

AVANÇOS NO USO DE CÉLULAS-TRONCO EM ORTOPEDIA

ADVANCES IN THE USE OF STEM CELLS IN ORTHOPEDICS

Alexandre Fogaça Cristante¹, Douglas Kenji Narazaki¹

RESUMO

As células primordiais, ou células-tronco, são células indiferenciadas multipotentes com a capacidade de originar qualquer tipo de tecido no organismo. Podem ter origem no blastocisto, sendo classificadas como embrionárias, ou em tecidos desenvolvidos de fetos, recém-nascidos ou adultos, conhecidas como células-tronco somáticas. Como um dos principais locais de isolamento da célula primordial está a medula óssea, tendo duas linhagens: células progenitoras hematopoéticas e mesenquimais. Existem diversos usos dessas células indiferenciadas na ortopedia, desde lesões cartilaginosas em patologias como osteoartrose, osteocondrite dissecante, condromalácia patelar, lesões ósseas como em pseudoartroses ou em perdas ósseas, ou em lesões nervosas como em trauma raquimedular. O estudo das células-tronco é provavelmente o campo de estudo mais promissor de toda a medicina que, em um espaço curto de tempo, irá revolucionar todas as especialidades médicas, tanto clínicas quanto cirúrgicas, solucionando patologias hoje de difícil abordagem.

Descritores – Ortopedia/tendências; Células-tronco; Cartilagem; Pseudoartrose

ABSTRACT

Primordial cells or stem cells are multipotent undifferentiated cells with the capacity to originate any type of cell in the organism. They may have their origins in the blastocyst and thus are classified as embryonic, or tissues developed in fetuses, newborns or adults and thus are known as somatic stem cells. Bone marrow is one of the main locations for isolating primordial cells, and there are two lineages: hematopoietic and mesenchymal progenitor cells. There are several uses for these undifferentiated cells in orthopedics, going from cartilaginous lesions in osteoarthritis, osteochondritis dissecans and patellar chondromalacia, to bone lesions like in pseudarthrosis or bone losses, or nerve lesions like in spinal cord trauma. Studying stem cells is probably the most promising field of study of all within medicine, and this is shortly going to revolutionize all medical specialties (both clinical and surgical) and thus provide solutions for diseases that today are difficult to deal with.

Keywords – Orthopedics/trends; Stem Cells; Cartilage; Pseudarthrosis

INTRODUÇÃO

Células primordiais, ou células-tronco, são células indiferenciadas multipotentes, com capacidade de proliferar e originar células de qualquer linhagem, formando qualquer tecido do organismo.

As células-tronco podem ser classificadas em células-tronco embrionárias, que são achadas na massa celular interna do blastocisto (embrião), ou em células-tronco somáticas ou adultas, que são achadas em

tecidos desenvolvidos do feto, recém-nascido ou no adulto. Estas podem ser obtidas através de medula óssea, sangue periférico, cordão umbilical, fígado fetal, tecido neural ou outros diversos tecidos mesenquimais do adulto, tais como sinóvia, periósteo, tecido muscular ou tecido adiposo.

Na medula óssea existem pelo menos duas populações de células-tronco progenitoras: as células progenitoras hematopoéticas e as células progenitoras mesenquimais⁽¹⁾.

1 – Médico Assistente do Grupo de Coluna do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HC/FMUSP – São Paulo, Brasil.

Trabalho realizado no LIM 41 – Laboratório de Investigação Médica do Sistema Musculoesquelético do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Correspondência: Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 333 – Cerqueira Cesar – 054403-010 – São Paulo, SP, Brasil. E-mail: aacristante@uol.com.br

Trabalho recebido para publicação: 08/06/2011, aceito para publicação: 28/06/2011.

Os autores declaram inexistência de conflito de interesses na realização deste trabalho / The authors declare that there was no conflict of interest in conducting this work

Este artigo está disponível online nas versões Português e Inglês nos sites: www.rbo.org.br e www.scielo.br/rbort
This article is available online in Portuguese and English at the websites: www.rbo.org.br and www.scielo.br/rbort

As células progenitoras hematopoéticas expressam uma glicoproteína de membrana que permite sua identificação e quantificação, o antígeno CD34. Outras células que também a expressam são: célula endotelial, fibroblasto embrionário e algumas células do tecido nervoso fetal e adulto. Já as células progenitoras mesenquimais não apresentam nenhum marcador de superfície celular conhecido, podendo ser encontradas também em diversos órgãos sólidos e sendo identificadas somente pela cultura celular.

Essas duas populações de células estão presentes na medula óssea e em condições normais; apenas 0,1% delas circulam no sangue periférico. Este número pode ser aumentado em aproximadamente 30-50 vezes após a administração de fatores estimuladores de colônias hematopoéticas, especialmente o G-CSF (*Granulocyte – Colony Stimulating Factor*).

OBJETIVOS

Proporcionar um melhor entendimento da natureza da célula-tronco e da sua importância na medicina como um todo e, principalmente, na ortopedia, fazendo uma abordagem desde o histórico até às atuais pesquisas.

Com os avanços na medicina, hoje somos capazes de extrair, cultivar e reinfundir essas células progenitoras com finalidade terapêutica, formando diversos tecidos desde ósseo, hepático, neural ou adiposo⁽²⁾.

