



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2009/2010

Mariana Pereira Leite

Regeneração e Plasticidade Axonal
na Lesão Medular – Abordagens Terapêuticas

Abril, 2010

FMUP



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Mariana Pereira Leite
Regeneração e Plasticidade Axonal
na Lesão Medular – Abordagens Terapêuticas

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Neurocirurgia

Trabalho efectuado sob a Orientação de:

Prof. Doutor Rui Manuel Cardoso Vaz

Abril, 2010

FMUP

Nome: Mariana Pereira Leite

Endereço electrónico: marianal@med.up.pt

Título da Dissertação/Monografia/Relatório de Estágio: Regeneração e plasticidade axonal na lesão medular – abordagens terapêuticas

Nome completo do Orientador: Rui Manuel Cardoso Vaz

Nome completo do Co-Orientador:

Ano de conclusão: 2010

Designação da área do projecto de opção: Neurocirurgia

É autorizada a reprodução integral desta ~~Dissertação/Monografia/Relatório de Estágio~~ (*cortar o que não interessar*) apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 19/04/2010

Assinatura: Mariana Pereira Leite

Eu, Mariana Pereira Leite, abaixo assinado, nº mecanográfico 030801130, aluno do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter actuado com absoluta integridade na elaboração deste projecto de opção.

Neste sentido, confirmo que NÃO incorri em plágio (acto pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 19/04/2010

Assinatura: Mariana Pereira Leite

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Doutor Rui Vaz, por ter aceite orientar-me neste tema, bem como pelas suas sugestões/correcções oportunas que estimularam a execução do trabalho.

REGENERAÇÃO E PLASTICIDADE AXONAL
NA LESÃO MEDULAR – ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

AXONAL REGENERATION AND PLASTICITY IN
SPINAL CORD INJURY – THERAPEUTIC APPROACHES

Título Abreviado: TERAPÊUTICAS NA LESÃO MEDULAR

LEITE, MARIANA

Aluna Mestrado Integrado

VAZ, RUI

Doutorado, Tutor

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Correspondência para: Mariana Leite

marianal@med.up.pt

RESUMO

BACKGROUND: A lesão medular está associada a disfunção motora/sensorial significativa, cuja recuperação é bastante restrita. Tal deve-se, sobretudo, à limitação da regeneração axonal no SNC, para a qual contribui, preponderantemente, o ambiente extrínseco inibitório estabelecido após lesão. Vários factores inibidores foram identificados, nomeadamente proteoglicanos condroitino-sulfatos e proteínas inibidoras associadas à mielina.

OBJECTIVO: Neste trabalho retratam-se os principais alvos e abordagens terapêuticas que têm sido explorados com vista a ultrapassar o ambiente inibidor e estimular a regeneração/plasticidade axonal, promovendo uma recuperação mais significativa na lesão medular no adulto.

MÉTODOS: Pesquisa e revisão da literatura utilizando as bases de dados MEDLINE e ISI Web of Knowledge.

DISCUSSÃO/CONCLUSÃO: Das terapêuticas em estudo destacam-se ChABC, anticorpos anti-Nogo-A, antagonistas NgR e inibidores Rho. A sua administração *in vivo* em animais conduz a aumento da regeneração/plasticidade axonal, potenciando a recuperação funcional; diferenças nos resultados foram observadas entre modelos de hemiconusão *versus* hemissecção. Destaca-se, também, o transplante de células da mucosa olfactiva ou de células progenitoras de oligodendrócitos como duas terapêuticas de transplante promissoras. Limitações inerentes a cada terapêutica foram observadas. A associação de diferentes terapêuticas tem-se mostrado, em geral, vantajosa. Alguns estudos clínicos estão já a decorrer, sendo ainda necessária maior evidência pré-clínica/clínica para cada terapêutica.

ABSTRACT

BACKGROUND: Spinal cord injury leads to significant motor/sensorial dysfunction. Recovery is quite limited, mostly due to the inability of CNS neurons to regenerate after injury, to which majorly contributes the extrinsic inhibitory environment established after lesion. Several inhibitory factors have been identified, such as chondroitin sulfate proteoglycans and inhibitory myelin-associated proteins.

OBJECTIVE: This work features the main targets and therapeutic approaches that have been explored in order to overcome the inhibitory environment and to stimulate axonal regeneration and plasticity, leading to a more significant functional recovery in adult spinal cord injury.

METHODS: Literature search and review, using MEDLINE and ISI Web of Knowledge databases.

DISCUSSION/CONCLUSION: Therapies such as ChABC, anti-Nogo-A antibodies, NgR antagonists and Rho inhibitors are currently being developed. It has been demonstrated that their administration *in vivo*, in animals, increase axonal regeneration and plasticity, enhancing functional recovery; differences between results in hemiconfusion *versus* hemisection models were observed. Transplantation of olfactory ensheathing cells or oligodendrocytes progenitors cells have been reported as two of the most promising transplant therapeutics. Limitations concerning each approach were notice. Combining different interventions appears to be, in general, advantageous. Clinical trials are currently being performed. Additional pre-clinical and clinical data is needed to each approach.

PALAVRAS-CHAVE

Lesão Medular; Plasticidade Neuronal; Regeneração nervosa; Terapêuticas; Procedimentos Cirúrgicos.

Spinal Cord Injuries; Neuronal Plasticity; Nerve Regeneration; Therapeutics; Surgical Procedures, Operative.

ÍNDICE

	Página:
AGRADECIMENTOS.....	4
TÍTULO.....	5
RESUMO/ABSTRACT.....	6
PALAVRAS-CHAVE.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E FIGURAS.....	11
INTRODUÇÃO.....	12
MÉTODOS.....	15
ABORDAGENS TERAPÊUTICAS:	
I. BLOQUEIO DOS FACTORES INIBITÓRIOS.....	16
i. TERAPÊUTICAS BLOQUEADORAS DO EFEITO INIBITÓRIO DA CICATRIZ GLIAL.....	16
a. INIBIÇÃO DOS PGCS: CONDRITÍNASE ABC.....	16
ii. TERAPÊUTICAS ANTI-PROTEÍNAS INIBIDORAS ASSOCIADAS À MIELINA.....	24
a. ANTICORPOS ANTI-NOGO-A.....	24
b. TERAPÊUTICAS ANTI-NGR.....	30
c. INIBIÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DO NGR.....	32
II. TRANSPLANTE DE TECIDOS/CÉLULAS.....	39
III. TERAPÊUTICA CIRÚRGICA.....	43
DISCUSSÃO/CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E FIGURAS

M – Masculino

F – Feminino

NASCIS – National Acute Spinal Cord Injury Studies

SNC – Sistema Nervoso central

PGCS – Proteoglicanos condroitino-sulfatos

MAG – Myelin-associated glycoprotein

OMgp – Oligodendrocyte-myelin glycoprotein

GAGs – Glicosaminoglicanos

ChABC – Condroitínase ABC

SDaf – Ratos Sprague-Dawley adultos fêmeas

CMO – Células da mucosa olfactiva

BBB (escala de) – Basso Beattie Bresnahan (escala de)

CS – Corticoespinal

RS – Rubroespinal

BDA – Biotinylated dextran amine

NgR – Nogo-66 receptor

SPRR1A – Small proline-rich repeat protein 1A

BHE – Barreira hematoencefálica

GPI – Glicosil-fosfatidil-inositol

Pro-NGF – Pro-nerve growth factor

BDNF – Brain-derived neurotrophic factor

C3 – C3 transferase

MP – Membros posteriores

MA – Membros anteriores

aFGF – Acidic fibroblast growth factor

ASIA (scores) – American Spinal Injury Association (scores)

CPO – Células progenitoras de oligodendrócitos

STASCIS – Treatment for Acute Spinal Cord Injury Study

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1: Recuperação da função manual dextra promovida pelo anticorpo anti-Nogo-A, em primatas com hemissecção medular. A) Desempenho manual dextro. B) Relação entre a extensão da lesão medular e o grau de recuperação funcional em 9 macacos.....Página 26

Figura 2: Via de sinalização do NgR na inibição da regeneração axonalPágina 32

Figura 3: Análise da recuperação motora promovida por C3 e Y27632 em ratinhos BALB-c fêmeas com *over*-hemissecção T7 dorsal.....Página 36

INTRODUÇÃO

A lesão medular atinge cerca de 4/100,000 novos indivíduos por ano (incidência de 12,000 novos casos/ano nos EUA), sobretudo indivíduos do sexo masculino (4M:1F) e com idades compreendidas entre os 17 e os 25 anos. Tendo como principais causas os acidentes de viação, seguidos de quedas e episódios de violência, 50% das lesões ocorrem ao nível cervical (sobretudo C5, seguido de C4, C6) e 50% em outras localizações, sobretudo T12, L1. O quadro neurológico decorrente mais frequente é a tetraplegia incompleta (34.1%), seguido de paraplegia completa (23.0%), tetraplegia completa (18.3%) e paraplegia incompleta (18.5%) [1-2].

Compreende-se, assim, que a lesão medular esteja associada a elevada morbidade e a uma taxa de mortalidade que pode atingir os 4.5% no primeiro ano (70.5% de causa respiratória) [1]. Trata-se de uma condição caracterizada por défices sensoriais e motores severos (e influenciados por diferentes características da lesão, individuais e do tratamento efectuado [3]), associada a várias complicações secundárias e que tem impacto considerável nos gastos em cuidados de saúde e na perda de produtividade, com grande despesa para o Estado [1-2].

Actualmente, estão disponíveis terapêuticas como a cirurgia e a reabilitação física que, apesar de procurarem apurar as suas técnicas com vista a maximizar resultados, conduzem a recuperações limitadas das funções motora e sensorial. Destaca-se, também, uma crescente preocupação na abordagem e gestão destes doentes no sentido de minorizar os danos secundários à lesão (neuroprotecção), embora não haja consenso geral quanto aos procedimentos e terapêuticas farmacológicas a utilizar [3].

Faz-se uma breve referência à administração de metilprednisolona (que visa reduzir a resposta inflamatória desenvolvida nas primeiras horas após lesão). Embora os *National Acute Spinal Cord Injury Studies*, NASCIS, II e III tenham sugerido que a administração de uma dose elevada de metilprednisolona deve ser tratamento *standard* na lesão medular aguda [4] (o que foi implementado na prática clínica), vários estudos posteriores questionaram estas conclusões. Analisando os resultados apresentados no NASCIS II e III, desenvolvendo estudos independentes ou revisões sistemáticas da literatura, vários autores concluíram não haver evidência clara dos benefícios clínicos que suporte que a sua administração de metilprednisolona deva ser prática *standard*, sugerindo que esta deve ser considerada apenas uma opção terapêutica, tendo presente que a evidência dos seus efeitos laterais deletérios é mais consistente do que a evidência do seu benefício clínico [3, 5-8].

Pensa-se que a limitada recuperação observada na lesão medular no adulto se deve sobretudo à limitação na regeneração do SNC, limitação esta não só intrínseca (ao próprio SNC) mas também fortemente potenciada por um ambiente (extrínseco) inibitório, perilesional, que se estabelece após a lesão e que inibe a regeneração e plasticidade axonal [9-17].

Considera-se que para este ambiente inibidor contribuem de forma preponderante: I) a própria cicatriz glial formada após a lesão, e que contem moléculas inibitórias como os proteoglicanos condroitino-sulfatos (PGCS) [18-23]; II) proteínas inibidoras associadas à mielina, destacando-se o Nogo-A [24-25], a *myelin-associated glycoprotein* (MAG) [26] e a *oligodendrocyte-myelin glycoprotein* (OMgp) [17, 26-28]. Outras proteínas associadas à mielina e factores como as semaforinas e receptores da

família *Eph*, envolvidos no *guidance* da regeneração/crescimento axonal, têm vindo a ser estudados e considerados potenciais alvos terapêuticos co-adjuvantes da inibição da acção dos elementos acima referidos [29-31].

Neste trabalho retratam-se os principais alvos e abordagens terapêuticas que têm vindo a ser explorados no contexto de lesão medular no adulto com vista a bloquear os factores inibidores da regeneração e plasticidade axonal associados à cicatriz glial e à mielina, promovendo assim maior recuperação funcional. Abordam-se, também, e de uma forma sumária, as perspectivas correntes no transplante de células/tecidos no já referido contexto, bem como a terapêutica cirúrgica actualmente em uso.

MÉTODOS

Utilizando a *MeSH Database*, em 15/03/2010, após a introdução dos conceitos principais deste trabalho obtiveram-se como palavras-chave cinco *MeSh terms*, posteriormente organizados no seguinte algoritmo de procura: “*Spinal Cord Injuries*” AND (“*Neuronal Plasticity*” OR “*Nerve Regeneration*”) AND (“*Therapeutics*” OR “*Surgical Procedures, Operative*”).

