar esta cuestión.
- ❖ Las células mesoteliales y las células fibroblásticas derivadas del omentum poseen la capacidad de secretar VEGF y FGF-2 *in vitro*.
- ❖ Las células mesoteliales y las células fibroblásticas derivadas del omentum, poseen la capacidad de promover la angiogénesis aumentando de manera considerable el área de neovascularización en un modelo experimental *in vivo*.
  - Son capaces de sobrevivir durante siete días tras el implante.
  - Son capaces de incorporarse al endotelio de los vasos sanguíneos y aunque no se puede confirmar su diferenciación en células endoteliales contribuyen a la formación de estos, asimismo, podrían generar un entorno angiogénico mediante la secreción de factores de crecimiento estimulando la proliferación de las células endoteliales.

- ❖ Por su capacidad angiogénica, las células mesoteliales y las células fibroblásticas aisladas del omentum humano pueden justificar a nivel celular las propiedades del omentum para revascularizar tejidos.

**- BIBLIOGRAFIA -**

- Achen M. G., Stacker S. A. (1998)** The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int J Exp Pathol.* 79: 255-265
- Afify A. M., Al-Khafaji B. M., Paulino A. F., Davila R. M. (2002)** Diagnostic use of muscle markers in the cytologic evaluation of serous fluids. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 10: 178-182
- Ala-Kulju K., Virkkula L. (1990)** Use of omental pedicle for treatment of Buerger's disease affecting the upper extremities: a modified technique. *Vasa.* 19: 330-333
- Al-Khaldi A., Al-Sabti H., Galipeau J., Lachapelle K. (2003)** Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg.* 75: 204-209
- Azuma H., Kondo T., Mikami M., Harii K. (1976)** Treatment of chronic osteomyelitis by transplantation of autogenous omentum with microvascular anastomoses. A preliminary report. *Acta Orthop Scan.* 47: 271-275
- Baradi A. F., Rao S. N. (1976)** A scanning electron microscope study of mouse peritoneal mesothelium. *Tissue Cell.* 8: 159-162
- Basilico C., Moscatelli D. (1992)** The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res.* 59: 115-165
- Bates D. O., Harper S. J. (2002)** Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul Pharmacol.* 39: 225-237
- Bellingan G. J., Xu P., Cooksley H., Cauldwell H., Shock A., Bottoms S. Haslett C., Mutsaers S. E., Laurent G. J. (2002)** Adhesion molecule-dependent mechanisms regulate the rate of macrophage clearance during the resolution of peritoneal inflammation. *J Exp Med.* 196: 1515-1521
- Bianco P., Robey P. G. (2001)** Stem cells in tissue engineering. *Nature.* 414: 118-121

- Bikfalvi A., Klein S., Pintucci G., Rifkin D. B. (1997)** Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev.* 18: 26-45
- Boilly B., Vercoutter-Edouart A. S., Hondermarck H., Nurcombe V., Le B. X. (2000)** FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11: 295-302
- Bolen J. W., Hammar S. P., McNutt M. A. (1986)** Reactive and neoplastic serosal tissue. A light-microscopic, ultrastructural, and immunocytochemical study. *Am J Surg Pathol.* 10: 34-47
- Bucala R., Spiegel L. A., Chesney J., Hogan M., Cerami A. (1994)** Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med.* 1: 71-81
- Bull H. A., Pittilo R. M., Drury J., Pollock J. G., Clarke J. M., Woolf N., Marston A., Machin S. J. (1988)** Effects of autologous mesothelial cell seeding on prostacyclin production within Dacron arterial prostheses. *Br J Surg.* 75: 671-674
- Buoro S., Ferrarese P., Chiavegato A., Roelofs M., Scatena M., Pauletto P., Passerini-Glazel G., Pagano F., Sartore S. (1993)** Myofibroblast-derived smooth muscle cells during remodelling of rabbit urinary bladder wall induced by partial outflow obstruction. *Lab Invest.* 69: 589-602
- Burgess W. H., Maciag T. (1989)** The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem.* 58: 575-606
- Campbell G. R., Ryan G. B. (1983)** Origin of myofibroblasts in the avascular capsule around free-floating intraperitoneal blood clots. *Pathology.* 15: 253-264
- Carmeliet P. (2000)** Mechanism of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395
- Carmeliet P. (2003)** Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 9: 653-660
- Casten D. F., Alday E. S. (1971)** Omental transfer for revascularization of extremities. *Surg Gynecol Obstet.* 132: 301-304

- Chamorro M., Carceller F., Llanos C., Rodríguez-Alvariño A., Colmenero C., Burgueño M. (1993)** The effect of omental wrapping on nerve graft regeneration. *Br J Plast Surg.* 46: 426-429
- Clarke J. M., Pittilo R. M., Machin S. J., Woolf N. (1984)** A study of the possible role of mesothelium as a surface for flowing blood. *Thromb Haemost.* 51: 57-60
- Clauss M., Gerlach M., Gerlach H., Brett J., Wang F., Familletti P. C., Pan Y. C., Olander J. V., Connolly D. T., Stern D. (1990)** Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med.* 172: 1535-1545
- Colvin J. S., Green R. P., Schmahl J., Capel B., Ornitz D. M. (2001)** Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell.* 104: 875-889
- Coughlin S. R., Barr P. J., Cousens L. S., Fretto L. J., Williams L. T. (1988)** Acidic and basic fibroblast growth factors stimulate tyrosine kinase activity in vivo. *J Biol Chem.* 263: 988-993
- Cross M. J., Claesson-Welsh L. (2001)** FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci.* 22: 201-207
- Crossley P. H., Martin G. R. (1995)** The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development.* 121: 439-451
- Cui L., Johkura K., Liang Y., Teng R., Ogiwara N., Okuchi Y., Asanuma K., Sasaki K. (2002)** Biodefense function of omental milky spots through cell adhesion molecules and leukocyte proliferation. *Cell Tissue Res.* 310: 321-330
- Cunningham S. A., Waxham M. N., Arrate P. M., Brock T. A. (1995)** Interaction of the Flt-1 tyrosine kinase receptor with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. Mapping of a novel site involved in binding. *J Biol Chem.* 270: 20254-20257

- Czernobilsky B., Moll R., Levy R., Franke W. W. (1985)** Co-expression of cytokeratin and vimentin filaments in mesothelial, granulosa and rete ovarii cells of the human ovary. *Eur J Cell Biol.* 37: 175-190
- Dailey L., Ambrosetti D., Mansukhani A., Basilico C. (2005)** Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16: 233-247
- Darby I. A., Hewitson T. D. (2007)** Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol.* 257: 143-179
- Davila R. M., Crouch E. C. (1993)** Role of mesothelial and submesothelial stromal cells in matrix remodeling following pleural injury. *Am J Pathol.* 142: 547-555
- de Muinck E. D., Simons M. (2004)** Re-evaluating therapeutic neovascularization. *J Mol Cell Cardiol.* 36: 25-32
- de Vries C., Escobedo J. A., Ueno H., Houck K., Ferrara N., Williams L. T. (1992)** The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science.* 255: 989-991
- Delacour A., Nepote V., Trumpp A., Herrera P. (2004)** Nestin expression in pancreatic exocrine cell lineages. *Mech Dev.* 121: 3-14
- Diamond M. P., El-Hammady E., Munkarah A., Bieber E. J., Saed G. (2005)** Modulation of the expression of vascular endothelial growth factor in human fibroblasts. *Fertil Steril.* 83: 405-409
- Dickson C., Smith R., Brookes S., Peters G. (1984)** Tumorigenesis by mouse mammary tumor virus: proviral activation of a cellular gene in the common integration region int-2. *Cell.* 37: 529-536
- Dondelinger R. F., Boverie J. H., Cornet O. (2000)** Diagnosis of pancreatic injury: a need to improve performance. *JBR-BTR.* 83: 160-166
- Drummond D., Morison R. (1896)** A case of ascites due to cirrhosis of the liver cured by operation. *Br Med. J.* 2: 728

- Ebihara Y., Masuya M., Larue A. C., Fleming P.A., Visconti R.P., Minamiguchi H., Drake C. J., Ogawa M. (2006)** Hematopoietic origins of fibroblasts: II. In vitro studies of fibroblasts, CFU-F, and fibrocytes. *Exp. Hematol.* 34: 219-229
- Elmadbouh I., Chen Y., Louedec L., Silberman S., Pouzet B., Meilhac O., Michel J. B. (2005)** Mesothelial cell transplantation in the infarct scar induces neovascularization and improves heart function. *Cardiovasc Res.* 68: 307-317
- Eriksson A., Cao R., Roy J., Tritsarlis K., Wahlestedt C., Dissing S., Thyberg J., Cao Y. (2003)** Small GTP-binding protein Rac is an essential mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial fenestrations and vascular permeability. *Circulation.*107: 1532-1538
- Eskeland G., Kjaerheim A. (1966)** Regeneration of parietal peritoneum in rats. 2. An electron microscopical study. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 68: 379-395
- Eswarakumar V. P., Lax I., Schlessinger J. (2005)** Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.*16: 139-149
- Ferrandez-Izquierdo A., Navarro-Fos S., Gonzalez-Devesa M., Gil-Benso R., Llombart-Bosch A. (1994)** Immunocytochemical typification of mesothelial cells in effusions: in vivo and in vitro models. *Diagn Cytopathol.* 10: 256-262
- Ferrara N. (1999)** Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int.* 56:794-814
- Ferrara N. (2001)** Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280: C1358-C1366
- Ferrara N., Gerber H. P., LeCouter J. (2003)** The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 9: 669-676
- Ferrara N., Henzel W. J. (1989)** Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 161: 851-858