Na ortopedia e traumatologia podemos usar essas células para formar novos tecidos como o tecido nervoso, ósseo, cartilaginoso e tecido conjuntivo denso (ligamentos e tendões) (Figura 1).

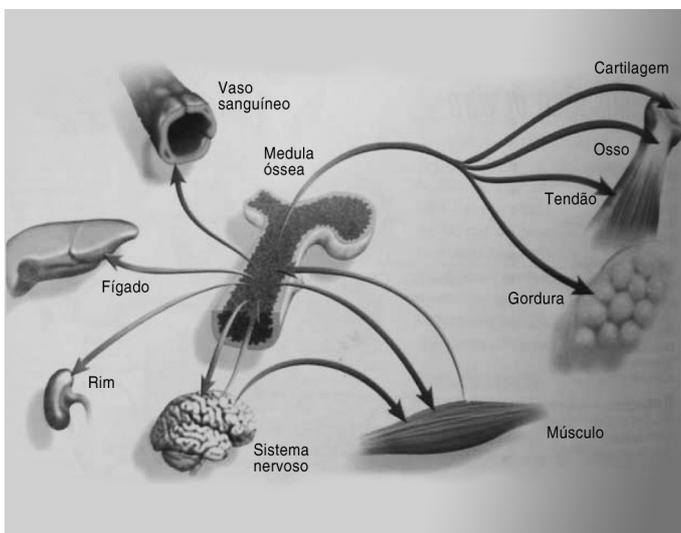


Figura 1 – Possibilidades do uso de células multipotentes para formar vários tecidos.

TECIDO NERVOSO

A utilização das células totipotentes para formação de tecido nervoso tem importância nas doenças degenerativas como o Parkinson e na lesão medular. Neste capítulo abordaremos esta última (Figura 2).



Figura 2 – Ressonância magnética de coluna lombar, ponderada em T1, evidenciando compressão medular resultante de fragmento de corpo vertebral deslocado posteriormente.

O primeiro relato das dificuldades no tratamento de pacientes com lesão medular foi há três mil anos antes de Cristo, quando acreditava-se que a lesão medular não deveria ser tratada. Essa descrição foi feita por Edwin Smith *apud* Barros Filho *et al*⁽³⁾.

Durante a Primeira Guerra Mundial, 80% dos pacientes com trauma raquimedular morriam nas duas primeiras semanas pós-trauma⁽³⁾.

Durante a Segunda Guerra Mundial, o conceito de centros especializados de lesão medular foi desenvolvido na Inglaterra. Nestes centros, com equipes multidisciplinares, foi possível reduzir dramaticamente a mortalidade⁽³⁾.

O traumatismo raquimedular era tido com uma doença sem tratamento. Até 10 anos atrás, tudo o que poderia ser feito era estabilizar a coluna, tratar infecções e espasticidade e prescrever fisioterapia^(4,5). Contudo, o desenvolvimento de pesquisas nesta área indica que as lesões agudas na medula espinal podem ser minimizadas com o uso de drogas, desde que administradas em um curto espaço de tempo após o trauma⁽⁶⁻¹⁰⁾.

No início deste século, foram realizados os primeiros experimentos acerca da fisiopatologia da lesão espinal^(11,12). Contudo, estes trabalhos só foram retomados

na década passada por investigadores que começaram a valorizar as mudanças tempo dependentes na patologia do trauma raquimedular^(13,14).

O imenso déficit neurológico decorrente da lesão da medula espinal advém da somatória de dois eventos distintos: a lesão mecânica inicial e a lesão endógena secundária consequente à primeira⁽¹⁵⁻²⁰⁾. A lesão primária é produzida pelo trauma em si, com morte celular e liberação de eletrólitos, metabólitos e enzimas, sendo, portanto, um processo mecânico que independe de controle celular. A lesão secundária da medula espinal envolve complexas mudanças bioquímicas, surgindo como cascata de eventos, envolvendo edema, inflamação, isquemia, reperfusão, fatores de crescimento, metabolismo do cálcio e peroxidase lipídica em que os esforços científicos se concentram para possibilitar seu controle⁽²⁰⁻³⁰⁾. Farmacologicamente, drogas moduladoras das respostas endógenas à lesão primária estão sendo progressivamente introduzidas a fim de limitar o dano tecidual e melhorar o potencial de recuperação funcional destes pacientes. Estas drogas visam interromper os mecanismos fisiopatológicos de lesão neuronal secundária⁽³¹⁻³⁴⁾ (Figuras 3 e 4).



Figura 3 – Lesão primária.

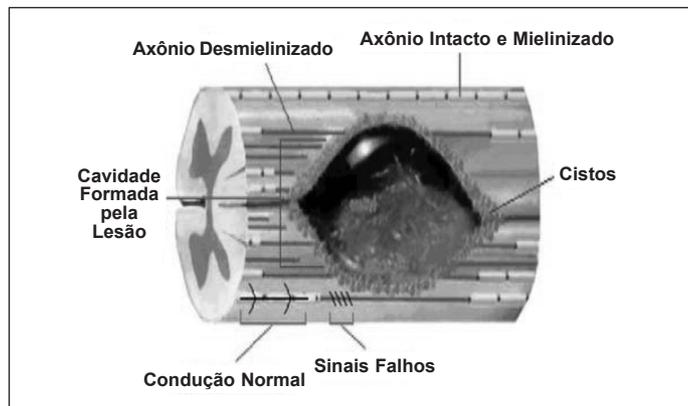


Figura 4 – Resultado após lesão secundária.

