

Administración intravenosa de células madre adultas para el tratamiento de la paraplejía traumática experimental

Intravenous administration of adult stem cells for the treatment of experimental traumatic paraplegia

Vaquero J., Zurita M., Oya S., De Haro J., Aguayo C.

Unidad de Investigación Neurociencias de la FUNDACION MAPFRE
Hospital Universitario Puerta de Hierro. Madrid

RESUMEN

Introducción: Estudios recientes sugieren un efecto terapéutico de la administración local de células madre mesenquimales, obtenidas del estroma de la médula ósea, en lesiones traumáticas de la médula espinal. Por otra parte, se ha descrito que estas células consiguen recuperación funcional de animales sometidos a lesiones traumáticas cerebrales, cuando son administradas por vía intravenosa después del traumatismo. En el presente estudio, hemos comparado el efecto de la administración local y sistémica de estas células madre adultas, en un modelo de paraplejía crónica de origen traumático.

Material y métodos: Ratas Wistar adultas, con una paraplejía crónica de origen traumático recibieron a los tres meses de la lesión, una inyección intravenosa de 3×10^6 , 5×10^6 , o 10×10^6 células madre, estudiándose su recuperación funcional en el curso de los seis meses siguientes, por medio de la escala de valoración motora de Basso-Beattie-Bresnehan (BBB) y la escala de sensibilidad del «cold spray test». La recuperación funcional fue comparada con la obtenida en un estudio previo, en el cual y con el mismo modelo experimental, los animales recibieron 3×10^6 células madre adultas en la cavidad traumática centromedular.

Resultados: Nuestros resultados muestran que la administración intravenosa de células madre adultas mesenquimales, en este modelo experimental, consigue un cierto grado de recuperación motora y funcional, que no es progresiva, en el curso de los seis meses que siguen al tratamiento. Esta recuperación no parece ser dosis-dependiente y es mucho menor que la que se puede obtener por medio de la administración intralesional de células madre.

Conclusiones: Estos datos apoyan la conveniencia de la administración local de células madre adultas en protocolos de terapia celular diseñados para el tratamiento de lesiones traumáticas medulares crónicamente establecidas.

Palabras clave:

Células del estroma de la médula ósea, células madre, lesión traumática medular, paraplejía.

ABSTRACT

Introduction: Recent studies showed functional recovery in experimental chronic paraplegia after local administration of adult stem cells, obtained from the stroma of the bone marrow. On the other hand, has been described that systemic administration of these cells promotes functional recovery of rats suffering severe brain trauma. In the present study we have compared the effects of the local and systemic administration of bone marrow stromal cells, in an experimental model of established traumatic paraplegia.

Methods: Adult Wistar rats suffering chronic paraplegia of traumatic origin received, three months after trauma, an intravenous injection of 3×10^6 , 5×10^6 , or 10×10^6 stem cells, and outcome was evaluated until sacrifice of the animals, six months later, using the Basso-Beattie-Bresnehan (BBB) score and the cold spray test.

Results: Our results showed that intravenous administration of BMSC achieves some degree of functional recovery, but it is not progressive neither dose-dependent.

Conclusions: Keeping in mind that administration of stem cells into posttraumatic spinal cord cavity promotes a clear and progressive functional recovery, our present findings support the convenience of intralesional administration of adult stem cells in protocols of cell therapy designed for the treatment of chronic paraplegia.

Key words:

Bone marrow stromal cells, stem cells, spinal cord injury, paraplegia.

MAPFRE MEDICINA, 2007; 18 (1): 69-75

Correspondencia:

Jesús Vaquero. Servicio de Neurocirugía. Hospital Puerta de Hierro. San Martín de Porres 4. 28035-Madrid. jvaquero@telefonica.net

Beca de Investigación de la FUNDACION MAPFRE, 2005.

Vaquero J., Zurita M.,
Oya S., et al

Administración intravenosa de células madre
adultas para el tratamiento de
la paraplejía traumática experimental

INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha cobrado interés la posibilidad de utilizar células madre adultas para la recuperación de lesiones neurológicas. En esta línea de investigación, se han publicado diversos estudios experimentales que muestran cómo células madre adultas, de origen mesenquimal y obtenidas del estroma de la médula ósea, pueden reducir déficits funcionales cuando se trasplantan al cerebro de animales que previamente han sufrido un infarto cerebral (1). Igualmente, se ha publicado un efecto beneficioso de estas células madre adultas, tras su trasplante intracerebral en animales que fueron previamente sometidos a un traumatismo craneoencefálico severo (2-4). En el caso de la paraplejía traumática, también existen estudios experimentales que muestran cómo la administración intralesional de células madre adultas del estroma de la médula ósea pueden mejorar lesiones medulares incompletas (5,6) o incluso lesiones medulares completas, cuando se administran intralesionalmente tras varios meses de evolución y en animales con una paraplejía ya crónicamente establecida (7,8).