Utilizando este algoritmo, foram obtidas 670 entradas na base de dados *MEDLINE* (através do motor de busca *PubMed*) e 19 entradas na *ISS Web of Knowledge*. Destes títulos, 432 resumos foram lidos e 167 seleccionados com vista à obtenção do artigo completo (o que não foi possível em 6 Artigos). 14 referências dos artigos em *full-text* seleccionados foram adicionadas à lista bibliográfica, bem como o *Annual Report for the Model Spinal Cord Injury Care Systems* elaborado pelo *National Spinal Cord Injury Statistical Center*. No total, neste trabalho são citados 149 artigos.

ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

I. BLOQUEIO DOS FACTORES INIBITÓRIOS

i. TERAPÊUTICAS BLOQUEADORAS DO EFEITO INIBITÓRIO DA CICATRIZ GLIAL

A formação da cicatriz glial perilesional [20-23] é um evento chave na resposta do SNC à lesão [18]. Dos seus componentes destacam-se os astrócitos reactivos, produtores de várias moléculas inibitórias, sendo as mais relevantes os PGCS [16, 32-33], moléculas fundamentais para o *axonal guidance* apropriado durante o desenvolvimento do SNC [34-37] e que estão presentes (ainda que em níveis reduzidos) no adulto nas redes perineurais que envolvem neurónios/sinapses maduros [38-39].

a) INIBIÇÃO DOS PGCS: CONDROITÍNASE ABC

Após lesão medular, vários tipos de PGCS (incluindo neurocano, brevicano e versicano [40-41]) sofrem rápida *upregulation* [28, 42-44]. Este aumento de expressão contribui para a contenção da lesão e prevenção de invasão bacteriana [18], mas é causa *major* da já referida limitação da regeneração axonal [16, 23, 32, 45-49].

Considera-se que a actividade inibitória dos PGCS reside nas suas cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs), que podem ser removidas enzimaticamente pela

condroitínase ABC (ChABC). Foi demonstrado em diversos estudos *in vivo* em animais (a maioria em ratos *Sprague-Dawley* adultos fêmeas (SDaf)) que a administração de ChABC conduz à digestão de PGCS contidos na cicatriz glial, promovendo, assim, aumento da regeneração dos axónios lesionados. Ademais, observou-se a digestão dos PGCS também contidos nas redes perineurais que limitam a plasticidade (que desta forma é potenciada). Deste modo, é aumentada a possibilidade de recuperação funcional [18, 23, 39, 46, 50-58].

Os resultados da administração de ChABC relativos ao aumento do número de axónios regenerados, seu comprimento, distância relativa à lesão e penetração desta, bem como a quantificação do *improvement* funcional proporcionado, variam entre autores e modelos lesionais utilizados [40-41, 46], verificando-se, também, a influência de factores relativos ao próprio protocolo de administração de ChABC (*vide infra*).

Shields et al. investigaram os efeitos da administração de ChABC (produzidos por duas doses diferentes) na laceração medular, utilizando como modelos ratos SDaf com hemissecção medular dorsal. Foi avaliada a regeneração axonal sensitiva e comparados os efeitos induzidos por dose elevada *versus* reduzida de ChABC. Verificou, com resultados $p < 0.1$, que, comparativamente ao grupo controlo (não tratado com ChABC), o número de axónios regenerados na cicatriz era 2.1 vezes superior na administração de ChABC em dose reduzida e 3.1 vezes superior na administração de dose elevada, e que o comprimento dos axónios regenerados era 8.3 e 9.9 vezes superior ao grupo controlo nos grupos com reduzida e elevada dose, respectivamente, apesar de não se verificar o cruzamento completo da lesão na maioria dos casos – as fibras desenvolvidas atravessavam completamente a lesão apenas em 2/8 e 3/9 casos, nos

grupos de reduzida e elevada dose, respectivamente, não se tendo observado nenhum caso no grupo controlo [40].

Já Iselda et al. procuraram estudar os efeitos da ChABC na hemicontusão (utilizando para tal os modelos de hemicontusão desenvolvidos previamente por Young et al. [41]) e compará-los com modelos de hemissecção. Observou-se haver um aumento significativo da regeneração axonal no grupo de hemissecção, mas reduzido no grupo de hemicontusão. Neste último, observou-se que a degradação de GAGs não foi suficiente para promover a regeneração de axónios corticoespinhais; no entanto, o aumento *sprouting axonal* observado neste grupo foi mais significativo do que no grupo com hemissecção [41].

A discrepância dos resultados observados entre os dois modelos pode ser, em parte, explicada pela mais elevada e persistente acumulação de PGCS no grupo de hemicontusão comparativamente ao de hemissecção. Outra possível explicação pode residir na diferente magnitude da resposta inflamatória desencadeada em ambos os mecanismos lesionais [52], bem mais exorbitante no mecanismo de contusão do que hemissecção [59] e, por isso, com um aumento mais acentuado das citocinas inflamatórias que, embora apresentem vantajosos factores promotores de crescimento, têm também efeitos deletérios [52, 60-61].

Factores relativos à administração de ChABC, como dose, via de administração, esquema terapêutico ou temperatura têm vindo a ser estudados, não só para estabelecimento de protocolos mas também como factores influenciadores dos resultados, ao limitarem potencialmente o efeito da ChABC *in vivo* [62].

Com vista a uma maior compreensão fisiopatológica e a ajustes na administração da ChABC, vários autores procuraram explicar a evolução da *upregulation* dos PGCS no tempo e no espaço perilesional. Embora não se verifique consenso geral entre os estudos, estimou-se por métodos imunocitoquímicos que, em ratos SDaf com hemisseção medular, PGCS como neurocano, versicano e brevicano se encontram com expressão aumentada sobretudo nos 1-2 mm perilesionais [41]) e atingem o seu pico cerca de 18 dias após a lesão, com subsequente redução gradual dos valores até níveis normais por volta do 32º a 49º dias [41, 43].

No entanto, outros tipos de PGCS, como o fosfacano, apresentam uma janela de *upregulation* mais alargada no tempo [41]. A variação dos níveis de PGCS depende, também, do mecanismo lesional e severidade da lesão, sendo mais alargada nas lesões severas [18], na hemicontusão e contusão medular, em que os níveis de PGCS se mantêm quase máximos durante 7 e 8 semanas, respectivamente [41, 43], dado haver maior extensão de região glial [41].

A maioria dos estudos iniciais preconizou a administração da ChABC em infusão contínua ou em administração em bólus, repetida em dias alternados [46, 51], dado o *turnover* lento da matriz extracelular [18]. Mais recentemente, Lin et al. demonstraram que a administração única de ChABC em ratos SDaf com lesões unilaterais no tracto nigroestriado, próximo da lesão (e imediatamente após a mesma), pode prevenir quase completamente o aumento da concentração de GAGs pós-lesional, conduzindo a regeneração axonal (traduzida pelo número de axónios que atravessava o local da lesão, detectado por método imunocitoquímico) semelhante ao que se obteve com um protocolo de 4 administrações durante 10 dias, desenvolvido pelos autores num estudo anterior [51] – grupo tratado com ChABC: 2123 axónios ao 28º dia; grupo

controlo não tratado: <100 axónios) [18]. Ademais, observou-se *in vivo* (em ratos SDaf) que a ChABC permanece activa durante vários dias [18, 41] (pelo menos 10 dias [18]), admitindo-se que uma única administração de ChABC é suficiente para remover *in vivo* os PGCS inibitórios durante 7 a 10 dias [18] ou até mesmo 3 semanas. Temos, assim, a administração de ChABC como uma terapêutica simples e facilmente associável ao nível prático a outras terapêuticas [18, 41], verificando-se ainda que a administração única está associada a menor cavitação e melhor cicatrização das extremidades da lesão [18, 63].

Apesar dos resultados positivos, a diminuição dos níveis de PGCS, o número de axónios regenerado (e seu comprimento) e consequente ganho funcional decorrentes da administração de ChABC ficaram aquém do que se esperava e desejava [40, 62]. Procurou-se, então, identificar os factores limitantes, o que abriu novas perspectivas de tratamento e de associação de terapêuticas. Para além do mecanismo lesional (e decorrentes características da cicatriz glial, manifestação temporal da *upregulation* dos PGCS e resposta inflamatória), factores como a termosensibilidade da ChABC [64], localização dos PGCS nos tecidos e interacção dos diferentes tipos de PGCS com o SNC parecem influenciar os resultados da actuação da ChABC, sendo necessária criar métodos viáveis para a sua acção ser maximizada [62].

Por um lado, a ChABC administrada pode não conseguir actuar sobre todos os PGCS. Estudos *in vitro* sugeriram que a ChABC provavelmente não penetrava nas células, digerindo apenas o material extracelular – Li et al. verificaram que cerca de 50% dos GAGs são degradados (sugerindo que estes correspondem a GAGs extracelulares), correspondendo os restantes sobretudo a GAGs intracelulares (embora alguns possam estar contidos na matriz das redes perineurais [65]) e, por isso, não

sujeitos à acção da ChABC [18]. Esta teoria permite justificar não se ter verificado redução dos níveis de ligações condroitino-sulfato—GAGs um dia após administração de ChABC (comparativamente ao grupo controlo), sugerindo haver um aumento da produção de PGCS (a nível intracelular) que só à medida que são secretados é que se tornam acessíveis à acção da ChABC [18].

Por outro lado, observou-se que nem todos os PGCS são digeridos *in vivo* após administração de ChABC, variando a percentagem da sua digestão mediante as diferentes *core protein* que os constituem e sua respectiva forma de interacção com o SNC [18]. Por exemplo, no estudo já anteriormente referido de Lin et al., verificou-se a digestão de GAGs, nomeadamente de hialurano (tal como outros autores haviam já constatado [38]), e a redução quase total do neurocano numa área de 1,5 mm no perímetro do local de injeção [18]. Sabendo-se que o neurocano no SNC se liga ao hialurano [66-67]), este estudo reforça que a interacção do neurocano no SNC passa pela sua ligação ao hialurano) [18].

Também o *timing* da sua administração é factor influenciador. Tendo em vista a regeneração axonal, Li et al. sugerem que a ChABC deve ser administrada o mais precocemente possível, de forma a evitar a barreira física completa da cicatriz glial e a atrofia dos neurónios axotomizados na experiência. Dado o processo de formação da cicatriz glial na contusão e nas lesões severas ser moroso, mais do que uma administração deve ser considerada. Já nas lesões crónicas, uma vez que a produção de novos PGCS é menor do que na lesão sub-aguda, prevê-se que o efeito de uma única dose de ChABC persista durante um tempo mais prolongado [18].

Para além da regeneração axonal, vários estudos utilizando diferentes modelos de lesão em ratos SDaf observaram que a administração de ChABC (quer por via tecal

[68], quer através de microinjecção rostral ou caudalmente à lesão [52]) promove um aumento significativo do *sprouting* axonal não só das fibras lesionadas mas também de fibras intactas, particularmente de fibras serotoninérgicas [52, 68]. Tom et al. observou, ainda, que este aumento é mais evidente nos modelos com contusão medular do que com hemissecção, provavelmente por apresentarem maior número de fibras disponíveis para *sprouting axonal* com a administração de ChABC [52].

Ora com este aumento do *sprouting* axonal e, conseqüentemente, da plasticidade [52, 69-70], pressupunham-se ganhos efectivos na recuperação [56]. No entanto, Tom et al. não observaram haver relação directa entre o aumento do *sprouting* axonal caudal e rostralmente à lesão (no estudo a ChABC foi administrada não no local da lesão mas sim a jusante e a montante deste) e a recuperação funcional – não se observou diferença significativa nos testes de avaliação da função motora entre os grupos tratados com ChABC (quer modelos de hemissecção, quer de hemicontusão) e o grupo controlo [52]. Tal gerou surpresa, dado se pressupor que os *inputs* descendentes serotoninérgicos estão envolvidos na locomoção [71] e que o seu aumento estaria relacionado com a recuperação [72]. Uma possível explicação reside no facto de a administração da ChABC neste estudo ser rostral/caudal à lesão e poder haver ainda PGCS intactos no local da lesão [52] que limitam a plasticidade. Contudo, esta razão não explica a diferença entre o *sprouting* e a regeneração induzidos e observados no local da lesão. Uma outra explicação reside na possibilidade de o *sprouting axonal* observado rostral/caudalmente à lesão poder não ter sido capaz de estabelecer sinapses funcionais, ao contrário da regeneração observada (e que conduziu a ganhos na recuperação funcional), o que explicaria esta assimetria, sugerindo a existência de factores envolvidos na formação de sinapses funcionais que potencialmente influenciam, de forma mais determinante, o *sprouting axonal* do que o processo de regeneração [52].

Supõe-se, uma vez que as redes perineurais digeridas levam vários meses a serem reconstituídas após degradação pela ChABC, que os benefícios do tratamento com ChABC no que se refere ao aumento da plasticidade sejam bastante prolongados no tempo [73].