Avanços clínicos e científicos indicam que as lesões agudas na medula espinal podem ser manipuladas por terapêuticas farmacológicas utilizadas em um curto espaço de tempo. A metilprednisolona administrada dentro das primeiras oito horas pós-trauma é o primeiro agente farmacológico a demonstrar melhora significativa na recuperação do trauma raquimedular em seres humanos^(4,35-46). Outras drogas, como tirilizade⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾ e o GM-1⁽⁵⁰⁻⁵⁷⁾ apresentam promissores resultados preliminares. Estes avanços podem representar grande melhora na qualidade de vida de pacientes com lesão da medula espinal, desde que sejam adotados pela prática clínica. Após lesões do sistema nervoso central, há um período de déficit seguido de período de variável recuperação funcional. Tal recuperação se deve principalmente às alterações nos circuitos não lesados, mas o processo exato de recuperação ainda não foi completamente esclarecido.

O tratamento ideal para a lesão medular seria aquele que não apenas diminuísse a lesão, mas que também estimulasse o processo de reparação. Ao contrário do conceito de 10 anos atrás, já está provado que neurônios fora do sistema nervoso central, na medula espinal imatura e em meios especiais de cultura podem regenerar⁽⁵⁸⁾.

Atualmente, têm sido desenvolvidas linhas de pesquisas para utilização de neurotransmissores, transplante de células fetais, transplante de células indiferenciadas, implante de eletrodos, emprego de substâncias promotoras de remielinização; mas ainda não apresentam resultados definitivos.

Nesses últimos 10 anos, o uso das células-tronco no tratamento da lesão medular foi descrito em vários estudos experimentais, com efeitos benéficos. O modo como tais células podem vir a atuar na reparação de uma lesão no sistema nervoso ainda permanece controverso, mas certamente envolve fenômenos como a reconstrução funcional de circuitos neuronais com o restabelecimento de sinapses ou interconexões com células hospedeiras; a produção de substâncias neuroquímicas como neurotransmissores, fatores de crescimento e anticorpos; na remielinização de axônios íntegros que deixaram de produzir impulsos elétricos por estarem desmielinizados.

Sendo assim, no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foi realizado um estudo tipo ensaio clínico para avaliar o efeito da infusão de células progenitoras indiferenciadas autógenas no tratamento de pacientes com lesão medular crônica⁽⁵⁹⁾.

Foram selecionados 39 pacientes com pelo menos dois anos de lesão medular traumática com déficit completo. Todos passaram pelo protocolo de consentimento informado e em seguida foram realizados: hemograma, coagulograma, ressonância nuclear magnética da coluna e potencial evocado somato-sensitivo. Os 39 pacientes não apresentavam registro de transmissão de impulsos para o córtex cerebral após estímulo dos membros inferiores.

Para obtermos as células progenitoras do sangue periférico, os pacientes receberam G-CSF. Após cinco dias, todos se submeteram à coleta das células-tronco por técnica de aférese, através de um separador celular de fluxo contínuo. Com isso, conseguimos $2,5 \times 10^6$ células CD34+ por quilo de peso do paciente, que foram criopreservadas. Em seguida, essas células foram cultivadas em meio propício ao desenvolvimento de células de linhagem neuronal.

A infusão dessas células foi feita através de angiografia da artéria, que irriga o sítio de lesão e perfunda a artéria espinal anterior. Como veículo, utilizamos o dimetilsulfóxido (Figura 5).

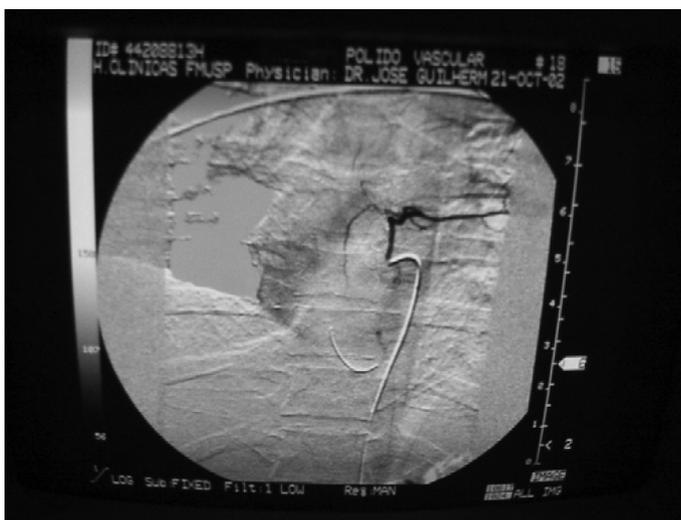


Figura 5 – Angiografia medular do sítio de lesão mostrando a perfusão da espinal anterior.

Os pacientes, então, foram seguidos clinicamente por potencial evocado somato-sensitivo e por urodinâmica.

Como resultado final, em 26 pacientes foi registrada transmissão de impulsos no córtex cerebral ou melhoria no tempo de latência para obtenção de resposta cortical após estímulo dos membros superiores e inferiores. No entanto, a condução sensorial mostrou-se prolongada, com maior latência quando comparada a indivíduos normais (Figuras 6 e 7).