- Fina L., Molgaard H. V., Robertson D., Bradley N. J., Monaghan P., Delia D., Sutherland D. R., Baker M. A., Greaves M. F. (1990)** Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*. 75: 2417-2426
- Folkman J. (1971)** Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 285: 1182-1186
- Folkman J. (2001)** Angiogenesis-dependent diseases. *Semin Oncol* 28: 536-542
- Frank S., Hübner G., Breier G., Longaker M. T., Greenhalgh D. G., Werner S. (1995)** Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*. 270: 12607-12613
- Fukata H. (1963)** Electron microscopic study on normal rat peritoneal mesothelium and its changes in absorption of particulate iron dextran complex. *Acta Pathol Jpn*. 13: 309-325
- Fukumura D., Gohongi T., Kadambi A., Izumi Y., Ang J., Yun C. O., Buerk D. G., Huang P. L., Jain R. K. (2001)** Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 2604-2609
- Fukuo Y., Shinohara H., Matsuda T. (1990)** The distribution of lymphatic stomata in the diaphragm of the golden hamster. *J Anat*. 169: 13-21
- Fulton D., Gratton J. P., McCabe T. J., Fontana J., Fujio Y., Walsh K., Franke T. F., Papapetropoulos A., Sessa W. C. (1999)** Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 399: 597-601
- Gabrilovac J., Cupić B., Breljak D., Zekusić M., Boranić M. (2004)** Expression of CD13/aminopeptidase N and CD10/neutral endopeptidase on cultured human keratinocytes. *Immunol Lett*. 91: 39-47
- Gabrilovich D. I., Chen H. L., Girgis K. R., Cunningham H. T., Meny G. M., Nadaf S., Kavanaugh D., Carbone D. P. (1996)** Production of vascular endothelial

growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells.  
*Nat Med.* 2: 1096-1103

**Gerber H. P., Condorelli F., Park J., Ferrara N. (1997)** Differential transcriptional regulation of the two VEGF receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem.* 272: 23659-23667

**Gerber H. P., Malik A. K., Solar G. P., Sherman D., Liang X. H., Meng G., Hong K., Marsters J. C., Ferrara N. (2002)** VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature.* 417: 954-958

**Gerwins P., Sköldenberg E., Claesson-Welsh L. (2000)** Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 34: 185-194

**Giménez-Gallego G., Rodkey J., Bennett C., Rios-Candelore M., Disalvo J., Thomas K. (1985)** Brain-derived acidic fibroblast growth factor: complete amino acid sequence and homologies. *Science.* 230: 1385-1388

**Givol D., Yayon A. (1992)** Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB J.* 6: 3362-3369

**Goldsmith H. S. (1967)** Omental transposition for peripheral vascular insufficiency. *Rev Surg.* 24: 379-380

**Goldsmith H. S. (1980)** Salvage of end stage ischemic extremities by intact omentum. *Surgery.* 88: 732-736

**Goldsmith H. S. (2001)** Role of the omentum in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurol Res.* 23: 555-564

**Goldsmith H. S., Duckett S., Chen W. F. (1975)** Spinal cord vascularization by intact omentum. *Am J Surg.* 129: 262-265

**Goldsmith H. S., Steward E. (1984)** Vascularization of brain and spinal cord by intact omentum. *Appl Neurophysiol.* 47: 57-61

- Goodell M. A. (2001)** Stem cells: is there a future in plastics? *Curr Opin Cell Biol.* 13: 662-665
- Gospodarowicz D. (1975)** Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J Biol Chem.* 250: 2515-2520
- Gospodarowicz D., Bialecki H., Greenburg G. (1978)** Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. *J Biol Chem.* 253: 3736-3743
- Grose R., Dickson C. (2005)** Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16: 179-186
- Gualandris A., Rusnati M., Belleri M., Nelli E. E., Bastaki M., Molinari-Tosatti M. P., Bonardi F., Parolini S., Albin A., Morbidelli L., Ziche M., Corallini A., Possati L., Vacca A., Ribatti D., Presta M. (1996)** Basic fibroblast growth factor overexpression in endothelial cells: an autocrine mechanism for angiogenesis and angioproliferative diseases. *Cell Growth Differ.* 7: 147-160
- Gulyás M., Dobra K., Hjerpe A. (1999)** Expression of genes coding for proteoglycans and Wilms' tumour susceptibility gene 1 (WT1) by variously differentiated benign human mesothelial cells. *Differentiation.* 65: 89-96
- Gupta K., Zhang J. (2005)** Angiogenesis: a curse or cure? *Postgrad Med J.* 81: 236-242
- Halfon M. S., Carmena A., Gisselbrecht S., Sackerson C. M., Jimenez F., Baylies M. K., Michelson A. M. (2000)** Ras pathway specificity is determined by the integration of multiple signal-activated and tissue-restricted transcription factors. *Cell.* 103: 63-74
- Hamano K., Li T. S., Kobayashi T., Tanaka N., Kobayashi S., Matsuzaki M., Esato K. (2001)** The induction of angiogenesis by the implantation of autologous bone marrow cells: a novel and simple therapeutic method. *Surgery.* 130: 44-54
- Hanafusa H., Torii S., Yasunaga T., Nishida E. (2002)** Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol.* 4: 850-858

- Hashida H., Takabayashi A., Kanai M., Adachi M., Kondo K., Kohno N., Yamaoka Y., Miyake M. (2002)** Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology*. 122: 376-386
- Hashimoto N., Jin H., Liu T., Chensue S. W., Phan S. H. (2004)** Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 113: 243-252
- Hay E. (1995)** An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*. 154: 8-20
- Henry T. D., Abraham J. A. (2000)** Review of preclinical and clinical results with vascular endothelial growth factors for therapeutic angiogenesis. *Curr Interv Cardiol Rep*. 2: 228-241
- Herrera H. R., Geary J., Whitehead P., Evangelisti S. (1991)** Revascularization of the lower extremity with omentum. *Clin Plast Surg*. 18: 491-495
- Herrick S. E., Mutsaers S. E. (2004)** Mesothelial progenitor cells and their potential in tissue engineering. *Int J Biochem Cell Biol*. 36: 621-642
- Herrmann H., Aebi U. (2000)** Intermediate filaments and their associates: Multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol*. 12: 79-90
- Hertzler A. E. (1919)** The peritoneum. In: Hertzler A. E. (editor) *St. Louis. Mosby Company*. p. 264-265
- Hofer I. E., van Royen N., Jost M. M. (2006)** Experimental models of arteriogenesis: differences and implications. *Lab Anim (NY)*. 35: 36-44
- Horch R. E., Horbach T., Lang W. (2007)** The nutrient omentum free flap: revascularization with vein bypasses and greater omentum flap in severe arterial ulcers. *J Vasc Surg*. 45: 837-840
- Hosgood G. (1990)** The omentum-the forgotten organ: physiology and potential surgical applications in dogs and cats. *Comp Cont Ed Pract Vet*. 12: 45-51

- Houck K. A., Leung D. W., Rowland A. M., Winer J., Ferrara N. (1992)** Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem.* 267: 26031-26037
- Iba O., Matsubara H., Nozawa Y., Fujiyama S., Amano K., Mori Y., Kojima H., Iwasaka T. (2002)** Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation.* 106: 2019-2025
- Ibrahimi O. A., Zhang F., Eliseenkova A. V., Itoh N., Linhardt R. J., Mohammadi M. (2004)** Biochemical analysis of pathogenic ligand-dependent FGFR2 mutations suggests distinct pathophysiological mechanisms for craniofacial and limb abnormalities. *Hum Mol Genet.* 13: 2313-2324
- Ikeda E., Achen M. G., Breier G., Risau W. (1995)** Links Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem.* 270:19761-19766
- Isacchi A., Bergonzoni L., Sarmientos P. (1990)** Complete sequence of a human receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. *Nucleic Acids Res.* 18: 1906
- Ishihara T., Ferrans V. J., Jones M., Boyce S. W., Kawanami O., Roberts W. C. (1980)** Histologic and ultrastructural features of normal human parietal pericardium. *Am J Cardiol.* 46: 744-753
- Issbrücker K., Marti H. H., Hippenstiel S., Springmann G., Voswinckel R., Gaumann A., Breier G., Drexler H. C., Suttrop N., Clauss M. (2003)** p38 MAP kinase--a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability. *FASEB J.* 17: 262-264
- Ito N., Huang K., Claesson-Welsh L. (2001)** Signal transduction by VEGF receptor-1 wild type and mutant proteins. *Cell Signal.* 13: 849-854
- Iwano M., Plieth D., Danoff T. M., Xue C., Okada H., Neilson E. G. (2002)** Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest.* 110: 341-350
- Jain R. K. (2003)** Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 9: 685-693

