

## ORIGINAL

## Angiogénesis y vasculogénesis inducida por el trasplante intralesional de células madre mesenquimales adultas en un modelo experimental de daño medular traumático

### Angiogenesis and vasculogenesis induced by intralesional adult mesenchymal stem cell transplantation in an experimental spinal cord injury model

Vaquero J, Bonilla C, Otero L, Aguayo C, Oya S, Zurita M

Unidad de Investigación Neurociencias, Cátedra FUNDACIÓN MAPFRE-UAM para Investigación en Daño Cerebral, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Madrid.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

#### Resumen

**Objetivos:** Estudiar si las células madre adultas mesenquimales, del estroma de la médula ósea (BMSC) contribuyen a la angiogénesis y vasculogénesis, tras su trasplante intralesional en la médula espinal traumatizada.

**Material y métodos:** Se utilizó un modelo de lesión traumática medular estandarizada, en ratas Wistar y en cerdos adultos. A los 3 meses del traumatismo medular, en situación de paraplejía completa, se administraron intralesionalmente  $3 \times 10^6$  BMSC marcadas mediante transfección génica con el gen LacZ (en la rata) y  $30 \times 10^6$  BMSC marcadas con BrdU (en el cerdo). A los 3 meses del trasplante se estudió la zona del implante celular para detectar la presencia de vasos sanguíneos formados a expensas de las células trasplantadas.

**Resultados:** Tanto en la rata Wistar como en el cerdo, se observaron numerosos vasos sanguíneos con células a nivel endotelial y en la pared del vaso que expresaban los marcadores propios de las células trasplantadas.

**Conclusiones:** Las BMSC se pueden diferenciar *in vivo* hacia células endoteliales y hacia células musculares lisas, tras su trasplante intralesional en la médula espinal traumatizada, formando parte de nuevos vasos sanguíneos y contribuyendo a los fenómenos de angiogénesis y vasculogénesis necesarios para la regeneración del tejido nervioso lesionado.

**Palabras clave:**

Células madre mesenquimales. Terapia celular. Angiogénesis. Vasculogénesis. Traumatismo medular.

#### Abstract

**Objectives:** To determine whether adult mesenchymal stem cells (bone marrow stromal cells, BMSCs) contribute to angiogenesis and vasculogenesis following their intralesional implantation in the damaged spinal cord.

**Material and methods:** A standard spinal cord injury model was used in Wistar rats and adult pigs. Three months after spinal cord injury, under conditions of complete paraplegia,  $3 \times 10^6$  BMSCs labeled via genetic transfection with the LacZ gene (in rats), and  $30 \times 10^6$  BMSCs labeled with BrdU (in pigs), were administered in the spinal lesion zone. Three months after implantation, the cell implant zone was studied to detect the presence of blood vessels formed at the expense of the transplanted cells.

**Results:** In both the Wistar rats and pigs, numerous blood vessels were observed, with cells at endothelial level and in the vessel wall that expressed the markers inherent to the transplanted cells.

**Conclusions:** BMSCs can differentiate under *in vivo* conditions towards endothelial cells and towards smooth muscle cells, following their intralesional transplantation in the damaged spinal cord – forming part of new blood vessels and contributing to the angiogenesis and vasculogenesis required for regeneration of the damaged nerve tissue.

**Key words:**

Mesenchymal stem cells. Cell therapy. Angiogenesis. Vasculogenesis. Spinal cord injury.

---

#### Correspondencia

J. Vaquero. Servicio de Neurocirugía.  
Hospital Puerta de Hierro. Majadahonda, Madrid  
jvaquero@telefonica.net



## Introducción

El empleo de las células madre mesenquimales adultas, obtenidas del estroma de la médula ósea (Bone Marrow Stromal Cell o BMSC), se ha configurado como una de las estrategias más prometedoras en el campo de la terapia celular aplicada al sistema nervioso, ya sea para reparar lesiones traumáticas [1] o para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas [2]. Aunque la diferenciación de las BMSC hacia condrocitos, osteocitos y adipocitos, se ha documentado en numerosos estudios [3], se considera más discutible su transformación hacia células endoteliales y células musculares de la pared vascular, a pesar de las evidencias a favor de esta posibilidad, sobre todo en protocolos de regeneración miocárdica [4-7]. Desde un punto de vista teórico, la transformación de BMSC en elementos celulares constituyentes de vasos sanguíneos permitiría suponer que estas células, trasplantadas en los órganos lesionados, son capaces de establecer el lecho vascular necesario para que pueda llevarse a cabo la regeneración de los órganos donde se aplica la terapia celular. El propósito del presente trabajo es estudiar la capacidad de las BMSC murinas y porcinas para transformarse *in vivo* en células endoteliales y en células musculares de la pared vascular, en el seno del tejido nervioso, tras su trasplante intralesional en un modelo de lesión traumática de la médula espinal.