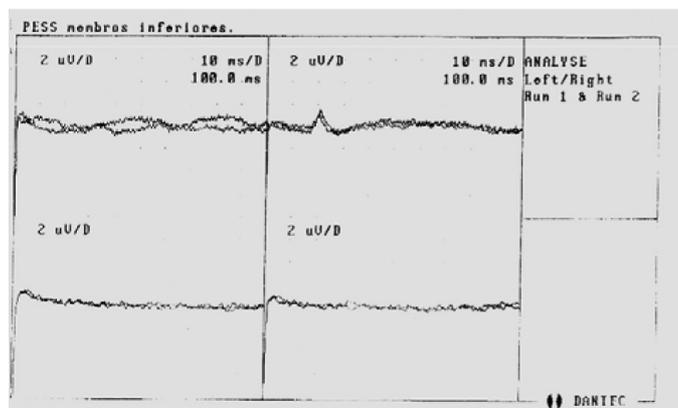


Figura 6 – PESS pré-infusão.

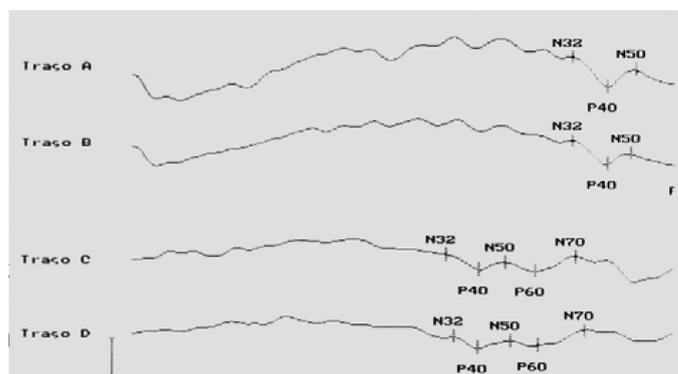


Figura 7 – PESS pós-infusão.

Apesar dessa resposta, clinicamente os pacientes não tiveram ganho motor. Alguns revelam melhora sensitiva inespecífica dos membros inferiores. Foram observados, como complicações com esse método terapêutico, um caso de pneumotórax decorrente da passagem do cateter duplo lúmen para a coleta das células-tronco e três casos de alergia ao contraste realizado na arteriografia⁽⁵⁹⁾.

TECIDO CARTILAGINOSO

As células primordiais têm também sido estudadas para a formação de cartilagem articular. Doenças como lesões condrais traumáticas, osteocondrites dissecantes, condromalácia patelar e osteoartrose são alvos da terapêutica com essas células⁽⁵⁸⁾.

As lesões condrais traumáticas, especificamente de tornozelo e joelho, quando pequenas e em áreas de pouco estresse mecânico, são tratadas, habitualmente, por métodos conservadores que incluem restrição de descarga de peso, analgésicos, anti-inflamatórios e fisioterapia (Figura 8). Quando extensas, podem ser tratadas por perfurações, enxertos autólogos ou homólogos osteocondrais, artroplastia de substituição (próteses parciais e totais) e artrodeses.



Figura 8 – Lesão osteocondral de tálus.

Osteocondrite dissecante do joelho é um distúrbio comum, de causa desconhecida. Supõe-se que seja resultante de isquemia de uma determinada área localizada de osso subcondral, precipitada por infarto, traumatismo ou outras causas. O tratamento das osteocondrites dissecantes, especificamente de joelho, em crianças, é conservador por serem estáveis os fragmentos. Já no adulto, os fragmentos são instáveis; quando pequenas e fora da área de carga, podem ser excisadas. Quando maiores e em áreas de carga, devem ser tratadas com perfurações ou curetagem associadas à fixação do fragmento, através também de enxertos homólogos osteocondrais ou artroplastias (Figuras 9 e 10).

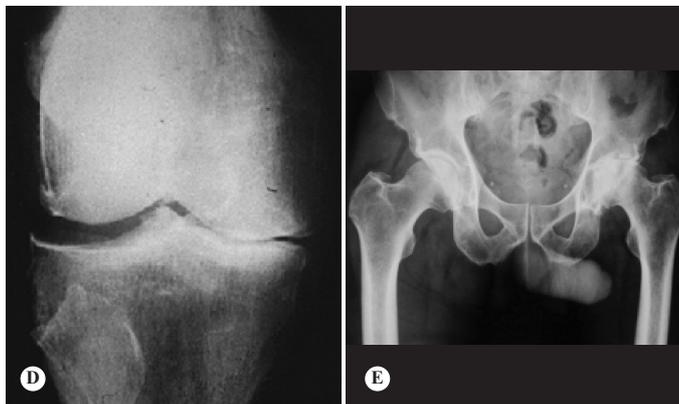


Figuras 9 e 10 – Radiografia AP e P de paciente com osteocondrite dissecante de côndilo femoral medial em área de carga.

Na condromalácia patelar, o tratamento depende do grau da lesão. Se for uma lesão menos extensa e profunda pode-se tratar conservadoramente. Se for profunda, muitas vezes com exposição do osso subcondral, podemos tratar com curetagem, perfurações, enxerto autólogo. Os resultados cirúrgicos são piores do que quando acomete o fêmur ou tíbia.