Por otra parte, se han publicado observaciones a favor de que la administración por vía intravenosa de células madre adultas, obtenidas del estroma de la médula ósea, puede ser igualmente útil para lograr recuperación neurológica en animales con lesiones traumáticas cerebrales (9,10). Teniendo en cuenta estos hallazgos, en el presente estudio experimental nos hemos planteado verificar la posible eficacia de la administración sistémica, por vía intravenosa, de células madre adultas mesenquimales en un modelo experimental de paraplejía traumática crónica y comparar los posibles parámetros de recuperación neurológica con los obtenidos tras la administración directa, intralesional, de estas células.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las células madre adultas

Las células madre utilizadas para este estudio fueron células mesenquimales del estroma de la médula ósea, obtenidas de ratas Wistar adultas (doce semanas de edad, con un peso entre 250-

300g). Tras sacrificar a los animales se obtuvieron las tibias y los fémures, y tras cortar sus epífisis se vaciaron, empujando la médula ósea con medio alfa-MEM, con ayuda de una jeringuilla de 1 ml y una aguja del número 21. La médula ósea así obtenida se disoció mecánicamente hasta alcanzar una suspensión homogénea que fue filtrada a través de una malla de nylon, de 70 micras y cultivada en medio alfa-MEM con suero fetal bovino (FBS), L-glutamina, penicilina, estreptomocina y anfotericina B. Tras una incubación durante tres días, a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5 %, las células no adherentes fueron eliminadas. Las células restantes constituyen las células madre estromales (positivas a CD105, CD73 y vimentina, y negativas a CD34, CD45, CD3, CD14, CD19, CD38, glicoforina-A y HLA). Tras alcanzar confluencia, estas células fueron incubadas durante 30 minutos, a 37 °C, con bisbenzimidida (10 µg/ml) al objeto de poder identificar posteriormente sus núcleos por medio de fluorescencia (11) y el cultivo tratado con tripsina (0.25%) y EDTA (1mM) durante 5 minutos, a 37°C. Las células madre así obtenidas fueron inyectadas por vía intravenosa, de acuerdo con los protocolos experimentales diseñados para el presente estudio.

Modelo de lesión traumática medular

Para producir la lesión traumática medular, 30 ratas Wistar adultas, hembras, fueron premedicadas con morfina subcutánea (2.5 mg/kg) y meloxicam (2 mg/kg). Posteriormente, las ratas se anestesiaron con sevoflurano y fueron sometidas a una laminectomía a nivel T6-T8. Tras exponer la duramadre se hizo una lesión traumática, dejando caer sobre la superficie medular expuesta una barra de acero de 25g de peso y 12 mm² de sección, desde una altura de 20 cm, guiada a través de un cilindro hueco, colocado verticalmente. Con este modelo experimental se produce una lesión traumática severa y una paraplejía inmediata. A los pocos días de la lesión, se aprecia una cavidad necrótica centromedular que se extiende entre uno y dos segmentos medulares (7,12-14).

Grupos experimentales

Todos los animales mostraron una paraplejía inmediata tras la lesión, que se mantuvo sin signos

Vaquero J., Zurita M.,
Oya S., et al

Administración intravenosa de células madre
adultas para el tratamiento de
la paraplejía traumática experimental

de recuperación en las semanas siguientes. A los 3 meses se consideró que existía una situación de paraplejía crónica, distribuyéndose en este momento los animales al azar en 3 grupos experimentales de 10 animales cada uno de ellos. Cada animal del grupo A (n:10) recibió una inyección intravenosa de 3×10^6 células madre adultas del estroma de la médula ósea, a través de la vena dorsal del rabo, en suero fisiológico, con un volumen total de 1 ml. La inyección fue hecha bajo anestesia general con sevoflurano, por medio de un catéter de polietileno del nº 24. Cada animal del grupo B (n:10) recibió, con las mismas pautas de administración, un total de 5×10^6 células madre adultas, y los animales del grupo C (n:10) un total de 10×10^6 células madre adultas.