Huang et al. sugerem que as limitações a uma maior recuperação funcional após tratamento com ChABC podem-se dever à ausência de uma bainha de mielina a envolver os axónios regenerados. Nesse sentido, e tendo em conta que estudos prévios sugerem que o transplante quer de células da mucosa olfactiva (CMO) quer de células Schwann podem promover remielinização em torno dos axónios regenerados e guiar o *sprouting* de axónios através da lesão [74], Huang et al. desenvolveu um estudo envolvendo o transplante de CMO e concomitante administração de ChABC. A função motora de quatro grupos foi estimada de acordo com a escala de Basso Beattie Bresnahan (BBB), um sistema standardizado de pontuação da função locomotora no rato utilizado para quantificar/avaliar o *outcome* [75]. Observou-se que o grupo ao qual foi administrada ChABC isolada e o grupo apenas com transplante de CMO não atingiram pontuações tão elevadas como o grupo em que ambas as terapêuticas foram instituídas, e que este último grupo desenvolveu padrões de movimento muito aproximados aos observados no grupo de ratos não lesionados [62].

Outros estudos foram desenvolvidos associando outras terapêuticas à administração de ChABC, observando-se, no âmbito geral, resultados mais vantajosos nos grupos de associação de terapêuticas do que os na administração isolada de ChABC [55].

ii. TERAPÊUTICAS ANTI-PROTEÍNAS INIBIDORAS ASSOCIADAS À MIELINA

Pela sua actividade inibitória da regeneração axonal no SNC e pelo papel que desempenham na regulação do *sprouting* e da plasticidade axonal [76], as proteínas inibidoras associadas à mielina têm sido alvo de diversas tentativas de inibição.

Várias proteínas inibidoras foram identificadas, destacando-se o Nogo-A, MAG e OMgp. O Nogo-A – responsável *major* por esta actividade inibitória [11, 14, 25] – é codificado no gene *Nogo*, que também codifica as isoformas B e C (com expressões tecidulares diferentes das do Nogo-A e que não contribuem de forma tão relevante para a inibição axonal). As três isoformas partilham a expressão comum de um peptídeo de 66 aminoácidos (Nogo-66) importante para a sua acção inibitória [11, 14, 77], tendo sido, entretanto, identificados outros domínios relevantes para esta actividade [11, 77-78].

Após lesão medular verifica-se um aumento da expressão de Nogo-A nas áreas perilesionais, mantendo-se a correlação anatómica da distribuição de Nogo-A e do seu receptor [79]. No que refere ao papel desempenhado *in vivo* pela MAG e da OMgp na regeneração axonal, carece-se ainda de cabal conhecimento [77, 80], supondo-se, no entanto, que não desempenham um papel inibidor tão relevante como o Nogo-A [29].

a) ANTICORPOS ANTI-NOGO-A

Schawb et al. desenvolveram o anticorpo IN-1 anti-Nogo-A, capaz de neutralizar *in vitro* a actividade inibitória associada ao Nogo-A [14, 24-25, 81-83]. Posteriormente, novas versões de anticorpos anti-Nogo-A (mais estáveis e dirigidos a diferentes

sequências peptídeas) foram desenvolvidas, bem como diferentes formas de administração. Destaca-se a implantação de hibridomas secretores de anticorpos [84], a administração de fragmentos recombinantes parcialmente humanizados (que permitiu maior controlo da produção e secreção de anticorpos) [85], com administração intratecal, intraventricular ou subdural [86].

Estudos experimentais demonstraram que a sua administração *in vivo*, em ratos Lewis, conduz a: I) aumento da regeneração e *sprouting* neuronal [84-85, 87]; II) estimulação da plasticidade, quer estruturalmente ao nível sináptico, quer no estabelecimento de vias vicariantes, utilizando tractos descendentes já existentes ou criando novas conexões [9, 79, 84-85] – verificou-se grande especificidade e funcionalidade dos circuitos formados, sem haver evidência de conexões erróneas [88]; III) incremento da recuperação funcional (traduzida por pontuações mais elevadas na escala de BBB [84-85, 89-90]. Não se verificaram, no entanto, alterações na percepção da dor [84] ou na sensibilidade a estímulos mecânicos [89] – sugerindo que o *sprouting* ao nível das fibras aferentes não ocorre ou que as conexões estabelecidas não são as apropriadas [84].

Com a identificação de três principais domínios específicos do Nogo-A responsáveis, através de mecanismos diferentes, pela sua actividade inibitória [11, 77-78], novos antagonistas mais específicos foram criados. Destaca-se I) o já referido domínio Nogo-66, identificado por Grand Pré et al. [11], expresso na superfície dos oligodendrócitos [11, 14], e que é forte indutor de *growth cone collapse* no gânglio dorsal raquidiano, sendo também capaz de inibir, ainda que com menor potência, o *neurite outgrowth* [11, 77-78]; II) o domínio *Nogo-A-specific region* e os seus 181 aminoácidos centrais, expresso nos neurónios e fibroblastos, responsável sobretudo pela

inibição do neurite *outgrowth*, tendo também um efeito inibidor do growth cone collapse, ainda que mais reduzido [77]; III) a região N-terminal, envolvida na inibição do *spreading* de fibroblastos mas com um efeito neuronal inibitório *minor* [77] – deste modo Oertle et al. sugere que o domínio Nogo-66 está envolvido sobretudo no *axonal guidance*, enquanto que a *Nogo-A-specific region* pode estar envolvida sobretudo na limitação da plasticidade e regeneração [77], o que tem implicações nos resultados obtidos aquando administração de anticorpos com diferentes alvos. Outras regiões distintas do Nogo-A podem contribuir para a sua actividade inibidora, não se verificando, no entanto, um papel preponderante nesta mediação [91].

Weinmann et al. procuraram esclarecer o mecanismo de actuação dos anticorpos anti-Nogo-A, desenvolvendo para tal um estudo que preconiza a administração ventricular ou subdural de três tipos de anticorpos dirigidos à *Nogo-A-specific region* em ratos *Lewis* machos e em macacos *Macaca fascicularis*, com lesão medular. Em ambas as formas de administração, verificou-se uma boa distribuição dos anticorpos na circulação cefalorraquidiana e boa penetração em todo o SNC, observando-se retenção preferencial nas células que expressam Nogo-A (oligodendrócitos e subtipos de neurónios [77, 79, 86, 92]). Intracelularmente, localizavam-se em estruturas vacuolares e lisossomais, ligando-se ao seu antigénio Nogo-A ao nível da superfície celular, conduzindo a internalização e degradação do complexo anticorpo-antigénio. Desta modo, os anticorpos administrados promoveram *downregulation* dos níveis de Nogo-A no SNC (provavelmente por afectar a sua síntese ou pela deplecção das suas reservas intracelulares), levando à redução dos níveis de Nogo-A endógeno total e da sua disponibilidade para interacção com o seu receptor por forma a desencadear os seus efeitos inibitórios [86].

Com o objectivo de transpor esta terapêutica para primatas, vários estudos com macacos foram desenvolvidos. Destaca-se, o estudo de Buchli e Schwab em macacos *Macaca fascicularis* ou *Macaca mulatta*. Doze macacos foram inicialmente treinados durante 2 meses para desempenhar tarefas dexas, tendo sido realizada posterior sub-hemisecção medular cervical em todos os elementos. Imediatamente desde a lesão, um anticorpo anti-Nogo-A foi administrado a 6 macacos, intratecalmente, próximo da lesão, durante 4 semanas, através de uma bomba osmótica; um anticorpo inactivo de controlo foi administrado aos restantes macacos. A Figura 1 retrata os resultados obtidos na avaliação da recuperação da funcionalidade dextra dos animais [88] (figura reproduzida e adaptada de [88]).

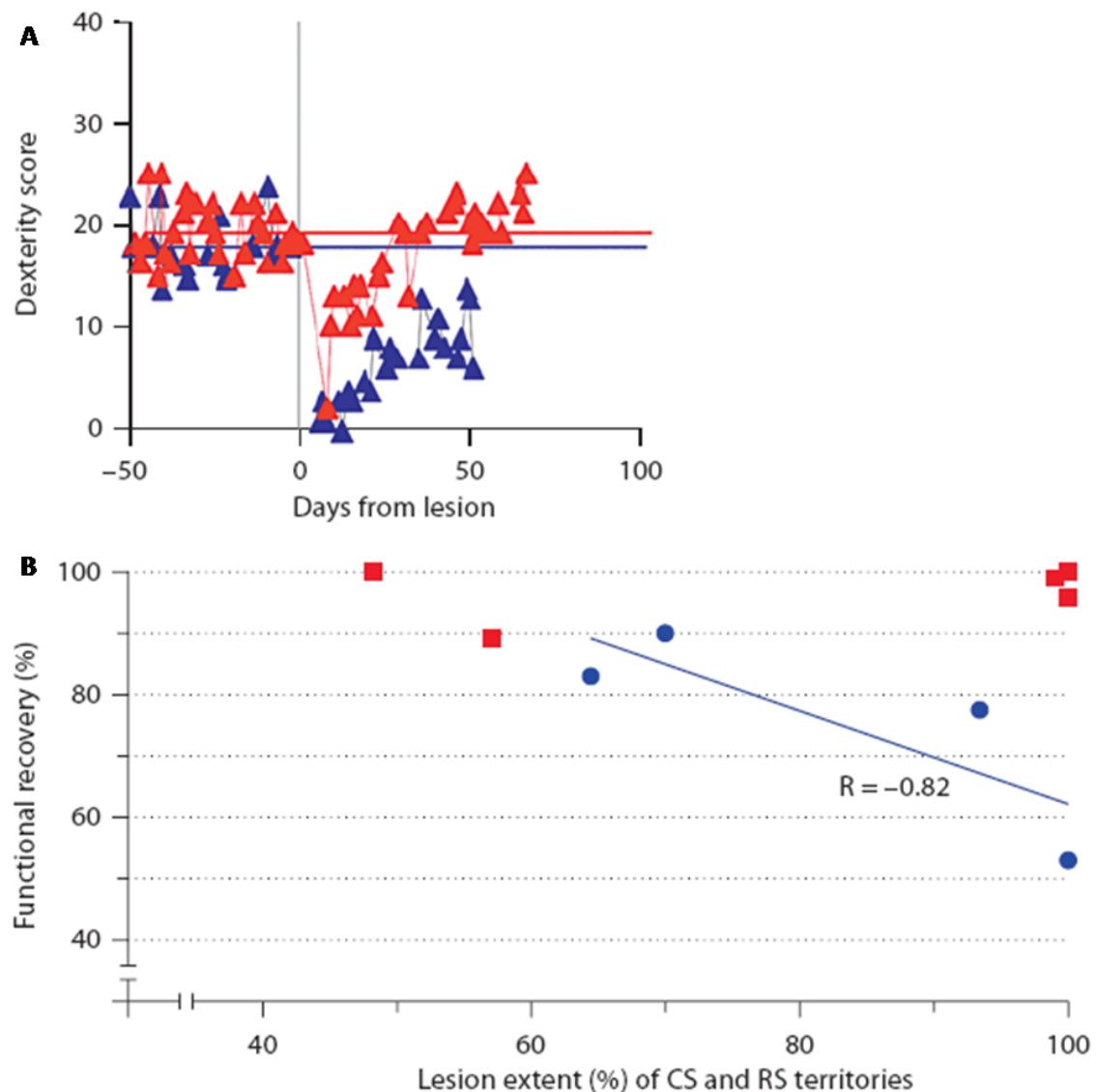


Figura 1: Recuperação da função manual dextra, promovida pelo anticorpo anti-Nogo-A, em primatas, com hemisseção medular. A) Desempenho manual dextro – recuperação bem sucedida de alimentos projectados, avaliada em sessões diárias, de 2 macacos: tratado com anticorpo anti-Nogo-A (vermelho) e tratado com anticorpo controlo (azul). Após a queda da pontuação aquando da lesão, no controlo observamos recuperação de cerca de 30-40% , enquanto que no animal tratado com anticorpo anti-Nogo-A se observa recuperação de 100% da performance dextra pré-lesional. B) Relação entre a extensão da lesão medular e o grau de recuperação funcional em 9 macacos. A extensão da lesão expressa refere-se à percentagem da substância branca lesada no funículo dorsal lateral (componente *major* do tracto corticoespinal (CS)) e no tracto rubrospinal (RS) da hemi-medula. Uma recuperação de 100% significa que a pontuação pós-lesional atingiu os valores pré-lesionais. Nos macacos tratados com o anticorpo controlo (círculos azuis), a recuperação funcional relaciona-se inversamente com a extensão da lesão ($r = - 0.82$); em contraste, todos os animais tratados com anticorpo anti-Nogo-A (quadrados vermelhos) atingiram uma recuperação de 90-100%. Figura reproduzida e adaptada de [88].