Na osteoartrose de quadril e joelho, temos como

opções o tratamento conservador e o cirúrgico (Figuras 11 e 12). Como novo arsenal no tratamento conservador, temos os condroprotetores (ácido hialurônico, glucosamina, condroitina) que apresentam resultados satisfatórios em todos estudos com humanos, porém com tempo de seguimento curto. Quando o tratamento conservador falha, podemos indicar osteotomias, artroplastias de substituição, artrodeses. Os enxertos autólogos e heterólogos têm maior índice de insucesso quando comparados com outras doenças cartilaginosas articulares.



Figuras 11 e 12 – Osteoartrose de joelho D e quadril E.

A importância das células-tronco como novo método de tratamento nas lesões condrais deve-se ao fato de a cartilagem articular ter pouca capacidade de reparação. A técnica de transplante de cultura de condrócitos autólogos nos defeitos condrais é restrita a lesões pequenas em jovens. Em contrapartida, estudos recentes provaram que as células progenitoras mesenquimais podem reparar defeitos maiores independente da idade. O maior problema ainda é a cultura, indução de diferenciação e aderência no sítio de lesão⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾.

Além das células-tronco, são necessários fatores de crescimento para determinar a proliferação e diferenciação em tecido cartilaginoso tanto durante as culturas *in vitro* quanto na implantação. Dentre esses fatores, temos a prolactina, que induz a proliferação celular, a síntese de proteoglicanos e interação celular e inibe a formação de fibrilas do colágeno tipo II. Outros fatores que determinam a condrogênese são o fator de crescimento insulina-símile 1 (IGF-1) e o fator de crescimento transformador beta 1 (TGFβ1)^(62,63).

Com essa nova técnica terapêutica podemos diminuir as morbidades da área doadora no caso do mosaicism (retirada de pequenos mosaicos de cartilagem de uma área de menor carga para outra com defeito osteocondral), evitar a passagem de patógenos e deterioração dos

aloenxertos, evitar as revisões por soltura/desgaste de material no caso das próteses articulares⁽⁶⁴⁾.

São necessários estudos de maior impacto em humanos para definir a real finalidade das células-tronco nas doenças cartilaginosas articulares.

TECIDO ÓSSEO

Na traumatologia, uma das grandes complicações é a chamada pseudoartrose. Essa palavra significa "falsa articulação", pois a não união dos fragmentos de uma fratura leva à formação de uma pseudocápsula com sinóvia e líquido sinovial.

A pseudoartrose pode ser dividida em dois principais tipos: hipertróficas ou hipervasculares e atróficas ou avasculares. A primeira tem como principal causa o movimento no foco de fratura, e a última, a falta de condições biológicas locais para a consolidação óssea (Figura 13).



Figura 13 – Pseudoartrose hipertrófica de ossos de perna D e pseudoartrose atrófica de perna E.

Nas pseudoartroses hipertróficas, o tratamento visa a melhora da estabilização da fratura, seja com gesso, órteses, osteossínteses ou fixadores externos. A vantagem dos dois últimos é que podemos, além de estabilizar, comprimir o foco.

É no segundo tipo de pseudoartrose, tipo atrófico, que tem-se aplicabilidade das células-tronco como tratamento (Figuras 13 e 14). Sabemos que a consolidação tem três fases: I) inflamação – na qual existe a infiltração de leucócitos que determinam a quimiotaxia de células mesenquimais e fibroblastos que se diferenciarão em osteoblastos; II) reparação – na qual temos a formação



Figura 14 – Pseudoartrose de diáfise de fêmur tipo avascular.

de um calo mole (tecido conjuntivo frouxo-fibroblastos) e, em seguida, o calo duro (tecido ósseo imaturo); e III) remodelação – na qual se forma o tecido ósseo maduro. Assim, as células progenitoras interfeririam nas duas primeiras fases⁽⁶⁴⁾.

Como variedade de tratamento para as pseudoartroses atróficas, podemos utilizar métodos físicos como o ultrassom e o pulso eletromagnético, que apresentam resultados duvidosos. São necessários melhores estudos (ensaio clínico randomizado e controlado), com um tempo de seguimento maior para conclusões definitivas.

Podemos ainda utilizar enxertos autólogos (íliaco, tibia, rádio distal) ou homólogos (osso de banco de tecidos). A grande vantagem do enxerto autólogo é sua capacidade osteogênica, osteocondutora e osteoindutora. A osteogênese deve-se ao microambiente formado com fatores tróficos que determinam o recrutamento de células mesenquimais e fibroblastos e sua diferenciação em tecido ósseo. A osteoindução refere-se a proteínas específicas que determinam o crescimento ósseo local. A osteocondução refere-se ao substrato, arcabouço, onde pode-se formar osso. Já o enxerto de banco e os substitutos ósseos como a hidroxiapatita têm somente capacidade osteocondutora.

A proteína morfogenética óssea (BMP) é outra forma de tratamento das pseudoartroses atróficas, com capacidade osteoindutora.

Uma técnica simples de infiltrar localmente células totipotentes é o uso do aspirado de medula óssea do íliaco. No entanto, sua baixa celularidade torna o método questionável. Talvez sua ação deve-se à presença de BMP mais do que de células totipotentes⁽⁶⁵⁾.