- Jaye M., Schlessinger J., Dionne C. A. (1992)** Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochim Biophys Acta*. 1135: 185-199
- Jayne D. G., Perry S. L., Morrison E., Farmery S. M., Guillou P. J. (2000)** Activated mesothelial cells produce heparin-binding growth factors: implications for tumour metastases. *Br J Cancer*. 82: 1233-1238
- Jimenez S. A., Martinez A. (1992)** Fibroblasts. In: Roitt I. M., Delves P. J. (editors) *Encyclopedia of Immunology*. London. Academic Press. p. 562-567
- Jiménez-Heffernan J. A., Aguilera A., Aroeira L. S., Lara-Pezzi E., Bajo M. A., del Peso G., Ramírez M., Gamallo C., Sánchez-Tomero J. A., Alvarez V., López-Cabrera M., Selgas R. (2004)** Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis. *Virchows Arch*. 444: 247-256
- Johansson C. B., Lothian C., Molin M., Okano H., Lendahl U. (2002)** Nestin enhancer requirements for expression in normal and injured adult CNS. *J Neurosci Res*. 69: 784-794
- Kachinsky A. M., Dominov J. A., Miller J. B. (1994)** Myogenesis and the intermediate filament protein, nestin. *Dev Biol*. 165: 216-228
- Kachinsky A. M., Dominov J. A., Miller J. B. (1995)** Intermediate filaments in cardiac myogenesis: Nestin in the developing mouse heart. *J Histochem Cytochem*. 43: 843-847
- Kaelin W. G. Jr. (2003)** The von Hippel-Lindau gene, kidney cancer, and oxygen sensing. *J Am Soc Nephrol*. 14: 2703-2711
- Karkkainen M. J., Mäkinen T., Alitalo K. (2002)** Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat Cell Biol*. 4: E2-E5
- Kendall R. L., Thomas K. A. (1993)** Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90: 10705-10709

- Kim Y., Kim H., Cho H., Bae Y., Suh K., Jung J. (2007)** Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Cell Physiol Biochem.* 20: 867-876
- Kirikoshi H., Sagara N., Saitoh T., Tanaka K., Sekihara H., Shiokawa K., Katoh M. (2000)** Molecular cloning and characterization of human FGF-20 on chromosome 8p21.3-p22. *Biochem Biophys Res Commun.* 274: 337-343
- Klein S., Bikfalvi A., Birkenmeier T. M., Giancotti F. G., Rifkin D. B. (1996)** Integrin regulation by endogenous expression of 18-kDa fibroblast growth factor-2. *J Biol Chem.* 271: 22583-90
- Klint P., Claesson-Welsh L. (1999)** Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Front Biosci.* 4: D165-D177
- Kluge T., Hovig T. (1967)** The ultrastructure of human and rat pericardium. II. Intercellular spaces and junctions. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 71: 547-563
- Krediet R. T. (1999)** The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int.* 55:341-356
- Kumar R., Yoneda J., Bucana C. D., Fidler I. J. (1998)** Regulation of distinct steps of angiogenesis by different angiogenic molecules. *Int J Oncol.* 12: 749-757
- Lamallice L., Houle F., Jourdan G., Huot J. (2004)** Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene.* 23: 434-445
- Lee P. L., Johnson D. E., Cousens L. S., Fried V. A., Williams L. T. (1989)** Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science.* 245: 57-60
- Lemmon S. K., Riley M. C., Thomas K. A., Hoover G. A., Maciag T., Bradshaw R. A. (1982)** Bovine fibroblast growth factor: comparison of brain and pituitary preparations. *J Cell Biol.* 95: 162-169

- Lendahl U., Zimmerman L. B., McKay R. D. (1990)** CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 60: 585-595
- Li L., Mignone J., Yang M., Matic M., Penman S., Enikolopov G., Hoffman R. (2003)** Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 9958-9961
- Liang Y., Sasaki K. (2000)** Expression of adhesion molecules relevant to leukocyte migration on the microvilli of liver peritoneal mesothelial cells. *Anat Rec*. 258: 39-46
- Liebermann-Meffert D. (1983)** The greater omentum: anatomy, physiology, pathology and surgery with a historical survey. In: Liebermann-Meffert D., White H., Vaubel E. (editors) *Berlin. New York. Springer-Verlag*. p. 3-30
- Liebermann-Meffert D. (2000)** The greater omentum. Anatomy, embryology, and surgical applications. *Surg Clin North Am*. 80: 275-293
- Longland C. J. (1953)** The collateral circulation of the limb. *Ann Roy Coll Surg Engl*. 13: 161-164
- Louagie Y., Legrand-Monsieur A., Remacle C., Maldague P., Lambotte L., Ponlot R. (1986)** Morphology and fibrinolytic activity of canine autogenous mesothelium used as venous substitute. *Res Exp Med (Berl)*. 186: 239-247
- Lower R. (1669)** Tractatus de corde. Item de motu & colore sanguinis et chyli in eum transitu. In: Elzevirium D. (editor) *Amsterdam. Elzevier*.
- Lu W., Luo Y., Kan M., Mckeehan W. L. (1999)** Fibroblast growth factor-10. A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. *J Biol Chem*. 274: 12827-12834
- Maciag T., Cerundolo J., Ilsley S., Kelley P. R., Forand R. (1979)** An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76: 5674-5678

- Maciag T., Mehlman T., Friesel R., Schreiber A. B. (1984)** Heparin binds endothelial cell growth factor, the principal endothelial cell mitogen in bovine brain. *Science*. 225: 932-935
- Mackay A. M., Tracy R. P., Craighead J. E. (1990)** Cytokeratin expression in rat mesothelial cells in vitro is controlled by the extracellular matrix. *J Cell Sci*. 95: 97-107
- Madison L. D., Bergstrom-Porter B., Torres A. R., Shelton E. (1979)** Regulation of surface topography of mouse peritoneal cells. Formation of microvilli and vesiculated pits on omental mesothelial cells by serum and other proteins. *J Cell Biol*. 82: 783-797
- Maloney C. T. Jr., Wages D., Upton J., Lee W. P. (2003)** Free omental tissue transfer for extremity coverage and revascularization. *Plast Reconstr Surg*. 111: 1899-1904
- Mandl-Weber S., Cohen C. D., Haslinger B., Kretzler M., Sitter T. (2002)** Vascular endothelial growth factor production and regulation in human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int*. 61: 570-578
- Marics I., Adelaide J., Raybaud F., Mattei M. G., Coulier F., Planche J., de Lapeyriere O., Birnbaum D. (1989)** Characterization of the HST-related FGF.6 gene, a new member of the fibroblast growth factor gene family. *Oncogene*. 4: 335-340
- Marshall B. C., Santana A., Xu Q. P., Petersen M. J., Campbell E. J., Hoidal J. R., Welgus H. G. (1993)** Metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in mesothelial cells. Cellular differentiation influences expression. *J Clin Invest*. 91: 1792-1799
- Martin P., Hopkinson-Woolley J., McCluskey J. (1992)** Growth factors and cutaneous wound repair. *Prog Growth Factor Res*. 4: 25-44
- Mayani H. (2003)** A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Arch. Med. Res*. 34: 3-15

- Mclean D. H., Buncke H. J. Jr. (1972)** Autotransplant of omentum to a large scalp defect, with microsurgical revascularization. *Plast Reconstr Surg.* 49: 268-274
- Michalczyk K., Ziman M. (2005)** Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol.* 20: 665-671
- Miki T., Bottaro D. P., Fleming T. P., Smith C. L., Burgess W. H., Chan A. M., Aaronson S. A. (1992)** Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 246-250
- Minot C. S. (1883)** Origin of the mesoderm. *Science.* 2: 815-818
- Miyake A., Konishi M., Martin F. H., Hernday N. A., Ozaki K., Yamamoto S., Mikami T., Arakawa T., Itoh N. (1998)** Structure and expression of a novel member, FGF-16, on the fibroblast growth factor family. *Biochem Biophys Res Commun.* 243: 148-152
- Miyamoto M., Naruo K., Seko C., Matsumoto S., Kondo T., Kurokawa T. (1993)** Molecular cloning of a novel cytokine cDNA encoding the ninth member of the fibroblast growth factor family, which has a unique secretion property. *Mol Cell Biol.* 13: 4251-4259
- Mohammadi M., Olsen S. K., Ibrahimi O. A. (2005)** Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16: 107-137
- Montesano R., Vassalli J. D., Baird A., Guillemin R., Orci L. (1986)** Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83: 7297-7301
- Mutsaers S. E., Whitaker D., Papadimitriou J. M. (2002)** Stimulation of mesothelial cell proliferation by exudates macrophages enhances serosal wound healing in a murine model. *Am J Pathol.* 160: 681-692
- Mutsaers S. E. (2002)** Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology.* 7: 171-191