Os animais tratados com anticorpo anti-Nogo-A demonstravam capacidade de agarrar alimentos com um movimento de garra preciso, bem como desenvolver outras tarefas como exercer força ou apanhar objectos em movimento. Um marcador neuroanatômico anterógrado (*biotinylated dextran amine*, BDA) foi injectado no córtex motor primário contralateral à lesão cervical, para estudar o tracto corticoespinal, fibras regeneradas/*sprouting* axonal. Observou-se que poucas fibras regeneradas atravessavam completamente a lesão e que o *sprouting* axonal desenvolvido se

correlacionava com o nível de recuperação da função, sugerindo que este *sprouting* do tracto corticoespinhal contribuiu para a recuperação das funções manuais dexas [88].

Estes resultados e o facto de nenhum dos animais ter manifestado sinais de dor crónica ou alterações gerais no seu comportamento, sugerindo segurança desta terapêutica, abriu as portas para a aplicação do anticorpo anti-Nogo-A em humanos [88].

Actualmente, a *Novartis Pharma*, em colaboração com o *Spinal Cord Injury Centre* da Universidade de Zurique e outros centros europeus e americanos especializados, iniciou já o primeiro *clinical trial* com a administração de um anticorpo monoclonal recombinante anti-proteína humana Nogo-A da classe IgG 4/K, para o tratamento da lesão medular numa população com lesão há menos de 10 dias, estando a primeira e a segunda fase concluídas, a segurança e efectividade do fármaco foram comprovadas e aprovadas em Janeiro de 2009 pela agência europeia [93].

A associação de anticorpos anti-Nogo-A com reabilitação específica (*treadmill training*) em ratos SDaf foi avaliada por Maier et al., em que observou maior recuperação funcional nos grupos em que cada uma das duas terapêuticas foi implementada isoladamente, comparativamente ao grupo no qual ambas as terapêuticas foram instituídas. Estes resultados não eram os empiricamente esperados, uma vez que as terapêuticas são sinergistas. No entanto, esta mesma sinergia poderá explicar estes resultados, se considerarmos haver competição entre as duas terapêuticas pelos mesmos mecanismos. Este estudo levanta questões inerentes à associação de terapêuticas, mostrando ser necessário obter maior evidência experimental nesta área [94].

b) TERAPÊUTICAS ANTI-NGR

A identificação do receptor através do qual o domínio Nogo-66 exerce esta sua actividade inibitória – Nogo-66 receptor (NgR) [78] – tornaram o NgR num potencial alvo terapêutico, sobretudo após a demonstração de que o NgR é, igualmente, o receptor funcional da MAG [95-96] e da OMgp [26]. Observou-se, aliás, que a afinidade das três proteínas para o seu receptor é elevada [26] e similar entre si, verificando-se competição entre as três proteínas pela ligação ao seu receptor, ainda que interajam com locais diferentes – o que sugere uma certa redundância na actividade inibitória das proteínas da mielina [26, 95]. Trata-se de um receptor constituído por dois domínios, um ao qual se ligam as proteínas da mielina [10, 26, 92, 96] e outro essencial para a transdução de sinal [10].

Este receptor mostra, também, ter alguma afinidade para si mesmo [96]. Na administração de versões recombinantes solúveis verificou-se a sua ligação com o Nogo-A (e também com MAG [95] e OMgp [26]), diminuindo os níveis de Nogo-A disponíveis para interacção com o NgR endógeno, observando-se também a interacção e até mesmo ligação da versão NgR recombinante com o NgR endógeno (diferentes estudos desenvolveram diferentes versões recombinantes solúveis com diferentes afinidades para o Nogo-A, MAG e NgR) – tudo isto resultou na reversão parcial da acção inibitória do Nogo-A, MAG e OMgp [10, 96-98].

Com o objectivo de bloquear a interacção Nogo-66—NgR, GrandPré et al. desenvolveram o peptídeo antagonista NgR (NEP1-40) (fragmento solúvel de NgR antagonista selectivo e competitivo do NgR) que, quer por administração intratecal quer sistémica mostrou *in vivo* (em ratos SDaf) atenuar o feito inibitório do domínio Nogo-

66 no *growth cone collapse* e *outgrowth* neuronal, promovendo regeneração axonal e recuperação funcional [99] – não se verificou, no entanto, redução da inibição do *outgrowth* neuronal induzido pela MAG. [96] Num estudo similar, Li et al. verificaram o crescimento extenso de axónios corticoespinhais, *sprouting* de fibras serotoninérgicas, *upregulation* da proteína de crescimento axonal SPRRIA (*small proline-rich repeat protein 1A*) e re-estabelecimento de sinapses, verificando também não haver limitação do grau de *sprouting* axonal ou da recuperação funcional quando a administração de NEP1-40 foi atrasada para o sétimo dia pós-lesão – o que sugere persistência da capacidade regenerativa do tracto corticoespinhal [100]. Observou-se, também, que a administração sistémica de NEP1-40 nos ratos após a lesão conduziu a resultados sobreponíveis aos obtidos com administração intratecal, sugerindo haver uma quebra na barreira hematoencefálica (BHE) após o trauma, proporcionando uma janela terapêutica em que é possível administrar agentes que, em circunstâncias de não-lesão, não teriam acesso ao SNC [100], o que vem reforçar a teoria de que a BHE pode estar comprometida durante semanas a meses na área do trauma medular [101].

Outros bloqueadores do NgR como anticorpos monoclonais foram desenvolvidos, bem como inibição transgénica do NgR com um fragmento funcionalmente bloqueador do NgR (NgR310) [102].

A redundância da actuação e efeitos das proteínas envolvidas pode explicar facto de a inibição conseguida com estes agentes ser sempre parcial. Outras subunidades dos receptores Nogo foram entretanto identificadas, julgando-se que todos partilham a mesma via de sinalização ou que, alternativamente, utilizam vias diferentes mas que têm em comum alguns elementos, nomeadamente o p75 e Rho. Outros subtipos de NgR foram identificados – NgR2 e NgR3 – que, apesar de estruturalmente serem

semelhantes ao NgR, apresentam uma afinidade muito reduzida para os ligandos do NgR [13].

c) INIBIÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DO NGR

No que se refere à interacção do NgR com as proteínas da mielina, vários ligandos e co-receptores foram identificados, abrindo-se uma nova janela de intervenção terapêutica. A via de sinalização do NgR encontra-se descrita na figura 2 (figura reproduzida e adaptada de [13]).

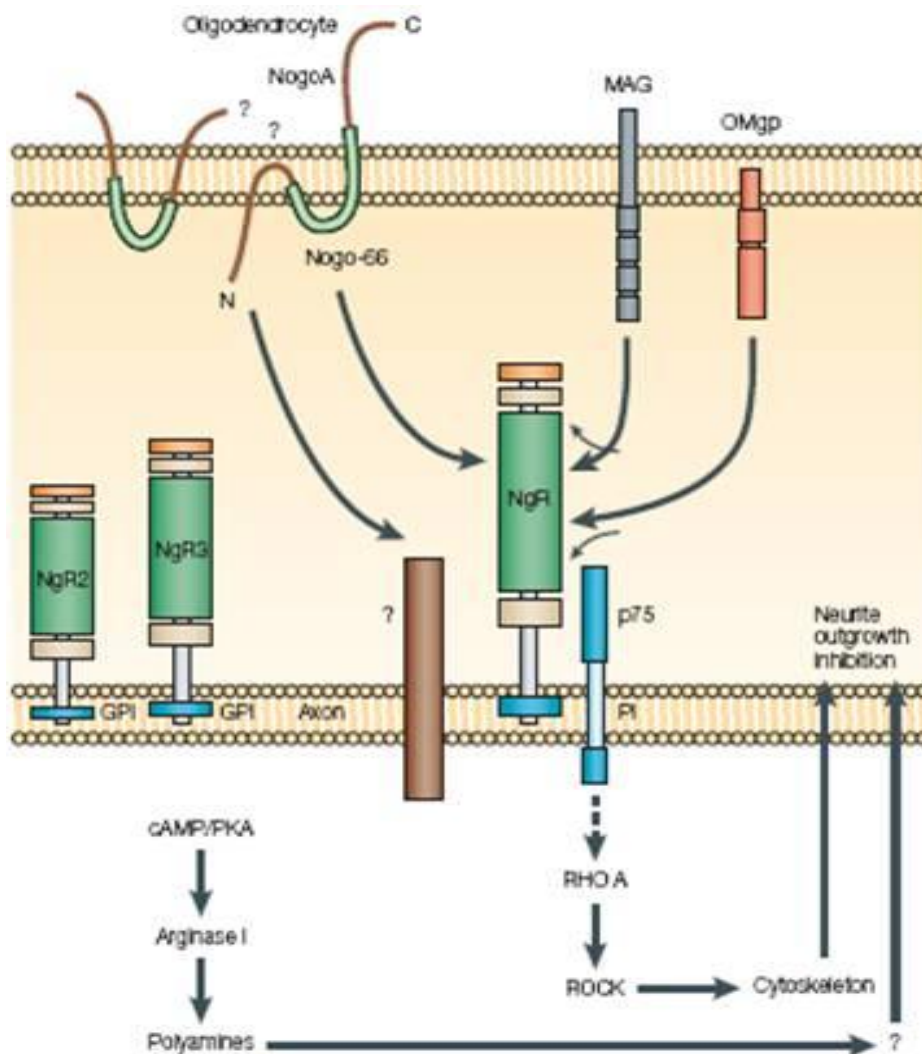


Figura 2: Via de sinalização do NgR na inibição da regeneração axonal. Após interação do NgR com o Nogo-A, MAG e OMgp, o NgR vai recrutar moléculas co-receptoras, uma vez que, sendo uma proteína ancorada na membrana plasmática pelo glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), não é capaz de efectuar directamente a transdução de sinal. A activação destes co-receptores – dos quais se destaca o receptor de neurotrofinas p75 – vai, por sua vez, activar a via Rho e, conseqüentemente, o ROCK (cínase associada ao Rho), que vão intervir na modulação do citoesqueleto e, deste modo, inibir o *outgrowth* neuronal. Quando o domínio amino(N)-terminal do Nogo A se encontra no espaço extracelular (e não no citoplasma) pode-se ligar a outras proteínas neuronais (ainda não identificadas), que também conduzem à mesma inibição. Destaca-se, ainda, a existência de uma outra via, independente, que envolve a activação de cAMP/PKA (proteína cínase A) e que também conduz a inibição, carecendo, ainda, de maior compreensão. Os receptores NgR2 e NgR3 apresentam reduzida ligação aos ligandos mielínicos do NgR. Figura reproduzida e adaptada de [13].

O bloqueio do receptor de neurotrofinas p75 foi tentado em vários estudos, não se dispondo, ainda, de uma terapêutica antagonista satisfatória. É ainda necessário esclarecer quais os outros papéis desempenhados pelo Rho quando estimulado por outras moléculas, bem como explorar como poderão estes ser diferencialmente regulados por um agente terapêutico [13]. Salienta-se o seu papel regulador no ciclo de sobrevivência/morte celular, dado mediar a morte da célula quando induzida, sobretudo, pelo *pro-nerve growth factor* (Pro-NGF) [103-104]. Por outro lado, desempenha um papel fundamental na mielinização e migração das células de Schwann, durante o desenvolvimento e na regeneração [105], bem como na activação do factor neural NF-

κ B que promove a sobrevivência de vários tipos de células, incluindo neurónios [104], pelo que a inibição deste seu papel não é desejável. Através do Rho, o p75 regula o crescimento axonal (quer durante o desenvolvimento, quer na lesão) e é capaz de interferir na transmissão sináptica ao estimular a secreção do neurotransmissor inibitório acetilcolina (quando estimulado pelo *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) [104]. Zhou et al. sugerem que a lesão nervosa afecta diferencialmente a expressão do p75 nos tecidos, considerando que a lesão actua como um *trigger* de *upregulation* nas células de Schwann mas não na glia central. Sugerem, ainda, que apesar de ao nível neuronal o p75 mediar a actividade inibitória das proteínas associadas à mielina, ao nível da glia poderá desempenhar um papel positivo na regeneração, possivelmente por estabelecer gradientes quimioattractivos de neurotrofinas ou por antagonizar competitivamente a interacção do Nogo-A com o NgR (quer por contacto célula-a-célula, quer por regular a proteólise intramembranar) [106].

Trata-se, assim, de um receptor capaz de induzir tanto a sobrevivência como a morte celular, cuja regulação carece ainda de cabal conhecimento [107].

Por sua vez, o p75 interage com o Rho (da família das GTAases) [108] que regula a polimerização da actina – quando está activo promove a rigidez da actina do citoesqueleto neuronal, inibindo assim o alongamento axonal [109].

Diversos estudos observaram, *in vitro* ou em ratinhos, que a proteína C3 transferase (C3), produzida pelo *Clostridium botulinum*, é capaz de inactivar especificamente o Rho (por ribosilação ADP do seu domínio effector [110]), sem afectar outras GTPases [111].

Várias versões modificadas de C3 foram criadas para ultrapassar algumas dificuldades inerentes às propriedades desta proteína que dificultavam a sua aplicação *in vivo*, destacando-se uma forma capaz de atravessar membranas (BA-210) desenvolvida por McKerracher [111].