Para o sucesso da terapia com células-tronco é necessária uma alta celularidade na coleta, cultivo adequado para formação de células da linhagem óssea e fatores tróficos⁽⁶³⁾.

O uso de células-tronco para a formação de tecido ósseo determina uma diminuição da morbidade na área doadora de enxerto ósseo e evita transmissão de doenças através de enxertos homólogos^(64,65).

Existem poucos estudos de células-tronco para formação de osso. Um estudo experimental em ratos relata a ação benéfica em utilizar as células-tronco em focos de osteotomias sob tratamento com distração por fixadores externos, determinando uma melhora da vascularização local e consolidação mais rápida em uma a duas semanas⁽⁶⁶⁾.

TECIDO CONJUNTIVO DENSO

Os ligamentos e tendões são formados por tecido conjuntivo propriamente dito, tipo denso. Para sua gênese, são necessárias forças de tração. São constituídos de fibroblastos e fibras de colágeno do tipo I e III principalmente.

O ligamento cruzado anterior (LCA) e ligamento colateral medial (LCM) do joelho são as estruturas mais lesadas na prática esportiva, alcançando 90% dos ligamentos lesados. O LCM é tratado conservadoramente, porém o LCA é tratado preferencialmente por cirurgia reconstrutiva artroscópica. Hoje temos, como opções de enxerto autólogo para o LCA, principalmente o tendão patelar, semitendíneo, grácil e tendão quadriciptal. Como alternativa, temos o enxerto homólogo de tendão de Aquiles. A maior crítica a essas cirurgias seria a morbidade da área doadora. Nesse caso, as células-tronco evitariam esse inconveniente⁽⁶⁴⁾.

Existem estudos comprovando diferentes graus de regeneração de tecidos intra-articulares em joelhos acometidos, desde lesões de ligamento cruzado anterior, lesões meniscais ou lesões condrais após injeções intra-articulares de células-tronco, proporcionando uma nova opção terapêutica para essas lesões articulares⁽⁶⁷⁾ (Figura 15).

O tendão de Aquiles é um dos mais lesados. Seu tratamento pode ser conservador ou cirúrgico. A vantagem do tratamento conservador é evitar complicações cirúrgicas, como necrose de pele, infecção e lesão neurovascular. A desvantagem é sua menor resistência e, portanto, maior risco de rerruptura. O inverso vale para o tratamento cirúrgico. Como opções cirúrgicas, temos

a reparação aberta com sutura tipo Krakow, reparação percutânea com sutura em “x” e os diversos tipos de reforços tendíneos (flexor longo do hálux, plantar delgado, fibular curto, aponeurose do tríceps sural). As células-tronco têm-se tornado uma nova técnica que, futuramente, pode ser aplicada nos casos de falhas tendíneas sem aumentar o tempo cirúrgico e perda da função dos tendões transferidos (Figura 16).



Figura 15 – Lesão de menisco medial.



Figura 16 – Foto intraoperatória após ressecção de tendão patológico roto com reforço com tendão flexor longo do hálux.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A literatura apresenta-se em diversos trabalhos sobre esse tema, tanto em forma de trabalhos experimentais, quanto em forma de ensaios clínicos, mostrando-se um dos campos mais promissores da medicina que irá proporcionar a resolução de patologias até hoje sem solução.