- Mutsaers S. E., Bishop J. E., McGrouther G., Laurent G. J. (1997a)** Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 29: 5-17
- Mutsaers S. E., McAnulty R. J., Laurent G. J., Versnel M. A., Whitaker D., Papadimitriou J. M. (1997b)** Cytokine regulation of mesothelial cell proliferation in vitro and in vivo. *Eur J Cell Biol.* 72: 24-29
- Mutsaers S. E., Whitaker D., Papadimitriou J. M. (2000)** Mesothelial regeneration is not dependent on subserosal cells. *J Pathol.* 190: 86-92
- Nachtsheim R., Dudley B., McNeil P. L., Howdieshell T. R. (2006)** The peritoneal cavity is a distinct compartment of angiogenic molecular mediators. *J Surg Res.* 134: 28-35
- Nagy J. A., Vasile E., Feng D., Sundberg C., Brown L. F., Detmar M. J., Lawitts J. A., Benjamin L., Tan X., Manseau E. J., Dvorak A. M., Dvorak H. F. (2002)** Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med.* 196: 1497-1506
- Nakatake Y., Hoshikawa M., Asaki T., Kassai Y., Itoh N. (2001)** Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-22, preferentially expressed in the inner root sheath of the hair follicle. *Biochim Biophys Acta.* 1517: 460-463
- Nerem R. M., Seliktar D. (2001)** Vascular tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng.* 3: 225-243
- Neufeld G., Cohen T., Shraga N., Lange T., Kessler O., Herzog Y. (2002)** The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med.* 12: 13-19
- Neufeld G., Kessler O., Vadasz Z., Gluzman-Poltorak Z. (2001)** The contribution of proangiogenic factors to the progression of malignant disease: role of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Surg Oncol Clin N Am.* 10: 339-356
- Nichter L. S. (1989)** Omental microvascular arterial grafts. *Am Soc Surg Hand Newslett.* 66: 1

- Nishimura T., Utsunomiya Y., Hoshikawa M., Ohuchi H., Itoh N. (1999)** Structure and expression of a novel human FGF, FGF-19, expressed in the fetal brain. *Biochim Biophys Acta.* 1444: 148-151
- Ogata S., Naito T., Yorioka N., Kiribayashi K., Kuratsune M., Kohno N. (2004)** Effect of lactate and bicarbonate on human peritoneal mesothelial cells, fibroblasts and vascular endothelial cells, and the role of basic fibroblast growth factor. *Nephrol Dial Transplant.* 19: 2831-2837
- Ohbayashi N., Hoshikawa M., Kimura S., Yamasaki M., Fukui S., Itoh N. (1998)** Structure and expression of the mRNA encoding a novel fibroblast growth factor, FGF-18. *J Biol Chem.* 273: 18161-18164
- Ohtsuka H. S., Torigai K., Itoh M. (1980)** Free omental transfer to the lower limbs. *Ann Plast Surg.* 4: 70-78
- Olofsson B., Korpelainen E., Pepper M. S., Mandriota S. J., Aase K., Kumar V., Gunji Y., Jeltsch M. M., Shibuya M., Alitalo K., Eriksson U. (1998)** Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 11709-11714
- Ornitz D. M., Xu J., Colvin J. S., Mcewen D. G., Macarthur C. A., Coulier F., Gao G., Goldfarb M. (1996)** Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem.* 271: 15292-15297
- Ornitz D. M., Yayon A., Flanagan J. G., Svahn C. M., Levi E., Leder P. (1992)** Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol Cell Biol.* 12: 240-247
- Pampinella F., Roelofs M., Castellucci E., Chiavegato A., Guidolin D., Passerini-Glazel G., Pagano F., Sartore S. (1996)** Proliferation of submesothelial mesenchymal cells during early phase of serosal thickening in the rabbit bladder is accompanied by transient keratin 18 expression. *Exp Cell Res.* 223: 327-339

- Park J. E., Chen H. H., Winer J., Houck K. A., Ferrara N. (1994)** Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, *in vitro* and *in vivo*, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem.* 269: 25646-25654
- Park J. E., Keller G. A., Ferrara N. (1993)** The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell.* 4:1317-1326
- Partanen J., Makela T. P., Eerola E., Korhonen J., Hirvonen H., Claesson-Welsh L., Alitalo K. (1991)** FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. *EMBO J.* 10: 1347-1354
- Pederson W. C., Pribaz J. J. (1995)** Revascularization of the upper extremity with microsurgical omental transfer when faced with end stage ischemia. *J Reconstr Microsurg.* 11: 397
- Pelin K., Hirvonen A., Linnainmaa K. (1994)** Expression of cell adhesion molecules and connexins in gap junctional intercellular communication deficient human mesothelioma tumour cell lines and communication competent primary mesothelial cells. *Carcinogenesis.* 15: 2673-2675
- Pettersson A., Nagy J. A., Brown L. F., Sundberg C., Morgan E., Jungles S., Carter R., Krieger J. E., Manseau E. J., Harvey V. S., Eckelhoefer I. A., Feng D., Dvorak A. M., Mulligan R. C., Dvorak H. F. (2000)** Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest.* 80: 99-115
- Piela-Smith T. H., Korn J. H. (1995)** Aminopeptidase N: a constitutive cell-surface protein on human dermal fibroblasts. *Cell Immunol.* 162: 42-48
- Planat-Benard V., Silvestre J. S., Cousin B., André M., Nibbelink M., Tamarat R., Clergue M., Manneville C., Saillan-Barreau C., Duriez M., Tedgui A., Levy B., Pénicaud L., Casteilla L. (2004)** Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation.* 109: 656-663

- Plotnikov A. N., Schlessinger J., Hubbard S. R., Mohammadi M. (1999)** Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell*. 98: 641-650
- Plouët J., Moro F., Bertagnolli S., Coldeboeuf N., Mazarguil H., Clamens S., Bayard F. (1997)** Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *J Biol Chem*. 272: 13390-13396
- Postlethwaite A. E., Shigemitsu H., Kanangat S. (2004)** Cellular origins of fibroblasts: possible implications for organ fibrosis in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*. 16: 733-738
- Predescu D., Vogel S. M., Malik A. B. (2004)** Functional and morphological studies of protein transcytosis in continuous endothelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 287: L895-L901
- Presta M., Dell'era P., Mitola S., Moroni E., Ronca R., Rusnati M. (2005)** Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 16: 159-178
- Pugh C. W., Ratcliffe P. J. (2003)** Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*. 9: 677-684
- Qi J. H., Claesson-Welsh L. (2001)** VEGF-induced activation of phosphoinositide 3-kinase is dependent on focal adhesion kinase. *Exp Cell Res*. 263: 173-182
- Raftery A. T. (1973)** Regeneration of parietal and visceral peritoneum in the immature animal: a light and electron microscopical study. *Br J Surg*. 60: 969-975
- Ramsey S. J., Tweeddale D. N., Bryant L. R., Braunstein H. (1970)** Cytologic features of pericardial mesothelium. *Acta Cytol*. 14: 283-290
- Ranvier L. (1874)** Recherches sur la formation des mailles du grand épiploon. *Arch Physiol, 2nd series*. 1: 421-428

- Rapraeger A. C., Krufka A., Olwin B. B. (1991)** Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science*. 252: 1705-1708
- Risau W. (1997)** Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 386: 671-674
- Rubin J. S., Osada H., Finch P. W., Taylor W. G., Rudikoff S., Aaronson S. A. (1989)** Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86: 802-806
- Ryan G. B., Grobéty J., Majno G. (1971).** Postoperative peritoneal adhesions. A study of the mechanisms. *Am J Pathol*. 65: 117-148
- Ryan G. B., Grobéty J., Majno G. (1973)** Mesothelial injury and recovery. *Am J Pathol*. 71: 93-112
- Sakamoto H., Mori M., Taira M., Yoshida T., Matsukawa S., Shimizu K., Sekiguchi M., Terada M., Sugimura T. (1986)** Transforming gene from human stomach cancers and a noncancerous portion of stomach mucosa. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83: 3997-4001
- Sappino A. P., Schürch W., Gabbiani G. (1990)** Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as a marker of phenotypic modulations. *Lab Invest*. 63: 144-161
- Schlessinger J. (2000)** Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 103: 211-225
- Schlessinger J., Lax I., Lemmon M. (1995)** Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell*. 83: 357-360
- Senger D. R., Galli S. J., Dvorak A. M., Perruzzi C. A., Harvey V. S., Dvorak H. F. (1983)** Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 219: 983-985
- Seno M., Sasada R., Kurokawa T., Igarashi K. (1990)** Carboxyl-terminal structure of basic fibroblast growth factor significantly contributes to its affinity for heparin. *Eur J Biochem*. 188: 239-245

- Shibuya M. (2001)** Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct.* 26: 25-35
- Shibuya M., Ito N., Claesson-Welsh L. (1999)** Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2. *Curr Top Microbiol Immunol.* 237: 59-83
- Shibuya M., Yamaguchi S., Yamane A., Ikeda T., Tojo A., Matsushime H., Sato M. (1990)** Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene.* 5: 519-524
- Shing Y., Folkman J., Sullivan R., Butterfield C., Murray J., Klagsbrun M. (1984)** Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science.* 223: 1296-1299
- Simer P. H. (1934)** On the morphology of the omentum, with special reference to its lymphatics. *Am J Anat.* 54: 203-228
- Simons M. (2005)** Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation.* 111: 1556-66
- Simsir A., Fetsch P., Mehta D., Zakowski M., Abati A. (1999)** E-cadherin, N-cadherin, and calretinin in pleural effusions: the good, the bad, the worthless. *Diagn Cytopathol.* 20: 125-130
- Sivit C. J. (1996)** CT scan of mesentery-omentum peritoneum. *Radiol Clin North Am.* 34: 863-884
- Soker S., Fidler H., Neufeld G., Klagsbrun M. (1996)** Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF<sub>165</sub> via its exon 7-encoded domain. *J Biol Chem.* 271: 5761-5767
- Soker S., Takashima S., Miao H. Q., Neufeld G., Klagsbrun M. (1998)** Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell.* 92: 735-745
- Sompayrac S. W., Mindelzum R. E., Silverman P. M., Sze R. (1997)** The greater omentum. *Am J Roentgenol.* 168: 683-687