Salienta-se, também, a inibição de um dos efectores do Rho – o ROCK – pelo Y27632 (Fasudil), que inibe a actividade cínase do ROCK por competir com o ATP pela sua ligação [115].

Dergham et al. comparou ambas as terapêuticas (C3 *versus* Y27632), observando (em concordância com outros autores) que quer a inactivação do Rho quer da cínase ROCK conduzem a um aumento da regeneração axonal nos substratos inibidores e ganhos na função motora [112-114] em modelos de ratinhos BALB-c fêmeas com hemissecção medular, verificando que o C3 é mais eficaz [112]. Os resultados que traduzem a recuperação motora estão descritos na Figura 3 (figura reproduzida e adaptada de [112]).

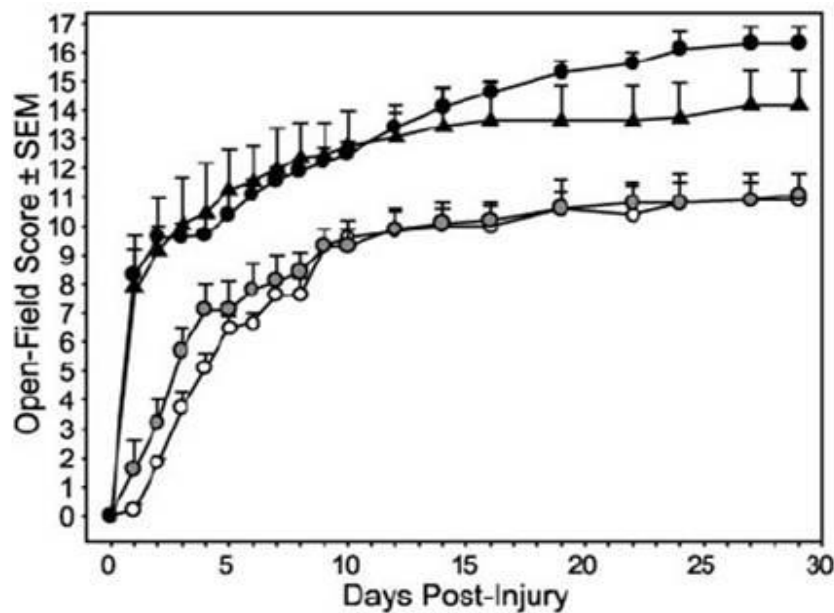


Figura 3: Análise da recuperação motora promovida por C3 e Y27632 em ratinhos BALB-c fêmeas com *over-hemissecção* T7 dorsal. 4 grupos foram constituídos: grupo tratado com C3 (círculos pretos), grupo tratado com Y27632 (triângulos pretos), grupo de controlo tratado com fibrina (círculos cinzentos) e grupo não tratado (círculos não preenchidos). Os resultados foram quantificados através do *BBB open-field locomotor test* [116], utilizando uma escala de BBB modificada (a escala original de BBB, com 21 pontos, foi alterada para uma escala de 17 pontos) que preconizava as seguintes pontuações: (0) sem movimentos observáveis dos membros posteriores (MP); (1) movimento discreto de 1 ou 2 articulações; (2) movimento extenso de uma articulação e/ou movimento discreto de uma terceira articulação; (3) movimento extenso de 2 articulações; (4) movimento discreto das 3 articulações dos MP; (5) movimento discreto de 2 articulações e movimento extenso de uma terceira articulação; (6) movimento extenso de 2 articulações e movimento discreto de uma terceira articulação; (7) movimento extenso das 3 articulações, caminhar com pouco ou nenhum suporte de peso; (8) movimento extenso das 3 articulações, caminhar com suporte de peso; (9) caminhar dorsal frequente ou consistente, com suporte de peso; (10) caminhar plantar frequente, com suporte de peso; (11) caminhar plantar consistente, com suporte de peso, sem coordenação; (12) caminhar plantar consistente, com consistente suporte de peso e ocasional coordenação dos membros anteriores (MA) com os MP; (13) caminhar plantar consistente, com consistente suporte de peso e frequente coordenação MA-MP; (14) caminhar plantar consistente, com consistente suporte de peso, consistente coordenação MA-MP; posição predominante das patas durante a locomoção é em rotação interna ou externa, ou coordenação MA-MP consistente com andar posterior ocasional; (15) caminhar plantar consistente, com consistente suporte de peso, consistente coordenação MA-MP; posição predominante das patas durante a locomoção é paralela ao corpo;

frequente a consistente encurvamento das extremidades, instabilidade do tronco; (16) caminhar plantar consistente, com consistente suporte de peso, consistente coordenação MA-MP; posição predominante das patas durante a locomoção é paralela ao corpo, extremidades estendidas, alguma instabilidade do tronco; (17) caminhar plantar consistente, com consistente suporte de peso, consistente coordenação MA-MP; posição predominante das patas durante a locomoção é paralela ao corpo, extremidades estendidas e estabilidade consistente na locomoção. Os resultados entre os grupos foram analisados pelo teste U Mann-Whitney às 24h, 1 semana, 2 semanas e 1 mês após lesão, sendo os valores de *p* semelhantes em todas as ocasiões temporais: grupo tratado com C3 *versus* fibrina, $p < 0.001$; grupo tratado com Y27632 *versus* fibrina, $p < 0.05$; grupo tratado com C3 *versus* Y27632, não significativo; grupo tratado com fibrina *versus* não tratado, não significativo. De referir que os ratinhos tratados quer com C3 quer com Y27632 apresentaram marcada recuperação motora em 24h (sugerindo que outros mecanismos que não a regeneração de longa distância estejam envolvidos nas fases iniciais da recuperação, nomeadamente o *sprouting* e plasticidade axonal, e neuroprotecção [117]). A regeneração deverá desempenhar um papel mais fundamental em fases não-iniciais. Figura reproduzida e adaptada de [112].

Importa referir que, para além do seu papel nas vias de sinalização do NgR, o Rho está envolvido na regulação da morte celular [104, 112], tendo sido demonstrado em ratos *Long-Evans* adultos fêmeas e ratinhos BALB-c fêmeas que a sua inactivação leva à redução do número de células apoptóticas [117].

De ressaltar ainda o facto de tanto o Rho como o ROCK serem expressos ubiquitariamente (ao contrário da selectividade neuronal do NgR), pelo que a sua

manipulação terapêutica pode conduzir a vários eventos fisiológicos para além dos referidos, potencialmente limitando a sua aplicação [13].

Actualmente, *clinical trials* estão a ser desenvolvidos pela *Alseres Pharmaceuticals, Inc*, utilizando o inibidor Rho recombinante Cethrin® [19, 118], tendo já demonstrado em estudos de Fase I/IIa envolvendo 37 participantes, com lesão medular cervical ou torácica, que a sua administração tópica após cirurgia de descompressão medular é segura [118].

A associação desta terapêutica com o transplante de células tem vindo a ser explorada. Destaca-se o estudo desenvolvido por Furuya et al., que preconizava a administração de fasudil nas primeiras horas após contusão ao nível de T10 em ratos SDaf, bem como transplante de células estromais da medula óssea 14 dias após a lesão. Neste estudo observou-se que, ao nível motor, 8-9 semanas após a lesão, embora nenhuma das terapêuticas isoladas tenha gerado ganho funcional significativo, a associação de ambas conduziu a uma recuperação locomotora estatisticamente melhor do que o observado no grupo controlo não tratado (acessado pela escala de BBB), o que foi corroborado por estudo ao nível histológico e imunoistoquímico. Ao nível sensorial não se observaram diferenças significativas [119].

II. TRANSPLANTE DE TECIDOS/CÉLULAS

Estratégias de transplante celular têm sido desenvolvidas, com o objectivo de ultrapassar as limitações intrínsecas à regeneração do SNC [19, 120] e, assim, substituir neurónios lesados, induzir regeneração/plasticidade e estimular a reparação, nomeadamente ao substituir células de suporte como os oligodendrócitos que conduzem à remielinização [120]. As células transplantadas podem, ainda, promover protecção das células endógenas quanto a lesão secundária, através da produção de moléculas tróficas promotoras de protecção celular e plasticidade [120].

Diferentes tipos de células/tecidos foram estudados com vista ao transplante. Embora a maioria das abordagens não apresentem evidência clara e forte nos estudos experimentais, vários tipos de transplante foram já aplicados em humanos, havendo alguns estudos clínicos. No entanto, o reduzido número de participantes que, em geral, compõe as amostras dos estudos, bem como outros enviesamentos inerentes, limitam a evidência produzida. Destacam-se algumas terapêuticas, mais amplamente presentes na literatura e com resultados positivos.

Um dos tecidos utilizados são os nervos periféricos autólogos, que são enxertados nos locais de lesão e lá mantidos por *fibrin glue* contendo *acidic fibroblast growth factor* (aFGF) [19], não havendo, no entanto, concordância nos resultados de vários estudos pré-clínicos. A administração simultânea de neurotrofinas [121], aFGF [122] ou de ChABC [50] levou a uma potenciação dos resultados observados neste tipo de transplante *in vivo* [50, 121-122], tendo-se observado um aumento da regeneração e do *outgrowth* axonal, que levou a recuperação funcional considerável [50]. Um *case report* de um único paciente com lesão medular incompleta crónica mostrou haver

melhoria das funções motoras e sensitivas, após enxerto de nervo sural autólogo [123]. No entanto, um estudo semelhante desenvolvido no Brasil envolvendo 5 pacientes não verificou os mesmos *improvements* [124].

Uma terapêutica celular possível consiste no transplante de macrófagos autólogos. Os resultados experimentais não são concordantes quanto aos ganhos funcionais [19], havendo mesmo um estudo (que envolve a activação dos macrófagos através de uma substância pró-inflamatória) em que se observou dano axonal e desmielinização [19]. Apesar da fraca evidência dos estudos pré-clínicos, estudos clínicos estão a ser desenvolvidos [19, 125].

A utilização de células estaminais foi, também, investigada. Destaca-se o transplante de células estaminais adultas hematopoiéticas e estromais da medula, facilmente obtidas a partir do doente, evitando questões imunológicas e éticas [19], e que se mostraram, *in vivo*, promotoras de uma recuperação funcional mais significativa [126-127]. Embora a questão da diferenciação destas células em neurónios e células gliais não esteja ainda totalmente esclarecida, estudos clínicos foram já desenvolvidos no Brasil e na República Checa, em que se verificou, *grosso modo*, aumentos discretos dos ganhos funcionais, de diferentes graus, em quase metade dos participantes [19].

O transplante de células de Schwann tem sido extensamente estudado em vários modelos experimentais, considerando-se ser capaz de promover regeneração axonal e mielinização dos axónios regenerados [128-129]. A segurança deste procedimento em humanos foi reportada por Saberi et al., após um ano de seguimento de indivíduos com lesão medular crónica em quem foi efectuado transplante destas células [130].

No entanto, uma limitação foi observada na aplicação das células de Schwann: Xu et al. verificaram não haver regeneração axonal para além do local de transplante [125]. Assim, a associação de terapêuticas que visem diminuir o ambiente inibitório da cicatriz glial perilesional surge como eventual potenciador do transplante destas células. Novos estudos que optimizem esta terapêutica são necessários para que seja testada em humanos [125].

Uma estratégia que se tem destacado pelos seus resultados positivos tem sido o transplante de células da mucosa olfactiva – as células gliais olfactivas (*olfactory ensheathing glia*) [125]. Evidência pré-clínica demonstrou que a sua cultura e posterior transplante no rato induz regeneração axonal e traduz-se em ganho funcional [131-134]. Fouad et al. associou, a esta terapêutica, o transplante de células Schwann e a administração de ChABC, reportando melhoria na locomoção e na prevenção da disfunção vesical [125, 135].

Estudos clínicos têm vindo a ser desenvolvidos, destacando-se o estudo de Lima et al., desenvolvido em Portugal. Nesse estudo, as células da mucosa olfactiva autóloga não foram isoladas, tendo sido enxertado tecido nasal directamente em 7 pacientes com lesão medular crónica, tendo-se verificado um aumento dos *ASIA (American Spinal Injury Association) scores* motores em todos os participantes (dois deles passaram mesmo de ASIA A para ASIA C), tendo-se observado em todos, excepto um participante, melhoria do *ASIA score* sensorial [124, 136].

Uma outra terapêutica que parece promissora é o transplante de células progenitoras de oligodendrócitos (CPO), capazes de induzir maior remielinização dos que as formas maduras da sua linhagem (até por, ao contrário destas, não exibirem

domínios extracelulares de Nogo-A ou MAG) [125, 137]. Keirstead et al. produziram CPO a partir de células estaminais embrionárias humanas e, após o seu transplante em ratos adultos com contusão medular, verificaram a sua redistribuição numa área perilesional e diferenciação em oligodendrócitos, observando posterior aumento da remielinização e ganho substancial locomotor [138]. Estas CPO derivadas de células estaminais humanas embrionárias foram já aprovadas pela *FDA* para utilização em estudos clínicos [125].