REFERÊNCIAS

- Forsberg EC, Bhattacharya D, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: expression profiling and beyond. *Stem Cell Rev.* 2006;2(1):23-30.
- Li Y, Chi XC, Li XX, Xu JC. Multipotency of human neural stem cells from fetal striatum. *Neuroreport.* 2008;19(17):1679-83.
- de Barros Filho TE, de Oliveira RP, Tsanaclis AM, de Barros EM, Cristante AF, Palma RM, et al. An experimental model for the transplantation of fetal central nervous system cells to the injured spinal cord in rats. *Ver Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 2002;57(6):257-64.
- Braughler JM, Hall ED. Current application of "high-dose" steroid therapy for CNS injury. A pharmacological perspective. *J Neurosurg.* 1985;62(6):806-10.
- Breasted JH. *The Edwin Smith surgical papyrus.* Chicago: University of Chicago Press; 1930.
- Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS. Modeling of acute spinal cord injury in the rat: neuroprotection and enhanced recovery with methylprednisolone, U-74006F and YM-14673. *Exp Neurol.* 1994;126(1):61-75.
- Ducker TB, Hamit HF. Experimental treatments of acute spinal cord injury. *J Neurosurg.* 1969;30(6):693-7.
- Faden AI, Salzman S. Pharmacological strategies in CNS trauma. *Trends Pharmacol Sci.* 1992;13(1):29-35.
- Tator CH, Rowed DW. Current concepts in the immediate management of acute spinal cord injuries. *Can Med Assoc J.* 1979;121(11):1453-64.
- Young W, DeCrescito V, Flamm ES, Blight AR, Gruner JA. Pharmacological therapy of acute spinal cord injury: studies of high dose methylprednisolone and naloxone. *Clin Neurosurg.* 1988;34:675-97.
- Allen AR. Remarks on histopathological changes in spinal cord due to impact: an experimental study. *J Nerv Ment Dis.* 1914;41:141-7.
- Allen AR. Surgery of experimental lesions of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation. Preliminary report. *J Am Med Assoc.* 1911;57:878-80.
- Anderson DK, Means ED, Waters TR, Spears CJ. Spinal cord energy metabolism following compression trauma to the feline spinal cord. *J Neurosurg.* 1980;53(3):375-80.
- Balentine JD. Hypotheses in spinal cord trauma research. In: Becker DP, Povlishock J T, editors. *Central nervous system trauma status report.* Bethesda: NIH; 1985. p. 455-61.
- Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma. II. Ultrastructure of axons and myelin. *Lab Invest.* 1978;39(3):254-66.
- Demopoulos HB, Flamm ES, Pietronigro DD, Seligman ML. The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1980;492:91-119.
- Dohrmann GJ, Wagner FC, Bucy PC. The microvasculature in transitory traumatic paraplegia. An electron microscopic study in the monkey. *J Neurosurg.* 1971;35:263-71.
- Goodkin R, Campbell JB. Sequential pathological changes in spinal cord injury: a preliminary report. *Surg Forum.* 1996;20:430-2.
- Spiller WG. A microscopic study of the spinal cord in two cases of Pott's disease. *Bulletin of the Johns Hopkins Hosp.* 1898;9:125-33.
- Noble LJ, Wrathall JR. Distribution and time course of protein extravasation in the rat spinal cord after contusive injury. *Brain Res.* 1989;482(1):57-66.
- Wagner FC Jr, VanGilder JC, Dohrmann GJ. Pathological changes from acute to chronic in experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg.* 1978;48(1):92-8.
- Seshi B, Kumar S, Sellers D. Human bone marrow stromal cell: coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. *Blood Cells Mol Dis.* 2000;26(3):234-46.
- Ducker TB, Salzman M, Perot PL Jr, Ballantine D. Experimental spinal cord trauma. I: Correlation of blood flow, tissue oxygen and neurologic status in the dog. *Surg Neurol.* 1978;10(1):60-3.
- Dusart I, Schwab ME. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci.* 1994;6(5):712-24.
- Green BA, Wagner FC Jr. Evolution of edema in the acutely injured spinal cord: a fluorescence microscopic study. *Surg Neurol.* 1973;1(2):98-101.
- Herrick MK, Mills PE Jr. Infarction of spinal cord. Two cases of selective gray matter involvement secondary to asymptomatic aortic disease. *Arch Neurol.* 1971;24(3):228-41.
- Holtz A, Nyström B, Gerdin B. Spinal cord blood flow measured by ¹⁴C-iodoantipyrine autoradiography during and after graded spinal cord compression in rats. *Surg Neurol.* 1989;31(5):350-60.
- Janssen L, Hansebout RR. Pathogenesis of spinal cord injury and newer treatments. A review. *Spine (Phila Pa 1976).* 1989;14(1):23-32.
- Rivlin AS, Tator CH. Regional spinal cord blood flow in rats after severe cord trauma. *J Neurosurg.* 1978;49(6):844-53.
- Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg.* 1991;75(1):15-26.
- Faden AI, Ellison JA, Noble LJ. Effects of competitive and non-competitive NMDA receptor antagonists in spinal cord injury. *Eur J Pharmacol.* 1990;175(2):165-74.
- Faden AI, Jacobs TP, Mougey E, Holaday JW. Endorphins in experimental spinal injury: therapeutic effect of naloxone. *Ann Neurol.* 1981;10(4):326-32.
- Luer MS, Rhoney DH, Hughes M, Hatton J. New pharmacologic strategies for acute neuronal injury. *Pharmacotherapy.* 1996;16(5):830-48.
- Young W, Flamm ES, Demopoulos HB, Tomasula JJ, DeCrescito V. Effect of naloxone on posttraumatic ischemia in experimental spinal contusion. *J Neurosurg.* 1981;55(2):209-19.
- Anderson DK, Means ED, Waters TR, Green ES. Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. *J Neurosurg.* 1982;56(1):106-13.
- Bracken MB. Pharmacological treatment of acute spinal cord injury: current status and future projects. *J Emerg Med.* 1993;11(Suppl 1):43-8.
- Braughler JM, Hall ED. Pharmacokinetics of methylprednisolone in cat plasma and spinal cord following a single intravenous dose of the sodium succinate ester. *Drug Metab Dispos.* 1982;10(5):551-2.
- Braughler JM, Hall ED. Lactate and pyruvate metabolism in injured cat spinal cord before and after a single large intravenous dose of methylprednisolone. *J Neurosurg.* 1983;59(2):256-61.
- De Ley G, Leybaert L. Effect of flunarizine and methylprednisolone on functional recovery after experimental spinal injury. *J Neurotrauma.* 1993;10(1):25-35.
- Hall ED, Braughler JM. Acute effects of intravenous glucocorticoid pretreatment on the in vitro peroxidation of cat spinal cord tissue. *Exp Neurol.* 1981;73(1):321-4.
- Hall ED. The effects of glucocorticoid and nonglucocorticoid steroids on acute neuronal degeneration. In: Sell FJ, editor. *Advances in neurology.* New York: Raven; 1993. p. 241-8.
- Hall ED, Braughler JM. Effects of intravenous methylprednisolone on spinal cord lipid peroxidation and Na⁺ + K⁺-ATPase activity. Dose-response analysis during 1st hour after contusion injury in the cat. *J Neurosurg.* 1982;57(2):247-53.
- Hall ED, Wolf DL, Braughler JM. Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental posttraumatic spinal cord ischemia. Dose-response and time-action analysis. *J Neurosurg.* 1984;61(1):124-30.
- Hall ED, McCall JM, Chase RL, Yonkers PA, Braughler JM. A nonglucocorticoid steroid analog of methylprednisolone duplicates its high-dose pharmacology in models of central nervous system trauma and neuronal membrane damage. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987;242(1):137-42.
- Hall ED, Yonkers PA, Andrus PK, Cox JW, Anderson DK. Biochemistry and pharmacology of lipid antioxidants in acute brain and spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 1992;9(Suppl 2):S425-42.
- Means ED, Anderson DK, Waters TR, Kalaf L. Effect of methylprednisolone in compression trauma to the feline spinal cord. *J Neurosurg.* 1981;55(2):200-8.
- Richardson HD, Nakamura S. An electron microscopic study of spinal cord edema and the effect of treatment with steroids, mannitol, and hypothermia. *Proc Veterans Adm Spinal Cord Inj Conf.* 1971;18:10-6.
- Anderson DK, Braughler JM, Hall ED, Waters TR, McCall JM, Means ED. Effects of treatment with U-74006F on neurological outcome following experimental spinal cord injury. *J Neurosurg.* 1988;69(4):562-7.
- Hall ED. Effects of the 21-aminosteroid U74006F on posttraumatic spinal cord ischemia in cats. *J Neurosurg.* 1988;68(3):462-5.
- Cuello AC, Garofalo L, Kenigsberg RL, Maysinger D. Gangliosides potentiate in vivo and in vitro effects of nerve growth factor on central cholinergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(6):2056-60.
- Geisler FH, Dorsey FC, Coleman WP. Recovery of motor function after spinal-cord injury--a randomized, placebo-controlled trial with GM-1 ganglioside. *N Engl J Med.* 1991; 324(26):1829-38.
- Geisler FH, Dorsey FC, Coleman WP. Past and current clinical studies with GM-1