Cuidados postoperatorios y seguimiento de los animales

Todas las ratas fueron sometidas a estrictos cuidados postoperatorios desde el mismo momento en que se produjo la lesión traumática hasta el momento de ser sacrificadas, 6 meses después del momento en que recibieron una inyección intravenosa de células madre adultas y 9 meses después de la lesión medular traumática. Entre estos cuidados cabe destacar vaciamiento vesical por compresión manual cada 8-12 horas, administración de buprenorfina para evitar dolor (0,1 mg/kg, subcutáneo durante los 2 primeros días) administración de Ringer-lactato para prevenir deshidratación (2 ml, IP, tras la cirugía) y administración de antibióticos (gentamicina, 0,8 mg/100g/día durante la primera semana). Desde el mismo momento de la cirugía, todos los animales fueron sometidos a rehabilitación diaria, consistente en movilización pasiva de las patas posteriores durante un mínimo de 15 minutos.

Los animales fueron sacrificados por sobredosificación anestésica a los 6 meses de la administración intravenosa de las células madre adultas y hasta ese momento fueron valoradas semanalmente respecto de su posible recuperación motora utilizando la escala de Basso-Beatie-Bresnahan (BBB) (15) y respecto de posible recuperación de sensibilidad, utilizando el «cold spray test» (16). A efectos de comparación y de discusión de los resultados obtenidos en el presente estudio, se re-

visaron los datos de recuperación funcional en animales previamente parapléjicos tras ser sometidos al mismo modelo experimental y posteriormente sometidos a otros procedimientos de terapia celular (administración intralesional de células madre adultas). En todo momento, los animales utilizados para el presente estudio fueron cuidados de acuerdo a las normas establecidas por la legislación vigente para el manejo de animales de laboratorio.

Se hizo un análisis comparativo de los parámetros de recuperación funcional de los animales de cada uno de estos grupos experimentales, utilizando para ello la aplicación estadística Sigma (v 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA) utilizando el test Kruskal-Wallis para valorar diferencias entre los tres grupos experimentales y el test de Mann-Whitney para comparar grupos entre sí, considerándose un valor de $p < 0,05$ como valor de significación estadística.

Estudios morfológicos

Tras el sacrificio de los animales, la médula espinal fue extraída en bloque, mantenida durante 24 horas en solución de sacarosa al 4% y congelada en isopentano. Un segmento de unos 2 cm de longitud, centrado en la zona de impacto traumático, fue transferido a un medio OCT (TAAB Lab. Aldermaston Berks, UK) y cortado en un criostato, realizándose cortes de $5\mu\text{m}$ que fueron montados y procesados para estudio histológico con la técnica de hematoxilina-eosina. Para los estudios inmunohistoquímicos, cortes adyacentes a los empleados para la tinción con hematoxilina-eosina fueron tratados en búfer citrato (pH 6) en un horno de microondas (650-720 w). Tras lavar los cortes en PBS, éstos fueron tratados con H_2O_2 (3%) durante 30 minutos, para eliminar la peroxidasa endógena. El anticuerpo primario utilizado en este estudio fue el anticuerpo contra Proteína de Neurofilamentos de 200-kDa (NFP) (1:500; Serotec Ltd, Kidlington UK). Los cortes fueron incubados con anticuerpos secundarios conjugados con biotina (1:200, Vector Inc., USA) o con Texas Red (1:200; Jackson ImmunoResearch Inc, West Grove, Penn, USA). Posteriormente, los cortes incubados con anticuerpo secundario conjugado con biotina fueron lavados en PBS e incubados con el

complejo avidina-biotina-peroxidasa, usando, por último, 3',3'-diaminobencidina (DAB) como cromógeno. Los cortes fueron estudiados por medio de microscopía de luz y por medio del microscopio de fluorescencia.