- Sparks S. R., Tripathy U., Broudy A., Bergan J. J., Kumins N. H., Owens E. L. (2002)** Small-caliber mesothelial cell-layered polytetrafluoroethylene vascular grafts in New Zealand white rabbits. *Ann Vasc Surg.* 16: 73-76
- Spivak-Kroizman T., Lemmon M. A., Dikic I., Ladbury J. E., Pinchasi D., Huang J., Jaye M., Crumley G., Schlessinger J., Lax I. (1994)** Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell.* 79: 1015-1024
- Street C., Lakey J., Seeberger K., Helms L., Rajotte R., Shapiro A., Korbitt G. (2004)** Heterogenous expression of nestin in human pancreatic tissue precludes its use as an islet precursor marker. *J Endocrinol.* 180: 213-225
- Stylianou E., Jenner L. A., Davies M., Coles G. A., Williams J. D. (1990)** Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.* 37: 1563-1570
- Sun X., Meyers E. N., Lewandoski M., Martin G. R. (1999)** Targeted disruption of *Fgf8* causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev.* 13: 1834-1846
- Suster S. (2000)** Recent advances in the application of immunohistochemical markers for the diagnosis of soft tissue tumors. *Semin Diagn Pathol.* 17: 225-235
- Takahashi T., Yamaguchi S., Chida K., Shibuya M. (2001)** A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* 20: 2768-2778
- Takahashi-Iwanaga H. (1994)** The three-dimensional cytoarchitecture of the interstitial tissue in the rat kidney. *Cell Tissue Res.* 264: 269-281
- Talwar S., Jain S., Porwal R., Laddha B. L., Prasad P. (1998)** Free versus pedicled omental grafts for limb salvage in Buerger's disease. *Aust N Z J Surg.* 68: 38-40
- Tanaka A., Miyamoto K., Minamino N., Takeda M., Sato B., Matsuo H., Matsumoto K. (1992)** Cloning and characterization of an androgen-induced growth factor

- essential for the androgen-dependent growth of mouse mammary carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89: 8928-8932
- Terman B. I., Carrion M. E., Kovacs E., Rasmussen B. A., Eddy R. L., Shows T. B. (1991)** Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. 6: 1677-83
- Theuer C. J., Bergamini T. M., Theuer H. H., Burns C. D., Proctor M. L., Garrison R. N. (1996)** Vena cava replacement with a peritoneum-lined vascular graft. *ASAIO J*. 42: 266-270
- Thornton S. C., Mueller S. N., Levine E. M. (1983)** Human endothelial cells: use of heparin in cloning and long-term serial cultivation. *Science*. 222: 623-625
- Trelstad R. L., Birk D. E. (1985)** The fibroblast in morphogenesis and fibrosis: cell topography and surface-related functions. *Ciba Found Symp*. 114: 4-19
- Tuan R. S., Boland G., Tuli R. (2003)** Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther*. 5: 32-45
- Urbich C., Dimmeler S. (2004)** Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 95: 343-353
- Usmanov N. U., Artykov K. P., Kurvanov U. A., Khodzhamuradov G. M., Gaibov A. D. (1989)** Microsurgical autotransplantation of the greater omentum to the upper limbs in obliterating lesions of the blood vessels. *Klin Khir*. 7: 66-67
- van de Rijn M., Rouse R. V. (1994)** CD34: a review. *Appl Immunohistochem*. 2: 71-80
- van Hinsbergh V. W., Kooistra T., Scheffer M. A., Hajo van Bockel J., van Muijen G. N. (1990)** Characterization and fibrinolytic properties of human omental tissue mesothelial cells. Comparison with endothelial cells. *Blood*. 75: 1490-1497
- Viñals F., Chambard J. C., Pouyssegur J. (1999)** p70 S6 kinase-mediated protein synthesis is a critical step for vascular endothelial cell proliferation. *J Biol Chem*. 274: 26776-26782

- Vineberg A. (1967)** Revascularization of the right and the left coronary arterial systems. Internal mammary artery implantation, epicardiectomy and free omental graft operation. *Am J Cardiol.* 19: 344-353
- Wagner J. C., Johnson N. F., Brown D. G., Wagner M. M. (1982)** Histology and ultrastructure of serially transplanted rat mesotheliomas. *Br J Cancer.* 46: 294-299
- Waltenberger J., Claesson-Welsh L., Siegbahn A., Shibuya M., Heldin C. H. (1994)** Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 269: 26988-26995
- Wang F., Kan M., Yan G., Xu J., Mckeehan W. L. (1995)** Alternately spliced NH<sub>2</sub>-terminal immunoglobulin-like Loop I in the ectodomain of the fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 lowers affinity for both heparin and FGF-1. *J Biol Chem.* 270: 10231-10235
- Wang N. S. (1974)** The regional difference of pleural mesothelial cells in rabbits. *Am Rev Respir Dis.* 110: 623-633
- Wang N. S. (1998)** Anatomy of the pleura. *Clin Chest Med.* 19: 229-240
- Warn R., Harvey P., Warn A., Foley-Comer A., Heldin P., Versnel M. Arakaki N., Daikuhara Y., Laurent G. J., Herrick S. E., Mutsaers S. E. (2001)** HGF/SF induces mesothelial cell migration and proliferation by autocrine and paracrine pathways. *Exp Cell Res.* 267: 258-266
- Weis S., Shintani S., Weber A., Kirchmair R., Wood M., Cravens A., McSharry H., Iwakura A., Yoon Y. S., Himes N., Burstein D., Doukas J., Soll R., Losordo D., Cheresch D. (2004)** Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J Clin Invest.* 113: 885-894
- Whitaker D., Manning L. S., Robinson B. W. S., Shilkin K. B. (1992)** The pathobiology of the mesothelium. In: Henderson D. W., Shilkin K. B., Langlois S. L. P., Whitaker D. (editors) Malignant mesothelioma. *New York. Hemisphere Publishing Corp.* p. 25-68

- Whitaker D., Papadimitriou J. (1985).** Mesothelial healing: morphological and kinetic investigations. *J Pathol.* 145: 159-175
- Whitaker D., Papadimitriou J. M., Walters M. N. (1980)** The mesothelium; techniques for investigating the origin, nature and behaviour of mesothelial cells. *J Pathol.* 132: 263-271
- Whitaker D., Papadimitriou J. M., Walters, M. N. (1982a)** The mesothelium and its reactions: a review. *Crit Rev Toxicol.* 10: 81-144
- Whitaker D., Papadimitriou J. M., Walters M. N. (1982b)** The mesothelium: a cytochemical study of “activated” mesothelial cells. *J Pathol.* 136: 169-179
- Wiese C., Rolletschek A., Kania G., Blyszczuk P., Tarasov K. V., Tarasova Y., Wersto R. P., Boheler K. R., Wobus A. M. (2004)** Nestin expression: a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci.* 61: 2510-2522
- Wiesmann C., Fuh G., Christinger H. W., Eigenbrot C., Wells J. A., de Vos A. M. (1997)** Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell.* 91: 695-704
- Wiggins R., Goyal M., Merritt S., Killen P. D. (1993)** Vascular adventitial cell expression of collagen I messenger ribonucleic acid in anti-glomerular basement membrane antibody induced crescentic nephritis in the rabbit. A cellular source for interstitial collagen synthesis in inflammatory renal disease. *Lab Invest.* 68: 557-565
- Wilkosz S., Ireland G., Khwaja N., Walker M., Butt R., de Giorgio-Miller A., Herrick SE. (2005)** A comparative study of the structure of human and murine greater omentum. *Anat Embryol (Berl).* 209: 251-261
- Woolard J., Wang W. Y., Bevan H. S., Qiu Y., Morbidelli L., Pritchard-Jones R. O., Cui T. G., Sugiono M., Waine E., Perrin R., Foster R., Digby-Bell J., Shields J. D., Whittles C. E., Mushens R. E., Gillatt D. A., Ziche M., Harper S. J., Bates D. O. (2004)** VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice

variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res.* 64: 7822-7835

- Wu L. W., Mayo L. D., Dunbar J. D., Kessler K. M., Baerwald M. R., Jaffe E. A., Wang D., Warren R. S., Donner D. B. (2000)** Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. *J Biol Chem.* 275: 5096-5103
- Xu J., Lawshe A., Macarthur C. A., Ornitz D. M. (1999)** Genomic structure, mapping, activity and expression of fibroblast growth factor 17. *Mech Dev.* 83: 165-178
- Yamashita T., Yoshioka M., Itoh N. (2000)** Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 277: 494-498
- Yanez-Mo M., Lara-Pezzi E., Selgas R., Ramirez-Huesca M., Dominguez-Jimenez C., Jimenez-Heffernan J. A. Aguilera A., Sánchez-Tomero J. A., Bajo M. A., Alvarez V., Castro M. A., del Peso G., Cirujeda A., Gamallo C., Sánchez-Madrid F., López-Cabrera M. (2003)** Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med.* 348: 403-413
- Yang A. H., Chen J. Y., Lin J. K. (2003)** Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int.* 63: 1530-1539
- Yang C., Zhang Z. H., Li Z. J., Yang R. C., Qian G. Q., Han Z. C. (2004)** Enhancement of neovascularization with cord blood CD133+ cell-derived endothelial progenitor cell transplantation. *Thromb Haemost.* 91: 1202-1212
- Yung S., Li F. K., Chan T. M. (2006)** Peritoneal mesothelial cell culture and biology. *Perit Dial Int.* 26: 162-173
- Zhan X., Bates B., Hu X. G., Goldfarb M. (1988)** The human FGF-5 oncogene encodes a novel protein related to fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol.* 8: 3487-3495
- Zhang Q. X., Magovern C. J., Mack C. A., Budenbender K. T., Ko W., Rosengart T. K. (1997)** Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in