## Material y métodos

### Obtención y caracterización de las células madre mesenquimales

Para la obtención de las células madre mesenquimales murinas se utilizaron ratas Wistar macho, con un peso entre 200 y 250 g. Tras sacrificar los animales donantes con una mezcla de 70% CO<sub>2</sub> y 30% O<sub>2</sub>, se aislaron las tibias y los fémures siendo inmediatamente colocados a 4°C en medio alfa-MEM/10% FBS suplementado con antibiótico. Tras cortar las epífisis de los huesos en condiciones estériles, se extrajo la médula ósea mediante lavado de los huesos con una jeringuilla de insulina y aguja del n° 26 cargada con 2 ml de medio alfa-MEM completo, suplementado con antibiótico, y 10% de suero fetal bovino. Posteriormente las células de la médula ósea fueron disgregadas mediante pipeteado y filtradas a través de una malla de nilón de 70 micras. La suspensión celular obtenida fue sometida a una centrifugación en gradientes de densidad (técnica de Ficoll-Hypaque) y cultivada en frascos de 175 cm<sup>2</sup> e incubadas en una estufa a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. A las 48 horas de incubación, el sobrenadante conteniendo restos celulares y

células no adherentes fueron eliminados, recogiendo solamente las células adherentes. El cultivo se lavó con *buffer* fosfato salino (PBS), pH 7,4, añadiendo 12 ml de medio alfa-MEM completo con 20% de FBS, que era reemplazado cada 2-3 días, durante 14 días. Cuando las células alcanzaron un desarrollo cercano a la confluencia, éstas fueron levantadas del frasco de cultivo mediante su incubación con 3 ml de tripsina 0.25%/1mM EDTA durante 4-5 minutos a 37° C. Tras este periodo de incubación, la tripsina fue inactivada con 6 ml de medio alfa-MEM completo. Las células obtenidas, tras ser centrifugadas a 1200 rpm durante 15 minutos, fueron lavadas, al menos dos veces, con medio alfa-MEM/10%FBS mediante centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos cada lavado. Finalmente el *pellet* obtenido fue diluido en medio alfa-MEM/20%FBS y sometido a recuento mediante el test de viabilidad de azul tripán. Tras el recuento, las células madre fueron subcultivadas en frascos de 75 cm<sup>2</sup> en una concentración de 8x10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup> en presencia de 12 ml de medio alfa-MEM/20%FBS con antibióticos y glutamina, a una concentración de 2mM.

Para caracterizar inmunohistoquímicamente las células madre obtenidas, fueron puestas en cultivo con medio alfa-MEM/20%FBS suplementado con antibióticos y glutamina, sobre portaobjetos estériles e incubadas a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Al cabo de 48 horas de cultivo los portaobjetos fueron lavados con *buffer* PBS y fijados con paraformaldehído tamponado al 4%. A continuación, tras llevar a cabo el desmascaramiento antigénico de las células con *buffer* citrato pH.6 durante 10 minutos en microondas, se procedió a inhibir la peroxidasa endógena mediante la incubación de las células con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 30 minutos. Tras lavar las células con PBS, se procedió al bloqueo de los sitios no específicos mediante la incubación de las células con suero no inmune de caballo al 8%, durante 30 minutos. Sin lavar las muestras, se añadió el anticuerpo primario y se dejó incubar toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Tras lavar dos veces las células con PBS se añadió el anticuerpo secundario biotinilado, durante 30 minutos, al cabo de los cuales las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con estreptoavidina-peroxidasa, también 30 minutos, para posteriormente ser reveladas mediante la adición de diaminobenzidina (DAB). Las BMSC obtenidas se caracterizaron inmunohistoquímicamente por ser positivas a CD105, CD73 y vimentina, y negativas a CD34, CD45, CD3, CD14, CD19, CD38 y glicoforina-A.