RESULTADOS

Tras la lesión traumática medular, todos los animales del presente estudio mostraron una paraplejia completa, que no se había modificado en el momento de proceder a la administración intravenosa de células madre adultas mesenquimales. Tras la administración de las células madre, la valoración funcional de acuerdo a la escala de BBB no mostró ningún tipo de modificación hasta los 3 meses, en que se recogió, de acuerdo a la escala BBB, una valoración media (\pm desviación estandar) de $0,28 \pm 0,22$, de $0,32 \pm 0,25$ y de $0,28 \pm 0,22$, respectivamente para los animales que recibieron 3×10^6 , 5×10^6 y 10×10^6 células madre por vía intravenosa. Estos valores de recuperación funcional motora se mantuvieron sin modificación hasta el momento de sacrificar a los animales, 6 meses después del tratamiento. Los estudios estadísticos efectuados mostraron que no existían diferencias significativas a lo largo del tiempo de evolución en ninguno de los tres grupos experimentales y tampoco se observaron diferencias significativas cuando se compararon los valores medios de recuperación funcional alcanzados, según la cantidad de células madre administradas.

Cuando estos resultados se compararon con estudios previos realizados en nuestro laboratorio, administrando una suspensión conteniendo 3×10^6 de células madre mesenquimales directamente en la cavidad centromedular postraumática, se apreciaron claras diferencias en cuanto a la recuperación motora obtenida, ya que tras la administración intralesional de las células madre se consigue un valor medio de la escala de BBB de $8,2 \pm 0,8$ a los 3 meses del procedimiento, alcanzándose un valor de recuperación funcional motora de $12,8 \pm 1,3$ a los 6 meses (8), siendo 21 el valor máximo de recuperación funcional, que corresponde a un animal normal (Figura 1).

En el estudio de recuperación de sensibilidad de acuerdo al «cold spray test», con un valor máxi-

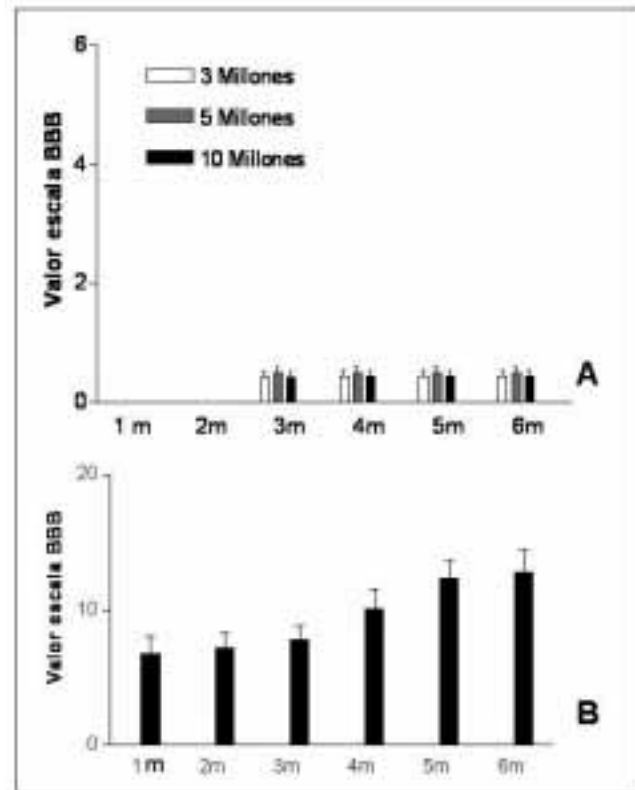


Fig. 1. A: Gráfica que muestra la recuperación funcional motora, de acuerdo a la escala de BBB, en los tres grupos experimentales del presente estudio. No existe diferencia estadística entre grupos. A partir de los 3 meses tras el tratamiento se aprecia recuperación funcional motora, que se mantiene sin cambios hasta el final del estudio, y que no guarda relación con la mayor o menor cantidad de células madre administradas intravenosamente. B: Gráfica correspondiente a la recuperación funcional motora obtenida en una serie previa de animales, a los que se administró 3×10^6 células madre adultas en la cavidad centromedular postraumática (8). Se aprecia que la recuperación obtenida por medio de la administración sistémica es prácticamente despreciable en comparación con la recuperación que se obtiene por medio de la administración intralesional. En la escala BBB el valor máximo (animal sin déficit funcional) corresponde a un valor de 21.