III. TERAPÊUTICA CIRÚRGICA

Vários estudos sustentam que a intervenção cirúrgica está indicada para descompressão medular após lesão, bem como para realinhamento e estabilização da coluna em casos específicos [139].

Alguns autores levantaram a hipótese de poder haver benefícios na fixação espinhal após trauma medular, no entanto, dada a escassez de estudos controlados e randomizados não há estudos suficientes para verificar evidência nos benefícios ou desvantagens deste procedimento [140].

Associada à descompressão medular, Xu et al. retratam ainda um outro benefício da intervenção cirúrgica, sugerindo que a descompressão medular desempenha um papel na redução da apoptose celular secundária à lesão medular [141]. Ora considerando que a apoptose secundária à lesão contribui para dano neuronal e perda funcional após lesão [142-144], e que estudos experimentais desenvolvidos por Weda et al, entre outros, verificaram que a diminuição da apoptose de células neuronais desempenha um papel importante na diminuição do dano neuronal e perda funcional, bem como na recuperação neurológica após lesão incompleta [145-147], ao diminuir a apoptose celular secundária a cirurgia de descompressão medular apresenta aqui uma vantagem adicional [141].

Apesar do consenso geral quanto ao benefício da cirurgia, no que se refere ao *timing* ideal em que este procedimento deve ocorrer não se verifica consenso claro entre os autores [139, 148]. Com o objectivo de esclarecer qual a influência que o “timing” da descompressão cirúrgica medular desempenha no *outcome* dos doentes após lesão medular traumática, bem como qual a janela temporal ideal para a cirurgia, vários estudos foram desenvolvidos. Destaca-se a revisão sistemática levada a cabo por Furlan

et al., em que foram considerados 19 estudos experimentais e 22 estudos clínicos que, na sua maioria, comparavam grupos com diferentes timings de descompressão cirúrgica [139]. De salientar as dificuldades e limitações inerentes à comparação entre os estudos, uma vez que os modelos experimentais usados diferem entre si, bem como o tamanho da amostra, quase sempre reduzida [139].

Furlan et al. concluíram haver evidência que sustente que a intervenção antes das 24h é segura e que pode melhorar o *outcome* clínico e neurológico dos doentes, bem como diminuir os custos financeiros associados à hospitalização e a complicações secundárias pós-traumáticas. A precocidade da intervenção não altera a mortalidade. Ademais, os estudos pré-clínicos e clínicos sugerem que o *outcome* dos doentes poderá ser potencialmente otimizado se se proceder a descompressão cirúrgica e estabilização medular entre as 8h e as 24h. Assim, pela comparação entre os estudos analisados através do método modificado de Delphi (Reid, 1993), um painel de dez especialistas recomenda neste estudo que, pelos benefícios inerentes precocidade da descompressão cirúrgica, apesar do *timing* ideal para descompressão cirúrgica não ser ainda evidente, este procedimento deve ser considerado em todos os doentes com lesão medular traumática e realizar-se entre as 8h e as 24h após o evento traumático, sempre que seja possível [139]. Resultados do *Treatment for Acute Spinal Cord Injury Study (STASCIS)* referidos em Fehlings et al. também apontam nesse sentido (antes das 24h) [149].

DISCUSSÃO/CONCLUSÃO

Novas terapêuticas têm vindo a ser desenvolvidas com vista a bloquear o efeito inibidor dos PGCS e das proteínas inibidoras associadas à mielina Nogo-A, MAG, OMgp. Destacam-se a ChABC, anticorpos anti-Nogo-A; antagonistas NgR e bloqueadores do Rho/ROCK. Estudos *in vivo* em animais demonstram que cada uma destas abordagens conduz a um aumento da regeneração, *sprouting* e plasticidade axonal, proporcionando maiores ganhos na recuperação das funções motora e sensitiva.

Diferenças nos resultados dos estudos foram observadas quando se comparam modelos lesionais diferentes (sobretudo hemiseccção versus (hemi)contusão), o que reflecte diferentes características inerentes e próprias de cada mecanismo – destacam-se as diferentes características observadas na cicatriz glial, cujos diferentes PGCS apresentam expressão quantitativa, temporal e espacial diferem entre ambos os modelos. O esclarecimento desta desigualdade pode permitir ajustes nos desenhos dos estudos, proporcionando adequação da terapêutica à fisiopatologia da lesão e, assim, maximizar resultados.

No entanto, apesar de os resultados obtidos serem positivos, o *improvement* proporcionado por estas terapêuticas está, ainda, longe de ser completo e o ideal. Vários factores limitantes da actuação de cada agente terapêutico foram identificados. São, assim, necessários estudos que procurem esclarecer quais os protocolos de administração que maximizam o potencial benéfico de cada terapêutica, adequado ao tipo de lesão. Para tal, novas revisões sistemáticas dos diferentes estudos desenvolvidos em cada tipo de terapêutica poderão ser relevantes, dada a escassez de artigos do género. Compreende-se, no entanto, que a variedade de modelos, protocolos e tamanhos

das amostras utilizadas nos estudos possa dificultar a elação de conclusões com evidência substancial.

Ressalvam-se as limitações inerentes aos estudos citados no trabalho. Por exemplo, o facto de os modelos utilizados para a laceração reproduzirem apenas uma hemiseccção, não sendo levado em conta factores como hemorragia intramedular, contusão ou possível pressão extrínseca contra a medula [40]. Ademais, grande parte dos estudos contempla apenas a hemiseccção, que não corresponde, no homem, nem à lesão mais frequente nem à mais severa. Assim, dado que em humanos os casos mais severos envolvem geralmente componente de contusão [41], é fundamental que mais estudos comparem os resultados das terapêuticas em ambos os modelos, antes de se extrapolar para a sua eficácia em humanos [41].

Outros *outcomes* decorrentes destas terapêuticas, como por exemplo, recuperação do controlo vesical, não foram abordados neste trabalho, embora tenham vindo a ser alvo de investigação e deva ser tido em consideração pela sua influência na qualidade de vida dos doentes.

Estudos que esclareçam mais profundamente as limitações ao ganho funcional, em particular os factores influenciadores do estabelecimento de novas sinapses funcionais, bem como de modeladores do *guidance* axonal, são necessários, por forma a que se potencialize as consequências no ganho de função decorrente do aumento do *sprouting* axonal já observado.

Com vista a ultrapassar as limitações individuais de cada terapêutica e aumentar a recuperação funcional final, diferentes associações de terapêuticas têm vindo a ser exploradas. Estas associações, por exemplo de terapêuticas inibidoras do efeito da mielina como a ChABC com terapêuticas de transplante de CMO ou células de

Schwann, têm-se mostrado, em geral, bastante promissoras, com ganhos mais significativos na recuperação funcional do que o observado aquando das terapêuticas isoladas. Estas associações podem assumir particular relevância no âmbito da contusão medular, dado haver maior componente glial inibitório comparativamente a hemissecção e, possivelmente, factores influenciadores próprios, mais dificilmente ultrapassados com um só tipo de actuação terapêutica.

No que se refere particularmente às terapêuticas de transplante, a variedade de fontes tecidulares/celulares que tem vindo a ser explorado é vastíssima. No entanto, falta ainda evidência pré-clínica que compare os diferentes procedimentos e fontes de tecido/células. Ao nível clínico, os dados que temos reportam-se a estudos com amostras muito pequenas, verificando-se ausência de consensos entre os autores.

Estudos clínicos das diferentes abordagens terapêuticas (quando isoladas) estão a ser desenvolvidos, esperando-se resultados nos próximos anos.

Muito há ainda para explorar neste campo, nomeadamente ao nível da sistematização e comparação de resultados, maximização de cada terapêutica, bem como possível combinação de agentes. Mais estudos são necessários para apurar quais os melhores esquemas de associação para os diferentes tipos de lesão, destacando-se estudos que demonstram que a aplicação de terapêuticas sinergistas nem sempre resulta num ganho acrescido, podendo sim limitar a recuperação, dada a possível competição pelos mesmos mecanismos fisiopatológicos, não permitindo a expressão plena da potencialidade de cada terapêutica e do possível efeito potenciador que a sua administração conjunta poderia apresentar.

No futuro, uma possível abordagem terapêutica dos doentes com lesão medular poderá passar pela implementação, após cirurgia precoce, de uma associação de agentes inibidores do ambiente inibitório (ChABC, antagonistas do Nogo-A e Rho), a estratégias de engenharia dos tecidos/células que permitam o seu transplante por forma a estabelecermos novas “pontes” na lesão e a potenciar os efeitos dos antagonistas anteriormente referidos. Provavelmente associando, ainda, estratégias de reabilitação específicas e desenhadas para cada esquema terapêutico. A associação de modeladores do crescimento axonal e do guidance axonal devem, também, ser consideradas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. National Spinal Cord Injury Statistical Center, Annual Statistical Report for the Spinal Cord Injury Model Systems. University of Alabama at Birmingham. 2007.
2. National Spinal Cord Injury Statistical Center. University of Alabama at Birmingham., Spinal cord injury Facts and figures at a glance. *J Spinal Cord Med*, 31(3):357-8. 2008.
3. Lim, P.A. and A.M. Tow, Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature. *Ann Acad Med Singapore*, 36(1): p. 49-57. 2007.
4. Bracken, M.B., Shepard M.J., Holford T.R., Leo-Summers L., Aldrich E.F. and M. Fazl, Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. *JAMA*, 277(20): p. 1597-604. 1997.
5. Hurlbert, R.J., Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *J Neurosurg*, 93(1 Suppl): p. 1-7. 2000.
6. Hurlbert, R.J. and M.G. Hamilton, Methylprednisolone for acute spinal cord injury: 5-year practice reversal. *Can J Neurol Sci*, 35(1): p. 41-5. 2008.
7. Sayer, F.T., E. Kronvall, and O.G. Nilsson, Methylprednisolone treatment in acute spinal cord injury: the myth challenged through a structured analysis of published literature. *Spine J*, 6(3): p. 335-43. 2006.

8. Short, D.J., W.S. El Masry, and P.W. Jones, High dose methylprednisolone in the management of acute spinal cord injury - a systematic review from a clinical perspective. *Spinal Cord*, 38(5): p. 273-86. 2000.
9. Bandtlow, C.E. and M.E. Schwab, NI-35/250/nogo-a: a neurite growth inhibitor restricting structural plasticity and regeneration of nerve fibers in the adult vertebrate CNS. *Glia*, 29(2): p. 175-81. 2000.
10. Fournier, A.E., Gould G.C., Liu B.P. and S.M. Strittmatter, Truncated soluble Nogo receptor binds Nogo-66 and blocks inhibition of axon growth by myelin. *J Neurosci*, 22(20): p. 8876-83. 2002.
11. GrandPre, T., Nakamura F., Vartanian T. and S.M. Strittmatter, Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature*, 403(6768): p. 439-44. 2000.
12. Kim, W.Y. and W.D. Snider, Neuroscience. Overcoming inhibitions. *Science*, 322(5903): p. 869-72. 2008.
13. Lee, D.H., S.M. Strittmatter, and D.W. Sah, Targeting the Nogo receptor to treat central nervous system injuries. *Nat Rev Drug Discov*, 2(11): p. 872-8. 2003.
14. Chen, M.S., Huber A.B., van der Haar M.E., Frank M., Schnell L. and A.A. Spillmann, Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature*, 403(6768): p. 434-9. 2000.
15. Fawcett, J.W. and R.A. Asher, The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*, 49(6): p. 377-91. 1999.
16. McKeon, R.J., Schreiber R.C., Rudge J.S. and J. Silver, Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci*, 11(11): p. 3398-411. 1991.

17. Mukhopadhyay, G., Doherty P., Walsh F.S., Crocker P.R. and M.T. Filbin, A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron*, 13(3): p. 757-67. 1994; citado em [13] e [41].
18. Lin, R., Kwok J.C., Crespo D. and J.W. Fawcett, Chondroitinase ABC has a long-lasting effect on chondroitin sulphate glycosaminoglycan content in the injured rat brain. *J Neurochem*, 104(2): p. 400-8. 2008.
19. Knafo, S. and D. Choi, Clinical studies in spinal cord injury: moving towards successful trials. *Br J Neurosurg*, 22(1): p. 3-12. 2008.
20. Fawcett, J.W., The glial response to injury and its role in the inhibition of CNS repair. *Adv Exp Med Biol*, 557: p. 11-24. 2006.
21. Rhodes, K.E. and J.W. Fawcett, Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *J Anat*, 204(1): p. 33-48. 2004.
22. Schwab, J.M., Frei E., Klusman I., Schnell L., Schwab M.E. and H.J. Schluesener, AIF-1 expression defines a proliferating and alert microglial/macrophage phenotype following spinal cord injury in rats. *J Neuroimmunol*, 119(2): p. 214-22. 2001.
23. Silver, J. and J.H. Miller, Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*, 5(2): p. 146-56. 2004.
24. Spillmann, A.A., Bandtlow C.E., Lottspeich F., Keller F. AND M.E. Schwab, Identification and characterization of a bovine neurite growth inhibitor (bNI-220). *J Biol Chem*, 273(30): p. 19283-93. 1998.
25. Caroni, P. and M.E. Schwab, Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron*, 1(1): p. 85-96. 1988; citado em [13].