Las BMSC fueron expandidas en cultivo, hasta alcanzar suficiente número de células para proceder a su inyección intralesional, siempre con una viabilidad superior al 95%.



El mismo procedimiento fue utilizado en el caso de las BMSC porcinas, con la diferencia de que en estos animales la obtención de BMSC fue autóloga, por medio de punción de cresta iliaca en cada uno de los animales. Se utilizaron para el estudio 4 cerdos adultos, tipo «minipig». Se obtuvieron aproximadamente entre 20-30 ml de médula ósea de la cresta iliaca de cada animal, diluyéndose en una proporción 1:1 en solución de Hank (HBSS) con una jeringuilla de 2 ml y una aguja de insulina, se disoció mecánicamente la médula ósea hasta obtener una solución homogénea que fue pasada a través de una malla de nilón de 70- $\mu$ m nilón, y sometida a un gradiente de Ficoll. Las muestras se centrifugaron a 2250 rpm, durante 20 minutos, a temperatura ambiente y el *pellet* obtenido se lavó en HBSS. Las BMSC se colocaron luego en frascos de cultivo de 175 cm<sup>2</sup>, con 20 ml de medio alpha-MEM conteniendo 20% de suero fetal bovino (FBS), 2 mM de L-glutamina, 100 units/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin y 25 ng/ml de anfotericina-B. Las células fueron incubadas a 37°, en 5% CO<sub>2</sub>, durante 3 días, momento en que se separaron las células no adherentes, reemplazando el medio de cultivo. Las células adherentes alcanzaron confluencia de 10 a 15 días más tarde y se sometieron a tripsina y expandieron en frascos de cultivo de 175 cm<sup>2</sup> (5x10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup>). Se realizaron estudios de citometría de flujo con un citómetro Cytomic FC 500-MPL (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, EEUU) y se caracterizaron las BMSC a utilizar como células positivas a CD105 y negativas a CD31, CD45 y CD133. Las BMSC fueron marcadas a continuación con 5'-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), como paso previo a su administración intralésional en la médula espinal contusionada. Para ello, las BMSC se cultivaron con 10  $\mu$ M BrdU (Sigma-Aldrich SA, Madrid) durante 48 horas. Posteriormente, fueron lavadas tres veces con alfa-MEM sin suero y el cultivo fue tratado durante 5 minutos, a 37°, con tripsina (0,25%) y EDTA 1mM. Las BMSC fueron re-suspendidas en plasma autólogo y se inyectaron en la zona de lesión, a los 3 meses de evolución postraumática.

#### Modelo de lesión traumática medular

En el caso de las ratas Wistar (n: 10) todos los animales fueron anestesiados mediante la administración intraperitoneal de una mezcla de diazepam (0.5 mg/100 g de peso corporal) y ketamina (75 mg/kg de peso corporal). Posteriormente los animales fueron sometidos a una laminectomía a nivel T6-T8 para exponer la duramadre. La lesión fue causada mediante el impacto sobre la zona medular expuesta de una barra cilíndrica de acero con superficie de sección de 12 mm<sup>2</sup>. El peso total de la barra era de 25 g y se dejó caer

verticalmente sobre la superficie de la médula espinal desde una altura de 10 cm, para lo cual era guiada a través de un cilindro hueco adaptado al área de la laminectomía previa. A los 3 meses, en situación de paraplejía completa, los animales recibieron, en la zona de la lesión traumática, una inyección de 3 x 10<sup>6</sup> BMSC (obtenidas de ratas donantes singénicas) en un volumen total de 10 ml de suero fisiológico y a un ritmo de administración de 0.5  $\mu$ l/min, con ayuda de un microinyector (mod 310, Stoelting Co, Wood Dale, IL, USA). Antes de la administración intralésional, las BMSC fueron marcadas mediante una transfección retroviral, introduciendo en las células el gen LacZ (Genetrix SL, Madrid) que permite su identificación posterior mediante el anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -galactosidasa, que reacciona específicamente con la  $\beta$ -galactosidasa en las células transfectadas y en células y tejidos que expresen el gen LacZ de *Escherichia coli*. Las BMSC fueron re-suspendidas en suero fisiológico y se inyectaron en la zona de lesión, a los 3 meses de evolución postraumática (aproximadamente 3 x 10<sup>6</sup> BMSC en cada animal).