---

---

omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. *J Surg Res.* 67: 147-154

**Zhou B., Poon M. C., Pu W. T., Han Z. C. (2007)** Therapeutic neovascularization for peripheral arterial diseases: advances and perspectives. *Histol Histopathol.* 22: 677-686

**Zhu H., Naito M., Umezu H., Moriyama H., Takatsuka H., Takahashi K., Shultz L. D. (1997)** Macrophage differentiation and expression of macrophage colony-stimulating factor in murine milky spots and omentum after macrophage elimination. *J Leukoc Biol.* 61: 436-444

**Zimmerman L., Parr B., Lendahl U., Cunningham M., McKay R., Gavin B., Mann J., Vassileva G., McMahon A. (1994)** Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron.* 12: 11-24

**Zocchi L. (2002)** Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J.* 20:1545-58

**- ANEXO -**

# Angiogenic capacity of human omental stem cells

I. García-Gómez\*, H. S. Goldsmith†, J. Angulo\*, A. Prados‡, P. López-Hervás§, B. Cuevas\*, M. Dujovny¶ and P. Cuevas\*¶

\*Departamento de Investigación, †Servicio de Hematología, and ‡Departamento de Cirugía General y Digestiva, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain  
†University of Nevada School of Medicine, Reno, Glenbrook, NV, USA  
‡Department of Neurosurgery, Wayne State University, Detroit, MI, USA

**Objectives:** The goals of the present study are to obtain, expand and characterize a stem cell population from human omentum and to evaluate its in vivo angiogenic capacities.

**Methods:** Human omental CD34<sup>+</sup> cells were obtained from samples of human omentum by density gradient centrifugation in Ficoll. Proliferative pattern, marker expression (by flow cytometry) and angiogenic growth factor synthesis by omental cell cultures were determined. In vivo angiogenic capacity of the cells was evaluated in rats.

**Results:** Omental stem cells showed a high rate of proliferation (Ki67 staining), expressed CD34 marker and synthesized bFGF and VEGF. When implanted in rats, omental cells promoted neovascularization. Human omental cells were localized in rat tissue, mainly forming the endothelium of neo-vessels. Implantation of omental cells also facilitated angiogenesis of rat origin.

**Conclusion:** CD34<sup>+</sup> cell population of human omentum could be responsible for the clinical benefit of omental transplantation by promoting angiogenesis and synthesizing angiogenic growth factors to facilitate revascularization of injured tissue. [Neurol Res 2005; 27: 807–811]

**Keywords:** Human omentum; stem cells; angiogenesis; bFGF; VEGF

## INTRODUCTION

The omentum has been used in surgery for more than 30 years. Omental transposition has been demonstrated to be beneficial in the surgical treatment of neurological injuries, including cerebral infarction<sup>1</sup> and spinal cord transection<sup>2</sup>. Furthermore, omental grafts have been used in treating neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease<sup>3</sup>. The omentum has multiple uses in reconstructive surgery as a graft material in treating chronic leg ulcers, necrotising fasciitis and soft tissue defects<sup>4</sup>, and is regularly used to wrap bowel anastomosis sites following surgery. However, the basis of the notable regenerative capacity of the omental tissue is not completely understood.

The omentum is essentially composed of two mesothelial sheets, which enclose predominantly adipocytes embedded in a highly vascularized connective tissue<sup>5</sup>, known as the submesothelial cell layer, containing fibroblast-like cells and resident inflammatory cells<sup>6</sup>. A component of the omentum's ability to rescue injured tissue is likely to be due to its angiogenic<sup>7,8</sup> and neurotrophic<sup>4,9</sup> properties, hence, its use as a pedicle

graft tissue for clinical conditions involving revascularization of ischemic brain, kidney, spleen, heart and spinal cord<sup>10,11</sup>. The exact mechanism of this early revascularization is unknown; however, it has been suggested that pro-angiogenic factors such as fibroblast growth factor (FGF)<sup>4</sup> and vascular endothelial growth factor (VEGF)<sup>12,13</sup>, which are present in high levels and can be isolated from the omentum, are involved.

We hypothesize that the human omentum could contain progenitor cells with angiogenic potential, which should be involved in the revascularization capacity of omental tissue. In the present study, we have evaluated the angiogenic potential of CD34<sup>+</sup> cells isolated from human omental samples.

## METHODS

### Cell isolation and culture

Human omental CD34<sup>+</sup> cells were obtained from samples of human omentum, from patients undergoing abdominal surgery, after informed consent. The samples of omentum were minced into small pieces and digested at 37°C in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.075% collagenase type I (Gibco BRL, Paisley, Scotland, UK) for 45 minutes. Mature adipocytes were discarded by centrifugation (300 g, 5 minutes). Low-density mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation (670 g, 30 minutes) from

Correspondence and reprint request to: Ignacio García-Gómez, Departamento de Investigación, Servicio de Histología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Ctra. Colmenar Viejo, Km 9,100, 28034 – Madrid, Spain. [biogarc@yahoo.es] Accepted for publication October 2005.

the pelleted cells with Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), and cultured at 37°C in humid air with 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Gibco) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco) and 0.1% antibiotic-antimycotic (Gibco). The medium was changed to remove the non-adherent cells 24 hours after seeding, and every 4 days thereafter. For subculture, cells were resuspended with 0.05% (v/v) trypsin in Hank's balanced salt solution (HBSS) (Bio Whittaker Europe, Belgium) when 80–90% reached confluence. All experiments were performed when cells were subcultured four to five times.

#### **In vivo angiogenesis assay**

The present study was performed in accordance with the European Union guidelines to reduce pain and discomfort of experimental animals. Eight adult male or female Sprague-Dawley rats (250–300 g) were used. Sterile gelatine sponges of 10 × 10 × 10 mm (Curaspon Dental, Clinimed Holding, Zwanenburg, Netherlands) were subcutaneously implanted in the back, under anaesthesia with 3 ml kg<sup>-1</sup> (i.p.) of a mixture of ketamine hydrochloride (2.5 mg ml<sup>-1</sup>), valium (2 mg ml<sup>-1</sup>), and atropine (0.1 mg ml<sup>-1</sup>). Animals were distributed as follows: Group A (*n*=4) sponges were loaded with 200 µl of DMEM; Group B (*n*=4) sponges were loaded with 75 × 10<sup>3</sup> cells in 200 µl of DMEM. Sponges were stored for 2 hours at 37°C in humid air with 5% CO<sub>2</sub> in sterile conditions before implantation. After implanting the sponge into the subcutaneous pouch, the skin was sutured. Histological evaluation of angiogenesis was performed 7 days after surgery.

All animals were immunosuppressed with a daily intraperitoneal injection of ciclosporin A (10 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>), from 24 hours before implanting the sponges to the day when the animal was sacrificed<sup>14</sup>.

After 7 days, rats were reanaesthetized and sponges were surgically extracted and fixed in a 4% paraformaldehyde solution and embedded in paraffin. Deparaffined sponge sections (6 µm) were used for immunohistochemistry or histology studies. For histological examination of vessel invasion, sections were stained with hematoxylin and eosin.

#### **Immunostaining**

Culture cells were plated in culture medium on glass coverslips in 24-well plates for 48 hours, at 24 hours the medium was changed to DMEM only. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 minutes, washed twice with PBS, permeabilized and then incubated with polyclonal anti-bFGF (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA), polyclonal anti-VEGF (US Biological, Swampscott, MA, USA) or monoclonal anti-Ki67 (Dako, Glostrup, Denmark). For immunodetection, cultures were incubated with biotin-goat anti-rabbit IgG or biotin-goat anti-mouse IgG (Zymed, San Francisco, CA, USA), 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Dako, Glostrup, Denmark) was used as chromagen. Negative control experiments were

performed in cultures that were incubated without primary antibody and subsequently processed with secondary antibody and reacted with chromagen. Deparaffined sponge sections were incubated in blocking buffer (0.1 M PBS containing 5% normal goat serum, 0.1% triton x-100) for 1 hour, thereafter incubated overnight with monoclonal anti-human CD34 (Novocastra, Newcastle, UK). The endogenous peroxidase was inactivated with hydrogen peroxide (0.03% in methanol). For immunodetection, samples were incubated with biotin-goat anti-mouse IgG and DAB was used as chromagen.