26. Wang, K.C., Koprivica V., Kim J.A., Sivasankaran R., Guo Y. and R.L. Neve, Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature*, 417(6892): p. 941-4. 2002.
27. McKerracher, L., David S., Jackson D.L., Kottis V., Dunn R.J. and P.E. Braun, Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron*, 13(4): p. 805-11. 1994; citado em [13].
28. Kottis, V., Thibault P., Mikol D., Xiao Z.C., Zhang R. and P. Dergham, Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth. *J Neurochem*, 82(6): p. 1566-9. 2002.
29. Filbin, M.T., Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci*, 4(9): p. 703-13. 2003.
30. Goldberg, J.L., Vargas M.E., Wang J.T., Mandemakers W., Oster S.F. and D.W. Sretavan, An oligodendrocyte lineage-specific semaphorin, Sema5A, inhibits axon growth by retinal ganglion cells. *J Neurosci*, 24(21): p. 4989-99. 2004.
31. Moreau-Fauvarque, C., Kumanogoh A., Camand E., Jaillard C., Barbin G. and I. Boquet, The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. *J Neurosci*, 23(27): p. 9229-39. 2003.
32. Jones, L.L., Yamaguchi Y., Stallcup W.B. and M.H. Tuszynski, NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci*, 22(7): p. 2792-803. 2002.
33. Monnier, P.P., Sierra A., Schwab J.M., Henke-Fahle S. and B.K. Mueller, The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with

- the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar. *Mol Cell Neurosci*, 22(3): p. 319-30. 2003.
34. Silver, J., Inhibitory molecules in development and regeneration. *J Neurol*, 242(1 Suppl 1): p. S22-4. 1994.
 35. Silver, J., M.A. Edwards, and P. Levitt, Immunocytochemical demonstration of early appearing astroglial structures that form boundaries and pathways along axon tracts in the fetal brain. *J Comp Neurol*, 328(3): p. 415-36. 1993.
 36. Brittis, P.A., D.R. Canning, and J. Silver, Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina. *Science*, 255(5045): p. 733-6. 1992; citado em [41].
 37. Snow, D.M., Lemmon V., Carrino D.A., Caplan A.I. and J. Silver, Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol*, 109(1): p. 111-30. 1990.
 38. Galtrey, C.M. and J.W. Fawcett, The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev*, 54(1): p. 1-18. 2007.
 39. Pizzorusso, T., Medini P., Berardi N., Chierzi S., Fawcett J.W. and L. Maffei, Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science*, 298(5596): p. 1248-51. 2002.
 40. Shields, L.B., Zhang Y.P., Burke D.A., Gray R. and C.B. Shields, Benefit of chondroitinase ABC on sensory axon regeneration in a laceration model of spinal cord injury in the rat. *Surg Neurol*, 69(6): p. 568-77; discussion 577. 2008.
 41. Iseda, T., Okuda T., Kane-Goldsmith N., Mathew M., Ahmed S. and Chang Y.W., Single, high-dose intraspinal injection of chondroitinase reduces

- glycosaminoglycans in injured spinal cord and promotes corticospinal axonal regrowth after hemisection but not contusion. *J Neurotrauma*, 25(4): p. 334-49. 2008.
42. Davies, S.J., Goucher D.R., Doller C. and J. Silver, Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci*, 19(14): p. 5810-22. 1999.
 43. Jones, L.L., R.U. Margolis, and M.H. Tuszynski, The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp Neurol*, 182(2): p. 399-411. 2003.
 44. Jones, L.L. and M.H. Tuszynski, Spinal cord injury elicits expression of keratan sulfate proteoglycans by macrophages, reactive microglia, and oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci*, 22(11): p. 4611-24. 2002.
 45. Galtrey, C.M., Asher R.A., Nothias F. and J.W. Fawcett, Promoting plasticity in the spinal cord with chondroitinase improves functional recovery after peripheral nerve repair. *Brain*, 130(Pt 4): p. 926-39. 2007.
 46. Bradbury, E.J., Moon L.D., Popat R.J., King V.R., Bennett G.S. and P.N. Patel, Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, 416(6881): p. 636-40. 2002.
 47. Fitch, M.T. and J. Silver, Glial cell extracellular matrix: boundaries for axon growth in development and regeneration. *Cell Tissue Res*, 290(2): p. 379-84. 1997.
 48. Lemons, M.L., D.R. Howland, and D.K. Anderson, Chondroitin sulfate proteoglycan immunoreactivity increases following spinal cord injury and transplantation. *Exp Neurol*, 160(1): p. 51-65. 1999.

49. Plant, G.W., M.L. Bates, and M.B. Bunge, Inhibitory proteoglycan immunoreactivity is higher at the caudal than the rostral Schwann cell graft-transected spinal cord interface. *Mol Cell Neurosci*, 17(3): p. 471-87. 2001.
50. Houle, J.D., Amin A., Cote M.P., Lemay M., Miller K. and H. Sandrow, Combining an autologous peripheral nervous system "bridge" and matrix modification by chondroitinase allows robust, functional regeneration beyond a hemisection lesion of the adult rat spinal cord. *J Neurosci*, 26(28): p. 7405-15. 2006.
51. Moon, L.D., Asher R.A., Rhodes K.E. and J.W. Fawcett, Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. *Nat Neurosci*, 4(5): p. 465-6. 2001.
52. Tom, V.J., Kadakia R., Santi L. and J.D. Houle, Administration of chondroitinase ABC rostral or caudal to a spinal cord injury site promotes anatomical but not functional plasticity. *J Neurotrauma*, 26(12): p. 2323-33. 2009.
53. Caggiano, A.O., Zimmer M.P., Ganguly A., Blight A.R. and E.A. Gruskin, Chondroitinase ABCI improves locomotion and bladder function following contusion injury of the rat spinal cord. *J Neurotrauma*, 22(2): p. 226-39. 2005.
54. Fawcett, J.W., Overcoming inhibition in the damaged spinal cord. *J Neurotrauma*, 23(3-4): p. 371-83. 2006.
55. Fouad, K., Schnell L., Bunge M.B., Schwab M.E., Liebscher T. and D.D. Pearce, Combining Schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord. *J Neurosci*, 25(5): p. 1169-78. 2005.

56. Massey, J.M., Hubscher C.H., Wagoner M.R., Decker J.A., Amps J. and J. Silver, Chondroitinase ABC digestion of the perineuronal net promotes functional collateral sprouting in the cuneate nucleus after cervical spinal cord injury. *J Neurosci*, 26(16): p. 4406-14. 2006.
57. Tester, N.J. and D.R. Howland, Chondroitinase ABC improves basic and skilled locomotion in spinal cord injured cats. *Exp Neurol*, 209(2): p. 483-96. 2008.
58. Properzi, F., R.A. Asher, and J.W. Fawcett, Chondroitin sulphate proteoglycans in the central nervous system: changes and synthesis after injury. *Biochem Soc Trans*, 31(2): p. 335-6. 2003.
59. Siegenthaler, M.M., M.K. Tu, and H.S. Keirstead, The extent of myelin pathology differs following contusion and transection spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 24(10): p. 1631-46. 2007.
60. Donnelly, D.J. and P.G. Popovich, Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol*, 209(2): p. 378-88. 2008.
61. Gensel, J.C., Nakamura S., Guan Z., van Rooijen N., Ankeny D.P. and P.G. Popovich, Macrophages promote axon regeneration with concurrent neurotoxicity. *J Neurosci*, 29(12): p. 3956-68. 2009.
62. Huang, W.C., Kuo W.C., Hsu S.H., Cheng C.H., Liu J.C. and H. Cheng, Gait analysis of spinal cord injured rats after delivery of chondroitinase ABC and adult olfactory mucosa progenitor cell transplantation. *Neurosci Lett*, 472(2): p. 79-84. 2010.
63. Li, H.P., Homma A., Sango K., Kawamura K., Raisman G. and H. Kawano, Regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons by degradation of chondroitin

- sulfate is accompanied by elimination of the fibrotic scar and glia limitans in the lesion site. *J Neurosci Res*, 85(3): p. 536-47. 2007.
64. Tester, N.J., A.H. Plaas, and D.R. Howland, Effect of body temperature on chondroitinase ABC's ability to cleave chondroitin sulfate glycosaminoglycans. *J Neurosci Res*, 85(5): p. 1110-8. 2007.
65. Deepa, S.S., Carulli D., Galtrey C., Rhodes K., Fukuda J. and T. Mikami, Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J Biol Chem*, 281(26): p. 17789-800. 2006.
66. Asher, R.A., Morgenstern D.A., Fidler P.S., Adcock K.H., Oohira A. and J.E. Braistead, Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J Neurosci*, 20(7): p. 2427-38. 2000.
67. McKeon, R.J., M.J. Juryec, and C.R. Buck, The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci*, 19(24): p. 10778-88. 1999.
68. Barritt, A.W., Davies M., Marchand F., Hartley R., Grist J. and P. Yip, Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. *J Neurosci*, 26(42): p. 10856-67. 2006.
69. Bareyre, F.M., Kerschensteiner M., Raineteau O., Mettenleiter T.C., Weinmann O. and M.E. Schwab, The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nat Neurosci*, 7(3): p. 269-77. 2004.
70. Courtine, G., Song B., Roy R.R., Zhong H., Herrmann J.E. and Y. Ao, Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. *Nat Med*, 14(1): p. 69-74. 2008.

71. Jordan, L.M., Liu J., Hedlund P.B., Akay T. and K.G. Pearson, Descending command systems for the initiation of locomotion in mammals. *Brain Res Rev*, 57(1): p. 183-91. 2008.
72. Kim, B.G., Dai H.N., Lynskey J.V., McAtee M. and B.S. Bregman, Degradation of chondroitin sulfate proteoglycans potentiates transplant-mediated axonal remodeling and functional recovery after spinal cord injury in adult rats. *J Comp Neurol*, 497(2): p. 182-98. 2006.
73. Bruckner, G., Bringmann A., Hartig W., Koppe G., Delpech B. and K. Brauer K, Acute and long-lasting changes in extracellular-matrix chondroitin-sulphate proteoglycans induced by injection of chondroitinase ABC in the adult rat brain. *Exp Brain Res*, 121(3): p. 300-10. 1998.
74. Sasaki, M., Li B., Lankford K.L., Radtke C. and J.D. Kocsis, Remyelination of the injured spinal cord. *Prog Brain Res*, 161: p. 419-33. 2007.
75. Basso, D.M., Beattie M.S. and Bresnahan J.C., Graded Histological and Locomotor Outcomes after Spinal Cord Contusion Using the NYU Weight-Drop Device versus Transection. *Exp Neurol*, 139(,): p. 244–256. 1996.
76. Kim, J.E., Li S., GrandPre T., Qiu D. and S.M. Strittmatter, Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B. *Neuron*, 38(2): p. 187-99. 2003.
77. Oertle, T., van der Haar M.E., Bandtlow C.E., Robeva A., Burfeind P. and A. Buss, Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *J Neurosci*, 23(13): p. 5393-406. 2003.
78. Fournier, A.E., T. GrandPre, and S.M. Strittmatter, Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature*, 409(6818): p. 341-6. 2001.

79. Wang, X., Chun S.J., Treloar H., Vartanian T., Greer C.A. and S.M. Strittmatter, Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *J Neurosci*, 22(13): p. 5505-15. 2002.
80. Huber, A.B. and M.E. Schwab, Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration. *Biol Chem*, 381(5-6): p. 407-19. 2000.
81. Bandtlow, C., T. Zachleder, and M.E. Schwab, Oligodendrocytes arrest neurite growth by contact inhibition. *J Neurosci*, 10(12): p. 3837-48. 1990.
82. Savio, T. and M.E. Schwab, Rat CNS white matter, but not gray matter, is nonpermissive for neuronal cell adhesion and fiber outgrowth. *J Neurosci*, 9(4): p. 1126-33. 1989.
83. Schwab, M.E. and P. Caroni, Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J Neurosci*, 8(7): p. 2381-93. 1988.
84. Merkler, D., Metz G.A., Raineteau O., Dietz V., Schwab M.E. and K. Fouad., Locomotor recovery in spinal cord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A. *J Neurosci*, 21(10): p. 3665-73. 2001.
85. Brosamle, C., Huber A.B., Fiedler M., Skerra A. and M.E. Schwab, Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat induced by a recombinant, humanized IN-1 antibody fragment. *J Neurosci*, 20(21): p. 8061-8. 2000.
86. Weinmann, O., Schnell L., Ghosh A., Montani L., Wiessner C. and T. Wannier, Intrathecally infused antibodies against Nogo-A penetrate the CNS and downregulate the endogenous neurite growth inhibitor Nogo-A. *Mol Cell Neurosci*, 32(1-2): p. 161-73. 2006.