En el caso de los cerdos (n: 4), la lesión se hizo por medio de una compresión medular durante 30 minutos, utilizando un clip de Heifetz. Tres meses después, en situación de paraplejía completa, se les administró intralésionalmente a los animales, mediante un nuevo abordaje quirúrgico a la zona de lesión traumática, un total aproximado de 30 x 10<sup>6</sup> BMSC autólogas, suspendidas en plasma autólogo y marcadas con BrdU.

A lo largo del presente estudio, todos los animales fueron manejados siguiendo la normativa legal española acerca de la utilización de animales de laboratorio y los principios para el cuidado y manejo de animales establecidos por la Sociedad Americana de Investigación Médica.

#### Estudios histológicos e inmunohistoquímicos

Tras el sacrificio de los animales, a los 3 meses de la inyección intralésional de las BMSC, la médula espinal fue extraída en su totalidad y la zona correspondiente a la lesión fue procesada para estudios histológicos convencionales y para estudios inmunohistoquímicos. En el caso de las piezas obtenidas de ratas Wistar se hicieron estudios inmunohistoquímicos para constatar expresión de  $\beta$ -galactosidasa, a partir de bloques de tejido incluidos en parafina. En el caso de las piezas obtenidas de los cerdos, se practicaron estudios histológicos convencionales con hematoxilina-eosina, y estudios inmunohistoquímicos para detectar BrdU, tanto en cortes de material incluido en parafina como a partir de cortes de congelación, utilizando técnicas de inmunofluorescencia.

Para detectar  $\beta$ -galactosidasa, en el material procedente de ratas Wistar, se utilizó un anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -galactosidasa de Sigma (St Louis, MO, EEUU) a una dilución de 1:1000. Para detectar BrdU en el material procedente de cerdos, se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-BrdU (Chemicon International) (1:100). Los cortes se incubaron el anticuerpo secundario conjugado con biotina (1:200; Vector Inc., CA, USA) o conjugado con fluoresceína (FITC) o Texas Red (1:500, Jackson ImmunoResearch Lab. Inc., West Grove, PA, USA). Los cortes incubados con el anticuerpo secundario conjugado con biotina se lavaron en PBS y se incubaron con el complejo ABC (Vector) usándose diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. Los cortes incubados con anticuerpo conjugado con FITC o Texas Red se tiñeron con diamidino-fenilindol-diclorhidrato (Merck KgaA, Darmstadt, Germany).

## Resultados

Los resultados obtenidos permitieron objetivar, en el caso del material procedente de ratas Wistar, que las zonas de necrosis centromedular traumática estaban parcialmente ocupadas por tractos de tejido y por células que expresaban  $\beta$ -galactosidasa. Entre estas células se podían apreciar estructuras identificables como vasos sanguíneos, cuyas paredes también estaban claramente marcadas con  $\beta$ -galactosidasa (Figura 1). Aunque la tinción inmunohistoquímica permitió detectar vasos marcados, la expresión citoplasmática de la  $\beta$ -galactosidasa no permitió obtener imágenes concluyentes para poder asegurar si el marcaje correspondía a células de la pared vascular o a células endoteliales (Figura 2). En el caso del material estudiado correspondiente a los cerdos con lesión medular y trasplante de BMSC, se repitieron los mismos hallazgos, apreciándose numerosos vasos sanguíneos, con aspecto microscópico de capilares, arteriolas o venas, en cuyas paredes existían células cuyos núcleos estaban claramente marcados con BrdU, identificándose igualmente núcleos marcados en posición endotelial (Figura 3). El marcaje nuclear de BrdU era también muy evidente en células de aspecto muscular liso, identificables en la pared de arteriolas de gran tamaño (Figura 4). Los estudios inmunohistoquímicos realizados mediante inmunofluorescencia confirmaron los mismos hallazgos, apreciándose vasos de gran tamaño que tenían células marcadas con BrdU, tanto en su pared como en posición endotelial (Figura 5).