#### **bFGF concentration in conditioned medium**

Twenty-four well plates were plated with human omental CD34<sup>+</sup> cells (7.5 × 10<sup>3</sup> cells/well, *n*=3), or filled up with culture medium alone (*n*=3). After 24 hours, the medium was removed and centrifuged, the supernatants were collected and stored at -20°C until required. Analysis of bFGF in the supernatants was performed using standard ELISA methodology (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions.

#### **Immunophenotypic studies**

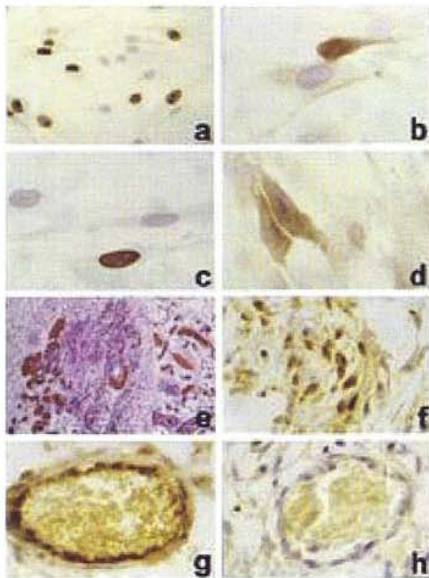
Cell cultures were analysed by four color flow cytometry (FCM) using a FACSort after staining with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (mAbs). The following conjugated antibodies were used at saturating amounts: (1) fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated: CD45 (purchased from Serotec, Oxford, UK); (2) phycoerythrin (PE) conjugated: CD117 (Becton/Dickinson Biosciences; BDB, San José, CA, USA); (3) peridinin chlorophyll protein (PerCP) conjugated: HLA-DR (BDB); (4) allophycocyanine (APC) conjugated: CD34 (BDB).

Briefly, ~1 × 10<sup>6</sup> nucleated cells were incubated for 10 minutes at room temperature (RT), with the above mentioned mAbs. Isotype-matched mouse non-specific immunoglobulins were used as a negative control. Data acquisition was performed on a FACSort flow cytometer (BDB) using the CELLQuest PRO software program (BDB) for at least 20,000 events/tube. For data analysis, the Paint-A-Gate software (BDB) was used. To quantitatively evaluate the expression of the different antigens analysed, the mean fluorescence intensity (MFI) expressed in relative linear arbitrary units scaled from 0 to 1023 was calculated. A marker was considered to be positive once its MFI levels were higher than those corresponding to the mean plus three standard deviations of the MFI found for the baseline autofluorescence levels obtained for the same cells.

## **RESULTS**

#### **Cell culture**

Cells in suspension were discarded by changing the medium 24 hours after the primary cultures. Adherent cells were seen to attach to culture dishes sparsely and the majority of the cells displayed a spindle-like shape.



**Figure 1:** Representative microphotographs from cultured human omental stem cells showing (a) active proliferative pattern (Ki67 immunoreactivity); (b) expression of cytoplasmic bFGF; (c) expression of nuclear bFGF; (d) expression of cytoplasmic VEGF. Panels e to f correspond to *in vivo* angiogenesis assays in the rat demonstrating (e) robust vascularization, (f) the presence of human CD34<sup>+</sup> cells in rat tissue, (g) human CD34<sup>+</sup> cells forming endothelial layer of neo-vessels; (h) neo-vessels formed only by endothelial rat cells (negative for CD34). Brown staining indicates positive immunoreactivity, except for panel e which corresponds to hematoxylin and eosin staining

These cells began to proliferate, and gradually grew to form small colonies, which expanded until confluence by day 8. Passaged cells behaved similarly to those in the primary culture. However, some cells were larger in size displaying broad flattened morphology. After five subcultures, the cells preserved the capacity to proliferate confirmed by the immunostaining with Ki-67, a marker of proliferation (Figure 1a).

#### Cell phenotyping

Flow cytometric characterization revealed that all the cells expressed the stem/progenitor marker CD34, which is characteristic of immature cells with proangiogenic potential (Figure 2). Nevertheless, all the cells were negative for CD117 (c-kit) and the leukocyte marker CD45, discarding a hematological lineage. HLA-DR, a class II antigen of HLA, was also absent (Figure 2b).

#### Neovascularization of sponges implanted subcutaneously

Sponges loaded with human omental CD34<sup>+</sup> cells (Group B), presented numerous functional vascular vessels evidenced by the presence of erythrocytes in the lumen (Figure 1e). Human CD34 immunostaining revealed human CD34<sup>+</sup> cells in sponges from group B

(Figure 1f). Some neo-vessels presented human CD34<sup>+</sup> positive cells incorporated to the endothelium (Figure 1g). Stimulation of angiogenesis by implanted cells was also demonstrated by the existence of neo-vessels composed only by rat cells, negative to human CD34 immunostaining (Figure 1h).

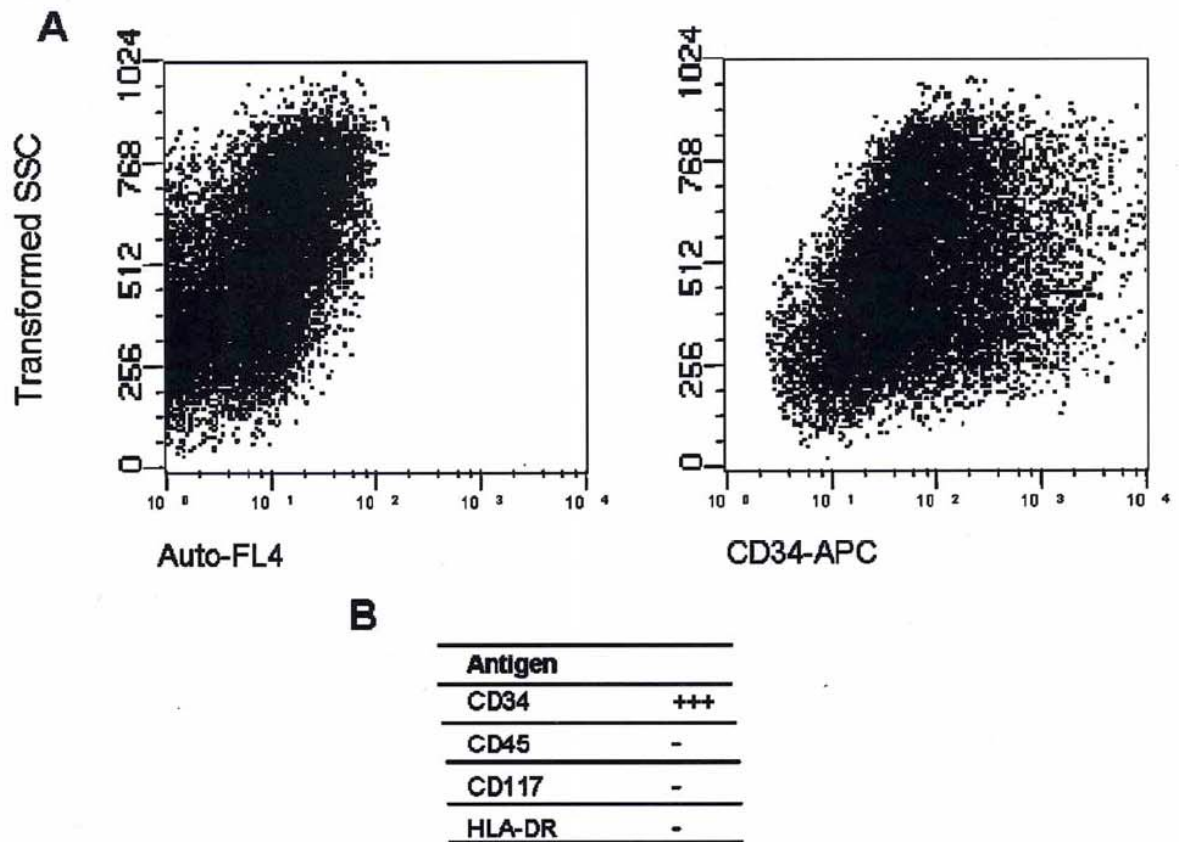
#### bFGF and VEGF expression

The immunocytochemistry studies clearly show that the omentum-derived cells express bFGF and VEGF in culture, two known growth factors involved in angiogenesis mechanisms. Cytoplasmic and nuclear localisation was obtained for bFGF (Figure 1b and c), while VEGF was expressed in cytoplasm (Figure 1d). Release of bFGF was also confirmed by the detection of significant amounts of this factor in culture medium after 24 hours of incubation with cells (Figure 3).