mo de 3 para este test, se observó que los animales con administración intravenosa de células madre no existía ningún tipo de recuperación de sensibilidad hasta los 6 meses después de la administración, momento en que se recogió un valor medio de $0,10 \pm 0,25$ para los animales que recibieron 3×10^6 células, de $0,11 \pm 0,27$ para los animales del grupo que recibió 5×10^6 células, y de $0,11 \pm 0,28$ para el grupo de animales que recibieron 10×10^6 células madre mesenqui-

males. Los estudios estadísticos no mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales. Cuando se compararon estos datos con los parámetros de recuperación de sensibilidad en una serie de animales que fue objeto de un estudio anterior y que habían recibido 3×10^6 células madre mesenquimales en la cavidad postraumática centromedular (8) se apreció una marcada diferencia, en el sentido de que tras la administración intralesional de células madre se observa una recuperación precoz de sensibilidad, que se inicia a las pocas semanas del tratamiento y que a los 6 meses puede llegar a alcanzar un valor de $2,8 \pm 0,4$ (Figura 2).

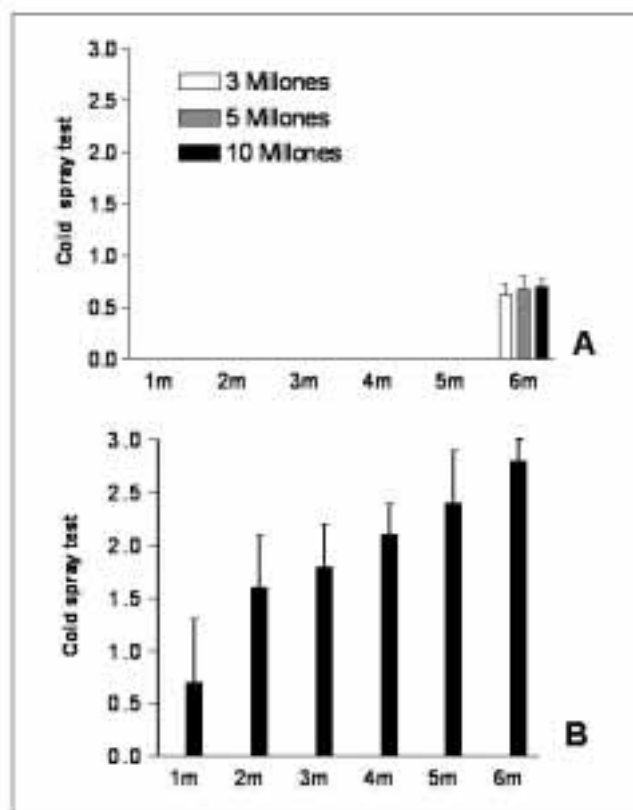


Fig. 2. A: Gráfica que muestra la recuperación sensitiva de los animales correspondientes a los tres grupos experimentales. La recuperación sensitiva sólo pudo ser objetivada a los 6 meses tras la administración sistémica de células madre, sin diferencias significativas según la cantidad de células madre administradas. B: Con fines de comparación, se muestran los valores de recuperación de sensibilidad en una serie previa de animales que recibieron una inyección local, en la cavidad traumática centromedular, de 3×10^6 células madre adultas (8). El valor más alto de la escala del "cold spray test" es 3.

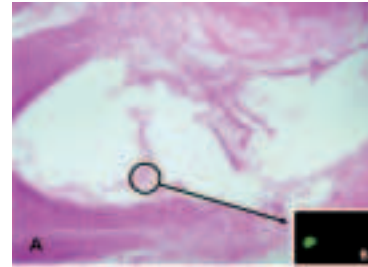


Fig. 3. Característica cavidad centromedular postraumática, en los animales del presente estudio. A: La imagen corresponde a un animal del grupo C, que recibió 5×10^6 células madre por vía intravenosa, 6 meses antes. B: Células madre aisladas, marcadas con bisbenzimidida, e identificadas por medio del microscopio de fluorescencia.

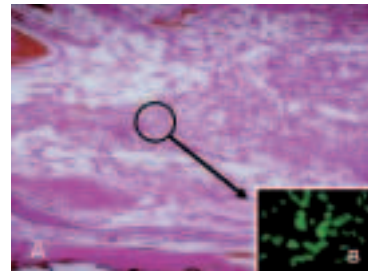


Fig. 4. A: Con fines de comparación respecto de la Figura 3, se muestra la cavidad centromedular postraumática, en un animal previamente parapléjico y que recibió la inyección local de 3×10^6 células madre, 6 meses antes. Se observa cómo la cavidad postraumática se rellena por tractos de tejido neoformado, entre los que se identifica una gran cantidad de células madre (B), por medio del microscopio de fluorescencia.