## Discusión

El presente estudio ha permitido demostrar que tras el trasplante intramedular de células madre mesenquimales adultas, previamente marcadas para poder ser detectadas

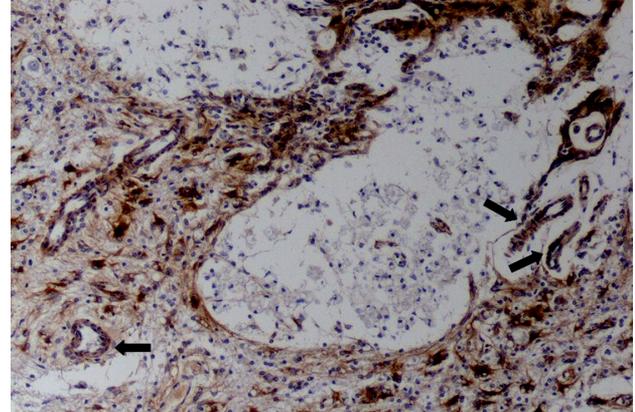


Fig. 1. Médula espinal traumatizada de rata Wistar, tres meses después del trasplante de BMSC. Estudio inmunohistoquímico para detección de  $\beta$ -galactosidasa. Se observan células marcadas con aspecto astrocitario, y estructuras vasculares que también muestran marcaje en su pared (flechas) (x100).

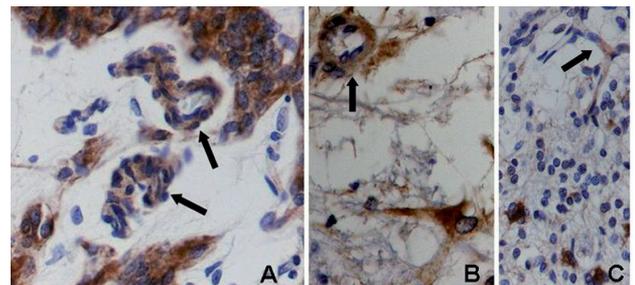


Fig. 2. A,B y C: Estructuras vasculares (flechas) marcadas con  $\beta$ -galactosidasa, en la médula espinal previamente traumatizada, tres meses tras la administración intratecal de BMSC (x200).

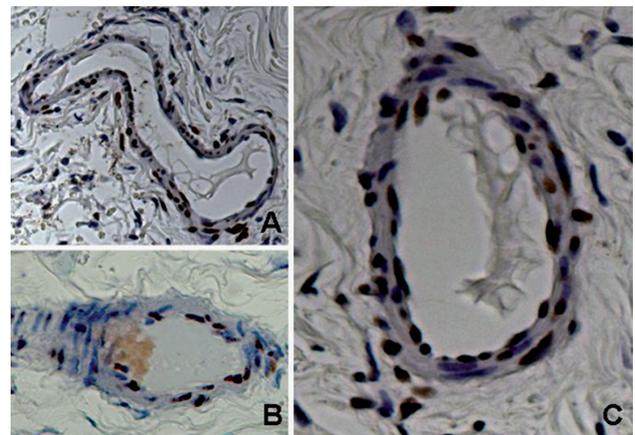
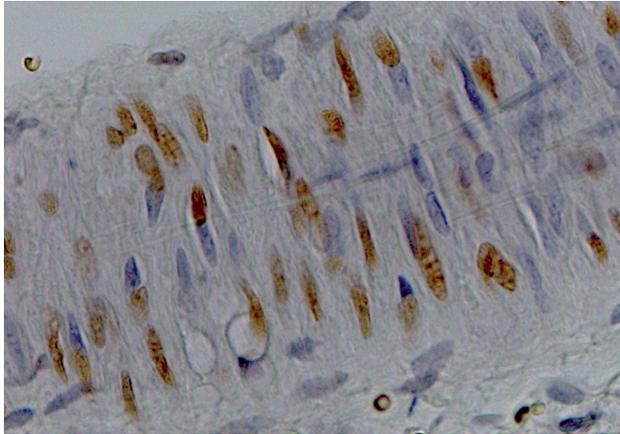
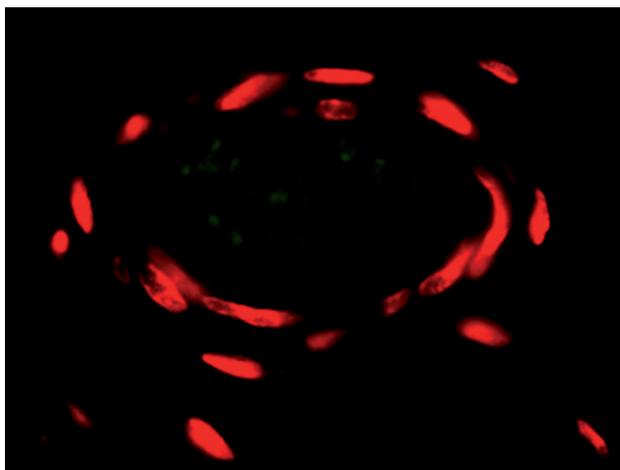