87. Thallmair, M., Metz G.A., Z'Graggen W.J., Raineteau O., Kartje G.L. and M.E. Schwab, Neurite growth inhibitors restrict plasticity and functional recovery following corticospinal tract lesions. *Nat Neurosci*, 1(2): p. 124-31. 1998.
88. Buchli, A.D., Rouiller E., Mueller R., Dietz V. and M.E. Schwab, Repair of the injured spinal cord. A joint approach of basic and clinical research. *Neurodegener Dis*, 4(1): p. 51-6. 2007.
89. Liebscher, T., Schnell L., Schnell D., Scholl J., Schneider R. and M. Gulló, Nogo-A antibody improves regeneration and locomotion of spinal cord-injured rats. *Ann Neurol*, 58(5): p. 706-19. 2005.
90. Schwab, M.E., Nogo and axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol*, 14(1): p. 118-24. 2004.
91. Ughrin, Y.M., Z.J. Chen, and J.M. Levine, Multiple regions of the NG2 proteoglycan inhibit neurite growth and induce growth cone collapse. *J Neurosci*, 23(1): p. 175-86. 2003.
92. Wang, K.C., Kim J.A., Sivasankaran R., Segal R. and Z. He, P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature*, 420(6911): p. 74-8. 2002.
93. European Agency, Recombinant human monoclonal antibody to human Nogo-A protein of the IgG 4/K class for the treatment of spinal cord injury. 2009.
94. Maier, I.C., Ichiyama R.M., Courtine G., Schnell L., Lavrov I. and V.R. Edgerton, Differential effects of anti-Nogo-A antibody treatment and treadmill training in rats with incomplete spinal cord injury. *Brain*, 132(Pt 6): p. 1426-40. 2009.

95. Domeniconi, M., Cao Z., Spencer T., Sivasankaran R., Wang K. and E. Nikulina, Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron*, 35(2): p. 283-90. 2002.
96. Liu, B.P., Fournier A., GrandPre T. and S.M. Strittmatter, Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science*, 297(5584): p. 1190-3. 2002.
97. Li, S., Liu B.P., Budel S., Li M., Ji B. and L. Walus, Blockade of Nogo-66, myelin-associated glycoprotein, and oligodendrocyte myelin glycoprotein by soluble Nogo-66 receptor promotes axonal sprouting and recovery after spinal injury. *J Neurosci*, 24(46): p. 10511-20. 2004.
98. Li, W., Walus L., Rabacchi S.A., Jirik A., Chang E. and J. Schauer J, A neutralizing anti-Nogo66 receptor monoclonal antibody reverses inhibition of neurite outgrowth by central nervous system myelin. *J Biol Chem*, 279(42): p. 43780-8. 2004.
99. GrandPre, T., S. Li, and S.M. Strittmatter, Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature*, 417(6888): p. 547-51. 2002.
100. Li, S. and S.M. Strittmatter, Delayed systemic Nogo-66 receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury. *J Neurosci*, 23(10): p. 4219-27. 2003.
101. Schnell, L., Fearn S., Klassen H., Schwab M.E. and V.H. Perry, Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur J Neurosci*, 11(10): p. 3648-58. 1999.
102. Li, S., Kim J.E., Budel S., Hampton T.G. and S.M. Strittmatter, Transgenic inhibition of Nogo-66 receptor function allows axonal sprouting and improved locomotion after spinal injury. *Mol Cell Neurosci*, 29(1): p. 26-39. 2005.

103. Beattie, M.S., Harrington A.W., Lee R., Kim J.Y., Boyce S.L. and F.M. Longo, ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron*, 36(3): p. 375-86. 2002.
104. Dechant, G. and Y.A. Barde, The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci*, 5(11): p. 1131-6. 2002.
105. Cosgaya, J.M., J.R. Chan, and E.M. Shooter, The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination. *Science*, 298(5596): p. 1245-8. 2002.
106. Zhou, X.F. and H.Y. Li, Roles of glial p75NTR in axonal regeneration. *J Neurosci Res*, 85(8): p. 1601-5. 2007.
107. DeFreitas, M.F., P.S. McQuillen, and C.J. Shatz, A novel p75NTR signaling pathway promotes survival, not death, of immunopurified neocortical subplate neurons. *J Neurosci*, 21(14): p. 5121-9. 2001.
108. Yamashita, T., K.L. Tucker, and Y.A. Barde, Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron*, 24(3): p. 585-93. 1999.
109. Schmidt, A. and A. Hall, Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev*, 16(13): p. 1587-609. 2002.
110. Dillon, S.T. and L.A. Feig, Purification and assay of recombinant C3 transferase. *Methods Enzymol*, 256: p. 174-84. 1995; citado em [112].
111. McKerracher, L. and H. Higuchi, Targeting Rho to stimulate repair after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 23(3-4): p. 309-17. 2006.

112. Dergham, P., Ellezam B., Essagian C., Avedissian H., Lubell W.D. and L. McKerracher Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci*, 22(15): p. 6570-7. 2002.
113. Fournier, A.E., B.T. Takizawa, and S.M. Strittmatter, Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J Neurosci*, 23(4): p. 1416-23. 2003.
114. Niederost, B., Oertle T., Fritsche J., McKinney R.A. and C.E. Bandtlow, Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *J Neurosci*, 22(23): p. 10368-76. 2002.
115. Uehata, M., Ishizaki T., Satoh H., Ono T., Kawahara T. and T. Morishita, Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, 389(6654): p. 990-4. 1997.
116. Basso, D.M., M.S. Beattie, and J.C. Bresnahan, A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*, 12(1): p. 1-21. 1995.
117. Dubreuil, C.I., M.J. Winton, and L. McKerracher, Rho activation patterns after spinal cord injury and the role of activated Rho in apoptosis in the central nervous system. *J Cell Biol*, 162(2): p. 233-43. 2003.
118. Baptiste, D.C., A. Tighe, and M.G. Fehlings, Spinal cord injury and neural repair: focus on neuroregenerative approaches for spinal cord injury. *Expert Opin Investig Drugs*, 18(5): p. 663-73. 2009.
119. Furuya, T., Ishizaki T., Satoh H., Ono T., Kawahara T. and T. Morishita, Treatment of rat spinal cord injury with a Rho-kinase inhibitor and bone marrow stromal cell transplantation. *Brain Res*, 1295: p. 192-202. 2009.

120. Eftekharpour, E., S. Karimi-Abdolrezaee, and M.G. Fehlings, Current status of experimental cell replacement approaches to spinal cord injury. *Neurosurg Focus*, 24(3-4): p. E19. 2008.
121. Novikova, L.N., L.N. Novikov, and J.O. Kellerth, Differential effects of neurotrophins on neuronal survival and axonal regeneration after spinal cord injury in adult rats. *J Comp Neurol*, 452(3): p. 255-63. 2002.
122. Lee, Y.S., I. Hsiao, and V.W. Lin, Peripheral nerve grafts and aFGF restore partial hindlimb function in adult paraplegic rats. *J Neurotrauma*, 19(10): p. 1203-16. 2002.
123. Cheng, H., Liao K.K., Liao S.F., Chuang T.Y. and Y.H. Shih, Spinal cord repair with acidic fibroblast growth factor as a treatment for a patient with chronic paraplegia. *Spine (Phila Pa 1976)*, 29(14): p. E284-8. 2004.
124. Steeves, J., J. Fawcett, and M. Tuszynski, Report of international clinical trials workshop on spinal cord injury February 20-21, Vancouver, Canada. *Spinal Cord*, 2004. 42(10): p. 591-7. 2004.
125. Xu, X.M. and S.M. Onifer, Transplantation-mediated strategies to promote axonal regeneration following spinal cord injury. *Respir Physiol Neurobiol*, 169(2): p. 171-82. 2009.
126. Koda, M., Okada S., Nakayama T., Koshizuka S., Kamada T. and Y. Nishio, Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice. *Neuroreport*, 16(16): p. 1763-7. 2005.
127. Koshizuka, S., Okada S., Okawa A., Koda M., Murasawa M. and M. Hashimoto, Transplanted hematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineage cells and promote functional recovery after spinal cord injury in mice. *J Neuropathol Exp Neurol*, 63(1): p. 64-72. 2004.

128. Bunge, M.B., Novel combination strategies to repair the injured mammalian spinal cord. *J Spinal Cord Med*, 31(3): p. 262-9. 2008.
129. Oudega, M. and X.M. Xu, Schwann cell transplantation for repair of the adult spinal cord. *J Neurotrauma*, 23(3-4): p. 453-67. 2006.
130. Saberi, H., Moshayedi P., Aghayan H.R., Arjmand B., Hosseini S.K. and S.H. Emami-Razavi, Treatment of chronic thoracic spinal cord injury patients with autologous Schwann cell transplantation: an interim report on safety considerations and possible outcomes. *Neurosci Lett*, 443(1): p. 46-50. 2008.
131. Lu, J., Feron F., Mackay-Sim A. and P.M. Waite, Olfactory ensheathing cells promote locomotor recovery after delayed transplantation into transected spinal cord. *Brain*, 125(Pt 1): p. 14-21. 2002.
132. Li, Y., P. Decherchi, and G. Raisman, Transplantation of olfactory ensheathing cells into spinal cord lesions restores breathing and climbing. *J Neurosci*, 23(3): p. 727-31. 2003.
133. Lu, J., Feron F., Ho S.M., Mackay-Sim A. and P.M. Waite, Transplantation of nasal olfactory tissue promotes partial recovery in paraplegic adult rats. *Brain Res*, 889(1-2): p. 344-57. 2001.
134. Li, Y., Field P.M., and G. Raisman, Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science*, 277(5334): p. 2000-2. 1997.
135. Fouad, K., Pearse D.D., Tetzlaff W. and R. Vavrek, Transplantation and repair: combined cell implantation and chondroitinase delivery prevents deterioration of bladder function in rats with complete spinal cord injury. *Spinal Cord*, 47(10): p. 727-32. 2009.

136. Lima, C., Pratas-Vital J., Escada P., Hasse-Ferreira A., Capucho C. and J.D. Peduzzi, Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study. *J Spinal Cord Med*, 29(3): p. 191-203. 2006.
137. Ma, Z., Cao Q., Zhang L., Hu J., Howard R.M. and P. Lu, Oligodendrocyte precursor cells differentially expressing Nogo-A but not MAG are more permissive to neurite outgrowth than mature oligodendrocytes. *Exp Neurol*, 217(1): p. 184-96. 2009.
138. Keirstead, H.S., Nistor G., Bernal G., Totoiu M., Cloutier F. and K. Sharp, Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci*, 25(19): p. 4694-705. 2005.
139. Furlan, J.C., Noonan V., Cadotte D.W. and M.G. Fehlings, Timing of Decompressive Surgery of Spinal Cord after Traumatic Spinal Cord Injury: An Evidence-Based Examination of Pre-Clinical and Clinical Studies. *J Neurotrauma*, 27: p. 1-29. 2010.
140. Bagnall, A.M., Jones L., Duffy S. and R.P. Riemsma, Spinal fixation surgery for acute traumatic spinal cord injury. *Cochrane Database Syst Rev*, (1): p. CD004725. 2008.
141. Xu, K., Chen Q.X., Li F.C., Chen W.S., Lin M. and Q.W. Wu, Spinal cord decompression reduces rat neural cell apoptosis secondary to spinal cord injury. *J Zhejiang Univ Sci B*, 10(3): p. 180-7. 2009.
142. Crowe, M.J., Bresnahan J.C., Shuman S.L., Masters J.N. and M.S. Beattie, Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med*, 3(1): p. 73-6. 1997.

143. Emery, E., Aldana P., Bunge M.B., Puckett W., Srinivasan A. and R.W. Keane, Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg*, 89(6): p. 911-20. 1998.
144. Shuman, S.L., J.C. Bresnahan, and M.S. Beattie, Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. *J Neurosci Res*, 50(5): p. 798-808. 1997.
145. Saito, N., Yamamoto T., Watanabe T., Abe Y. and T. Kumagai, Implications of p53 protein expression in experimental spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 17(2): p. 173-82. 2000.
146. Springer, J.E., R.D. Azbill, and P.E. Knapp, Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nat Med*, 5(8): p. 943-6. 1999.
147. Wada, S., Yone K., Ishidou Y., Nagamine T., Nakahara S. and T. Niiyama, Apoptosis following spinal cord injury in rats and preventative effect of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *J Neurosurg*, 91(1 Suppl): p. 98-104. 1999.
148. Fehlings, M.G. and R.G. Perrin, The timing of surgical intervention in the treatment of spinal cord injury: a systematic review of recent clinical evidence. *Spine (Phila Pa 1976)*, 31(11 Suppl): p. S28-35; discussion S36. 2006.
149. Baptiste, D.C. and M.G. Fehlings, Update on the treatment of spinal cord injury. *Prog Brain Res*, 161: p. 217-33. 2007.