El estudio histológico de la médula espinal, en todos los animales del presente estudio, mostró una típica cavidad centromedular postraumática, identificándose tan solo en 4 animales, todos ellos del grupo que recibió 10×10^6 células madre por vía intravenosa, algunas células aisladas marcadas con bisbenzimidida tras el correspondiente estudio con el microscopio de fluorescencia y siempre dispersas entre los macrófagos presentes en la cavidad centromedular (Figura 3). Por otra parte, en ninguno de los grupos experimentales se observaron bandas de tejido neoformado relleno de esta cavidad, ni axones identificables por medio del marcaje inmunohistoquímico con PNF, al contrario de lo que ocurre de forma constante en los animales parapléjicos que son sometidos a este tipo de terapia celular utilizando la inyección directa, intralesional de las células madre mesenquimales (5-8, 17,18) (Figura 4).

Vaquero J., Zurita M.,
Oya S., et al

Administración intravenosa de células madre
adultas para el tratamiento de
la paraplejía traumática experimental

DISCUSIÓN

En el presente estudio se ha tratado de verificar la hipótesis de que la administración sistémica de células madre mesenquimales adultas, obtenidas del estroma de la médula ósea, puede representar una forma de terapia celular útil para lograr recuperación funcional en animales previamente parapléjicos como consecuencia de una lesión traumática medular. Esta posibilidad ofrecería una indudable ventaja a la hora de plantear estas nuevas técnicas en clínica humana y apoyaría las evidencias experimentales descritas por algunos autores en cuanto a que la administración intravenosa de células madre adultas, del estroma de la médula ósea, disminuye los déficits funcionales tras una lesión traumática cerebral (9,10).

Nuestros resultados, utilizando un modelo de paraplejía crónicamente establecida, muestran que tras la administración intravenosa de células madre obtenidas del estroma de la médula ósea, puede obtenerse cierto grado de recuperación funcional motora y sensitiva. La recuperación motora de los animales se objetiva a los 3 meses de la administración de las células madre y puede estimarse entre el 1 y el 2 % respecto del valor de la escala de BBB que correspondería a un animal normal, siendo esta recuperación prácticamente despreciable si se compara con la que se obtiene por medio de la inyección intralesional de células madre (40 % de recuperación funcional motora, 6 meses después de la inyección local de 3×10^6 células madre). Por otra parte, la recuperación motora obtenida tras la administración intravenosa de células madre parece ser independiente de la cantidad de células administradas, y se trata de una recuperación no progresiva en el curso de los meses siguientes, al contrario de lo que ocurre tras la administración local, que logra una recuperación funcional que va aumentando en el curso de los meses que siguen al tratamiento (8).

En cuanto a recuperación sensitiva de los animales, en el presente estudio se ha objetivado que existe cierta recuperación a los 6 meses de la administración sistémica de células madre, aunque esta recuperación, de acuerdo con el test utilizado puede estimarse inferior al 4 % del grado de sensibilidad que correspondería a un animal normal. Cuando esta recuperación de sensibilidad se compara con la

que se recoge en otros estudios, utilizando la administración local de células madre, se aprecia que es insignificante, ya que tras la administración local puede obtenerse a los seis meses del tratamiento una recuperación de sensibilidad cercana al 100 % (8). Por otra parte, tampoco hemos obtenido datos en el presente estudio acerca de que la recuperación de sensibilidad en nuestros animales sea dosis-dependiente, ya que ha resultado ser similar para los 3 grupos experimentales.

Una posible explicación para la discrepancia de nuestros resultados respecto de los aportados por otros autores (9,10) y que sugieren un importante efecto terapéutico de las células madre del estroma de la médula ósea cuando se inyectan por vía intravenosa, puede estar en las diferencias del modelo experimental utilizado, ya que los estudios que muestran eficacia de la administración sistémica se han realizado sobre modelos de lesión traumática cerebral y sobre todo, porque en estos modelos se han administrado las células madre en fases precoces tras la lesión, y no en una situación de lesión crónicamente establecida, como se ha realizado en el presente estudio.

En cualquier caso, aunque los valores de recuperación funcional obtenidos en el presente estudio son pobres, hemos de tener en cuenta que representan un indudable efecto terapéutico, ya que con el modelo de lesión medular utilizado, todos los animales que no son sometidos a terapia celular permanecen a lo largo del tiempo sin ningún tipo de recuperación funcional, motora o sensitiva (7,8).