Fig. 3. A,B y C: Médula espinal del cerdo adulto, tres meses tras haber recibido la administración local de BMSC. Se observan vasos sanguíneos con células marcadas (marcaje nuclear de BrdU). Las células marcadas se identifican tanto a nivel endotelial como en las paredes del vaso.



**Fig. 4.** Médula espinal del cerdo adulto, tres meses tras haber recibido la administración local de BMSC. Células marcadas con BrdU (marcaje nuclear) formando parte del tejido muscular liso de una arteriola de gran tamaño (x400).



**Fig. 5.** Médula espinal del cerdo adulto, tres meses tras haber recibido la administración local de BMSC. Células marcadas con BrdU, formando parte del endotelio y de la pared vascular de un vaso sanguíneo. Inmunofluorescencia (x 200).

por medio de técnicas inmunohistoquímicas, se pueden identificar estas células, a los tres meses del trasplante, con una localización y aspecto microscópico que sugieren una diferenciación a células musculares lisas y a células endoteliales, formando estructuras vasculares y contribuyendo a la formación de un lecho vascular en el tejido huésped, y por tanto a la angiogénesis y vasculogénesis de la médula espinal previamente lesionada. Este hallazgo apoya las observaciones previas a favor de que el trasplante de BMSC en zonas de lesión traumática medular es capaz de recons-

truir anatómicamente la zona lesionada, llegando a formar un nuevo tejido nervioso, que sirve de soporte para el paso de axones en regeneración [8].

En estudios realizados por diversos autores, se ha discutido si las células madre mesenquimales son capaces de transformarse *in vivo* en células endoteliales, existiendo evidencias a favor de esta posibilidad, en presencia de factores de angiogénesis, tales como el VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) [9], cuya expresión aumenta en el tejido de la médula espinal traumatizada de forma inmediata tras la lesión [10]. Por otra parte, es bien conocido que las células madre mesenquimales pueden adquirir *in vitro* características de células endoteliales cuando son cultivadas en medios suplementados con VEGF [11] o en presencia de hipoxia [12], lo que también ocurre en el seno del tejido nervioso tras ser sometido a una lesión traumática.

En cuanto a la diferenciación de las BMSC hacia células musculares lisas, es un hecho bien caracterizado en estudios *in vitro* [9] y diversas observaciones experimentales han demostrado que estas células expresan alfa-actina, lo que sugiere su posible diferenciación muscular [13,14]. Este hallazgo apoya nuestras observaciones *in vivo* que demuestran una evolución de las BMSC administradas localmente hacia células que forman parte de la pared de arteriolas, con morfología de células musculares lisas.

En cualquier caso, e independientemente de los mecanismos fisiopatológicos por los cuales las BMSC pueden contribuir a la formación de nuevos vasos sanguíneos cuando son administradas en el seno de diferentes órganos y tejidos [15-25], nuestro estudio confirma que tras la administración intralesional de BMSC en situación de paraplejia crónica, estas células se diferencian a células endoteliales y a células musculares de las paredes vasculares, en el curso de los tres meses siguientes a su implante local, contribuyendo así a la constitución del lecho vascular necesario para lograr una regeneración medular a largo plazo. ■

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vaquero J, Zurita M. Bone marrow stromal cells for spinal cord repair: a challenge for contemporary neurobiology. *Histol Histopathol* 2009; 24:107-16.
2. Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, Nasuelli N, et al. Stem cell treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurol Sci* 2008; 265:78-83.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-7.