- ganglioside in acute spinal cord injury. *Ann Emerg Med.* 1993;22(6):1041-7.
53. Gorio A. Gangliosides as a possible treatment affecting neuronal repair processes. In: Waxman SG, editor. *Advances in neurology: functional recovery in neurological disease.* New York: Raven; 1988. p. 523-30.
54. Karpiak SE, Wakade CG, Tagliavia A, Mahadik SP. Temporal changes in edema, Na⁺, K⁺, and Ca⁺⁺ in focal cortical stroke: GM1 ganglioside reduces ischemic injury. *J Neurosci Res.* 1991;30(3):512-20.
55. Mahadik SP, Hawver DB, Hungund BL, Li YS, Karpiak SE. GM1 ganglioside treatment after global ischemia protects changes in membrane fatty acids and properties of Na⁺, K⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase. *J Neurosci Res.* 1989;24(3):402-12.
56. Walker JB, Harris M. GM-1 ganglioside administration combined with physical therapy restores ambulation in humans with chronic spinal cord injury. *Neurosci Lett.* 1993;161(2):174-8.
57. Young W. Recovery mechanisms in spinal cord injury: implications for regenerative therapy. In: Seil AJ. *Neural regeneration and transplantation.* New York: Alan Liss; 1995. p. 157-9.
58. Nagase T, Muneta T, Ju YJ, Hara K, Morito T, Koga H, et al. Analysis of the chondrogenic potential of human synovial stem cells according to harvest site and culture parameters in knees with medial compartment osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(5):1389-98.
59. Cristante AF, Barros-Filho TE, Tatsui N, Mendrone A, Caldas JG, Camargo A, et al. **Stem cells in the treatment of chronic spinal cord injury: evaluation of somatosensitive evoked potentials in 39 patients.** *Spinal Cord.* 2009;47(10):733-8.
60. Corvol MT. [Cell therapy and its clinical applications. Cartilage cell therapy, present and future]. *J Soc Biol.* 2001;195(1):79-82.
61. Barry FP. Mesenchymal stem cell therapy in joint disease. *Novartis Found Symp.* 2003.
62. Ogueta S, Muñoz J, Obregon E, Delgado-Baeza E, García-Ruiz JP. Prolactin is a component of the human synovial liquid and modulates the growth and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;190(1-2):51-63.
63. Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, Fitzsimmons JS, Reinholz GG, Conover CA, et al. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage.* 2003;11(1):55-64.
64. Rahaman MN, Mao JJ. Stem cell-based composite tissue constructs for regenerative medicine. *Biotechnol Bioeng.* 2005;91(3):261-84.
65. Hernigou P, Beaujean F. [Bone marrow in patients with pseudarthrosis. A study of progenitor cells by in vitro cloning]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot.* 1997;83(1):33-40.
66. Cetrulo CL Jr, Knox KR, Brown DJ, Ashinoff RL, Dobryansky M, Ceradini DJ, et al. Stem cells and distraction osteogenesis: endothelial progenitor cells home to the ischemic generate in activation and consolidation. *Plast Reconstr Surg.* 2005;116(4):1053-64.
67. Agung M, Ochi M, Yanada S, Adachi N, Izuta Y, Yamasaki T, et al. Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2006;14(12):1307-14.