Por otra parte, nuestros presentes hallazgos confirman los resultados que hemos obtenido previamente, tanto al comparar la recuperación funcional de animales parapléjicos crónicos tratados mediante la inyección sistémica o intralesional de 3×10^6 células madre adultas (8) como al estudiar la distribución y acúmulo de las células madre marcadas con Indio-111, tras su administración sistémica (19).

CONCLUSIONES

La principal conclusión del presente estudio, que puede añadirse al conocimiento de las posibilidades terapéuticas en el campo de la paraplejía traumática, radica en la observación de que la recuperación funcional que puede ser lograda con la administra-

Vaquero J., Zurita M.,
Oya S., et al

Administración intravenosa de células madre
adultas para el tratamiento de
la paraplejía traumática experimental

ción sistémica de células madre es insignificante si se compara con la que puede lograrse por medio de la administración local, independientemente de la cantidad de células madre que se administre intravenosamente. Esta observación sugiere que si se

plantea este tipo de terapia celular en pacientes parapléjicos, al menos en el caso de una paraplejía crónicamente establecida, debería escogerse un tratamiento intralesional, en lugar de un tratamiento por vía intravenosa.

Referencias bibliográficas

- Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Zhang X, Chopp M. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci* 2001; 189: 49-57.
- Chopp M, Li Y, Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol* 2002; 1: 92-100.
- Mahmood A, Lu D, Chopp M. Marrow stromal cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain. *Neurosurgery* 2004; 55: 1185-1193.
- Mahmood A, Lu D, Wang L, Chopp M. Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2002; 19: 1609-1617.
- Chopp M, Zhang X H, Li Y, Wang L, Chen J, Lu D, Lu M, Rosenblum M. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *NeuroReport* 2000; 11: 3001-3005.
- Hofstetter C P, Schwarz E J, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop D J, Olson L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2002; 99: 2199-2204.
- Zurita M, Vaquero J. Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation. *NeuroReport* 2004; 15: 1105-1108.
- Vaquero J, Zurita M, Oya S, Santos M. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: systemic or local administration?. *Neurosci Lett*. In press.
- Mahmood A, Lu D, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery* 2003; 53: 697-702.
- Mahmood A, Lu D, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells. *Neurosurgery* 2001; 49: 1196-1203.
- Baron-Van Evercooren A, Gansmüller A, CLERIN E, Gumpel M. Hoechst 33342 a suitable fluorescent marker for Schwann cells after transplantation in the mouse spinal cord. *Neurosci Lett*. 1991; 131: 241-244.
- Zurita M, Oya S, Morales C, López J G, Cevallos C, Vaquero J. Efectos de la administración de dexametasona sobre la desmielinización postraumática en un modelo de contusión medular experimental. En: *Politraumatizados*. Editorial Mapfre-Medicina, Madrid, 1994; págs: 343-349.
- Zurita M, Vaquero J, Oya S. Grafting of neural tissue in chronically injured spinal cord: influence of the donor tissue on regenerative activity. *Surg Neurol* 2000; 54:117-125.
- Zurita M, Vaquero J, Oya S, Montilla J. Functional recovery in chronic paraplegic rats after co-grafts of fetal brain and adult peripheral nerve tissue. *Surg Neurol* 2001; 55: 249-254.
- Basso D M, Beattie M S, Brennhan J C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*.1995; 12: 1-21.
- Wei Y, Hao J, Xu X, Saydoff A J, Haegerstrand A, Hökfelt T, Wiesenfeld-Hallin Z. Long-term alleviation of allodynia-like behaviors by intrathecal implantation of bovine chromaffin cells in rats with spinal cord injury. *Pain* 1998; 74: 115-122.
- Ankeny D P, Mc Tighe D M, Jakeman L B. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 2004; 190: 17-31.
- Lee J, Kuroda S, Shichinohe H, Ikeda J, Seki T, Hida K, Tada M, Sawada K, Iwasaki Y. Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice. *Neuropathology* 2003; 23:169-180.
- De Haro J, Zurita M, Vaquero J. Estudio gammagráfico de la distribución de células del estroma de médula ósea tras su administración intravenosa o intralesional en un modelo experimental de paraplejía traumática. *Mapfre-Medicina*. En prensa.