4. Silva GV, Litovsky S, Assad JA, Sousa AL, Martin BJ, Vela D, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into a endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 2005; 111:150-6.
5. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287:H2670-6.
6. Annabi B, Naud E, Lee Y-T, Eliopoulos N, Galipeau J. Vascular progenitors derived from murine bone marrow stromal cells are regulated by fibroblast growth factor and are avidly recruited by vascularizing tumors. *J Cell Biochem* 2004; 91:1146-58.
7. Zimmet JM, Hare JM. Emerging role for bone marrow derived mesenchymal stem cells in myocardial regenerative therapy. *Basic Res Cardiol* 2005; 100:471-81.
8. Zurita M, Vaquero J. Bone marrow stromal cells can achieve cure of chronic paraplegic rats: Functional and morphological outcome one year after transplantation. *Neurosci Lett* 2006; 402: 51-6.
9. Ball SG, Shuttleworth CA, Kieley CM. Mesenchymal stem cells and neovascularization: role of platelet-derived growth factor receptors. *J Cell Mol Med* 2007; 11:1012-30.
10. Vaquero J, Zurita M, Oya S, Coca S. Vascular endothelial growth/permeability factor in spinal cord injury. *J Neurosurg (Spine 2)* 1999; 90:220-3.
11. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, et al. Mesenchymal stem cells can differentiate into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 2004; 22:377-84.
12. Annabi B, Lee Y-T, Turcotte S, Naud E, Desrosiers RR, Champagne M, et al. Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem Cells* 2003; 21:337-47.
13. Galmiche MC, Kotliansky VE, Briere J, Herve P, Charbord P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood* 2002; 82:66-76.
14. Kinner B, Zaleskas JM, Spector M. Regulation of smooth muscle actin expression and contraction in adult human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2002; 278:72-83.
15. Al-Khaldi A, Eliopoulos N, Martineau D, Lejeune L, Lachapelle K, Galipeau J. Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo. *Gene Ther* 200;10:621-9.
16. Chen J, Li Y, Zhang R, Katakowski M, Gautam SC, Xu Y, et al. Combination therapy of stroke in rats with a nitric oxide donor and human bone marrow stromal cells enhances angiogenesis and neurogenesis. *Brain Res* 2004; 1005:21-8.
17. Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang L, Xu YX, Gautam SC, et al. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ Res* 2003; 92:692-9.
18. Chun KW, Gye MS, Kim WK. The effect of human bone marrow stromal cells and dermal fibroblasts on angiogenesis. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117:829-35.
19. Kaigler D, Krebsbach PH, Polverini PJ, Mooney DJ. Role of vascular endothelial growth factor in bone marrow stromal cell modulation of endothelial cells. *Tissue Eng* 2003; 9:95-103.
20. Kim Y, Kim H, Cho H, Bae Y, Suh K, Jung J. 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* 2007; 20:867-76.
21. Mao X, Zeng Q, Wang X, Cao L, Bai Z. Angiogenic potency of bone marrow stromal cells improved by ex vivo hypoxia prestimulation. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2004; 24:566-8.
22. Shi E, Kazui T, Jiang X, Washiyama N, Yamashita K, Tera-da H, et al. Therapeutic benefit of intrathecal injection of marrow stromal cells on ischemia-injured spinal cord. *Ann Thorac Surg* 2007; 83:1484-90.
23. Sumi M, Sata M, Toya N, Yanaga K, Ohki T, Nagai R. Transplantation of adipose stromal cells, but not mature adipocytes, augments ischemia-induced angiogenesis. *Life Sci* 2007; 16; 80:559-65.
24. Yang ZJ, Ma DC, Wang W, Xu SL, Zhang YQ, Chen B, et al. Neovascularization and cardiomyocytes regeneration in acute myocardial infarction after bone marrow stromal cell transplantation: comparison of infarct-relative and noninfarct-relative arterial approaches in swine. *Clin Chim Acta* 2007; 381:114-8.
25. Zhou B, Han ZC, Poon MC, Pu W. Mesenchymal stem/stromal cells (MSC) transfected with stromal derived factor 1(SDF-1) for therapeutic neovascularization: enhancement of cell recruitment and entrapment. *Med Hypotheses* 2007; 68:1268-71.

#### Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.