#### DISCUSSION

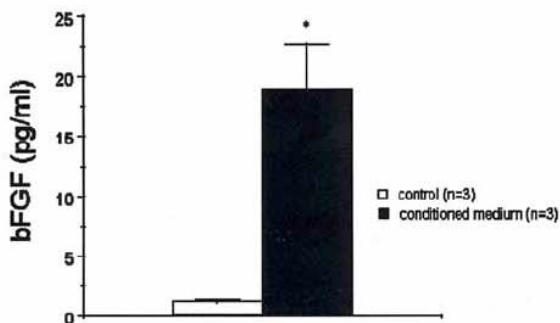
The findings of the present study reveal the existence of a cell population in human omentum with capacity to produce angiogenic growth factors and to promote *in vivo* angiogenesis. With specific isolation and culture conditions, we obtained a cell population positive for CD34. It has been reported that an immunohistochemical study of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue demonstrated an intense immunoreaction of CD34 in normal submesothelial fibroblasts<sup>15</sup>. The origin of interstitial fibroblasts has been largely overlooked, and their lineage is not fully elucidated. One hypothesis argues that tissue fibroblasts derive from a subpopulation of circulating leukocytes, termed fibrocytes, which express the progenitor marker CD34<sup>16,17</sup> and promote angiogenesis *in vivo*<sup>18</sup>. Fibrocyte origin of our culture cells were discarded because they did not express fibrocyte markers as CD45 or HLA-DR<sup>18</sup>. A second hypothesis propounds that interstitial fibroblasts are formed by local conversion from tissue epithelium by epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), which is particularly evident during fibrotic repair following tissue injury<sup>19</sup>. Therefore the transition surface mesothelial cells into cells with fibroblastic morphology indicates a dedifferentiation<sup>20</sup>. The authors cannot exclude the mesothelial origin of the cultures in the present study but no typical mesothelial cultures of cobblestone epitheloid morphology have been obtained, and our cultures clearly expressed CD34, a marker that was expressed in normal submesothelial fibroblasts in the peritoneum. It is also important to note that differentiated human endothelium expresses CD34<sup>21</sup>.

The cell lineage obtained from the omentum exhibits a high rate of proliferation, as demonstrated by the elevated proportion of cells that show positive staining for Ki-67, a marker of proliferative cell pattern<sup>22</sup>. This observation suggests that the omental cells obtained probably retain an undifferentiated phenotype. This is in accordance with previous studies reporting the isolation of stem cells from the omentum<sup>23,24</sup>.



**Figure 2:** (A) Representative dot plots showing detection of CD34 expression obtained from human omental cells (right panel) and its auto-fluorescence as control (left panel); (B) flow cytometry surface expression profile, obtained by mean fluorescence intensity (MFI). +++ indicates marker staining positive in >90% of cells; - indicates marker not expressed in cells

### Synthesis of bFGF by omental cells



**Figure 3:** Basic fibroblast growth factor (bFGF) synthesis by human omental cells. Concentration of bFGF was determined in culture medium conditioned or not (control) by 7500 cells for 24 hours in 24 well plates. n indicates the number of experiments. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* indicates  $p < 0.05$  versus control by an unpaired Student t-test

A fundamental characteristic of these cells is their ability to synthesize the angiogenic growth factors, such as bFGF and VEGF. There is large evidence demonstrating the preeminent role of FGF and VEGF in the process of angiogenesis<sup>25-27</sup>. The capacity to produce these factors confers to omental cells the potential to promote angiogenesis when implanted into a tissue by favoring an environment prone to new vessels formation. bFGF can be accumulated in the nuclei of several cell types and this localization has been proposed to be an important step in facilitating cell proliferation<sup>28</sup>. The fact that a significant number of our omental cells show positive immunostaining for nuclear FGF suggests that these cells could have potential mitogenic activities. In addition, FGF is known to act as a neurotrophic and neuroprotective factor<sup>29</sup>. The high expression of FGF could account for the neuroregenerative properties of the omentum, together with its reported capacity of synthesizing neurotrophins (BDNF, NT3/4 and NT5)<sup>9</sup>.

This potentiality of omental cells to promote angiogenesis became a fact when the implantation of these cells produces a clear angiogenic response *in vivo*. The histology of the sponges loaded with omental cells

demonstrates the ability of these cells to facilitate neovascularization. Interestingly, immunohistochemistry reveals that implanted cells are present in the endothelium of some of the neo-vessels. This can be stated by the use of an antibody specifically raised against human CD34, revealing the localization of human implanted cells into the rat tissue. On the other hand, the existence of neo-vessels that are not labeled with this marker demonstrates a process of angiogenesis derived from rat cells, suggesting that omental cells also stimulate the angiogenic capacity of resident cells. This is probably due to the paracrine effect of released angiogenic growth factors (i.e. bFGF and VEGF). In the past 2 years, a flurry of studies reproduced the effect of different cell types transplanted in animal models of myocardial infarction, stroke or peripheral arterial insufficiency and some pilot clinical studies have also appeared<sup>30-32</sup>. The benefits obtained have been ascribed mostly to the replacement of dead cells, but also to angiogenic growth factors produced by transplanted cells<sup>33</sup>.

In summary, the present study gives a scientific rationale to the clinic experience with the omental implants to regenerate and revascularize injured tissues and supports the use of omental stem cell as autologous regenerative and angiogenic therapies.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Mr Miles Rubin of Washington DC for his support of this project.

#### REFERENCES

- 1 Goldsmith HS, Sax DS. Omental transposition for cerebral infarction: A 13 year follow-up study. *Surg Neurol* 1999; **51**: 342-346
- 2 Goldsmith HS, Fonseca A, Jr, Porter J. Spinal cord separation: MRI evidence of healing after omentum collagen reconstruction. *Neurol Res* 2005; **27**: 115-123
- 3 Goldsmith HS. Role of the omentum in the treatment of Alzheimers disease. *Neurol Res* 2001; **23**: 555-564
- 4 Chamorro M, Carceller F, Llanos C, et al. The effect of omental wrapping on nerve graft regeneration. *Br J Plast Surg* 1993; **46**: 426-429
- 5 Herrick SE, Mutsaers SE. Mesothelial progenitor cells and their potential in tissue engineering. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 621-642
- 6 Wilkosz S, Ireland G, Khwaja N, et al. A comparative study of the structure of human and murine greater omentum. *Anat Embryol (Berl)* 2005; **209**: 251-261
- 7 Goldsmith HS, Griffith AL, Kupferman A, et al. Lipid angiogenic factor from omentum. *JAMA* 1984; **252**: 2034-2036
- 8 Goldsmith HS, Griffith AL, Catsimpoalas N. Increased vascular perfusion after administration of an omental lipid fraction. *Surg Gynecol Obstet* 1986; **162**: 579-583
- 9 Dujovny M, Ding YH, Ding Y, et al. Current concepts on the expression of neurotrophins in the greater omentum. *Neurol Res* 2004; **26**: 226-229
- 10 Goldsmith HS, Chen WF, Duckett SW. Brain vascularization by intact omentum. *Arch Surg* 1973; **106**: 695-698
- 11 Goldsmith HS, Duckett S, Chen WF. Prevention of cerebral infarction in the dog by intact omentum. *Am J Surg* 1975; **130**: 317-320
- 12 Zhang QX, Magovern CJ, Mack CA, et al. Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: Mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. *J Surg Res* 1997; **67**: 147-154
- 13 Mandl-Weber S, Cohen CD, Haslinger B, et al. Vascular endothelial growth factor production and regulation in human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 2002; **61**: 570-578
- 14 Sato Y, Araki H, Kato J, et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005; **106**: 756-763
- 15 Jimenez-Heffernan JA, Aguilera A, Aroeira LS, et al. Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis. *Virchows Arch* 2004; **444**: 247-256
- 16 Abe R, Donnelly SC, Peng T, et al. Peripheral blood fibrocytes: Differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 2001; **166**: 7556-7562
- 17 Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, et al. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1994; **1**: 71-81
- 18 Hartlapp I, Abe R, Saeed RW, et al. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. *FASEB J* 2001; **15**: 2215-2224
- 19 Iwano M, Plieth D, Danoff TM, et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002; **110**: 341-350
- 20 Sun X, Gulyas M, Hjerpe A. Mesothelial differentiation as reflected by differential gene expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; **30**: 510-518
- 21 Fina L, Molgaard HV, Robertson D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990; **75**: 2417-2426
- 22 Olvera M, Wickramasinghe K, Brynes R, et al. Ki67 expression in different epithelial types in columnar lined oesophagus indicates varying levels of expanded and aberrant proliferative patterns. *Histopathology* 2005; **47**: 132-140
- 23 van Harmelen V, Rohrig K, Hauner H. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue of obese subjects. *Metabolism* 2004; **53**: 632-637
- 24 Bakker AH, Van Dielen FM, Creve JW, et al. Preadipocyte number in omental and subcutaneous adipose tissue of obese individuals. *Obesity Res* 2004; **12**: 488-498
- 25 Cuevas P, Gimenez-Gallego G, Carceller F, et al. Single topical application of human recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF) promotes neovascularization in rat cerebral cortex. *Surg Neurol* 1993; **39**: 380-384
- 26 Bikialvi A, Klein S, Pintucci G, et al. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev* 1997; **18**: 26-45
- 27 Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; **407**: 249-257
- 28 Chen CH, Poucher SM, Lu J, et al. Fibroblast growth factor 2: From laboratory evidence to clinical application. *Curr Vasc Pharmacol* 2004; **2**: 33-43
- 29 Cuevas P, Carceller F, Gimenez-Gallego G. Acidic fibroblast growth factor prevents post-axotomy neuronal death of the newborn rat facial nerve. *Neurosci Lett* 1995; **197**: 183-186
- 30 Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res* 2002; **91**: 1092-1102
- 31 Chen J, Li Y, Katakowski M, et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res* 2003; **73**: 778-786
- 32 Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: Physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; **109**: 656-663
- 33 Itescu S, Schuster MD, Kocher AA. New directions in strategies using cell therapy for heart disease. *J Mol Med* 2003; **81**: 288-296