

Myrna A. R. Dent

Daño y reparación del sistema nervioso
Ciencia Ergo Sum, vol. 10, núm. 1, marzo, 2003
Universidad Autónoma del Estado de México
México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10410108>



Ciencia Ergo Sum,
ISSN (Versión impresa): 1405-0269
ciencia.ergosum@yahoo.com.mx
Universidad Autónoma del Estado de México
México

¿Cómo citar?

Fascículo completo

Más información del artículo

Página de la revista

www.redalyc.org

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Daño y reparación del sistema nervioso

Myrna A. R. Dent*

Recepción: diciembre 2 de 2002
Aceptación: enero 15 de 2003

* Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Tollocan y Jesús Carranza, Toluca, Estado de México. C. P. 50180.
Teléfono: (722) 2 17 35 52, fax: 2 17 41 42.
Correo electrónico: md@uaemex.mx

Resumen. El trabajo pionero de Ramón y Cajal de principios del siglo pasado demostró que los axones de las neuronas son intrínsecamente capaces de regenerarse. Aguayo replicó este trabajo 70 años después, confirmando que las neuronas del sistema nervioso central (SNC) se regeneran siempre y cuando se encuentren en el medio ambiente adecuado, como sucede con las neuronas del sistema nervioso periférico (SNP). Desde entonces, se ha tratado de elucidar los mecanismos celulares y moleculares responsables de permitir la regeneración en el SNC y en el SNP, así como determinar los componentes medio ambientales que son hostiles para la regeneración de los axones. Esta revisión presenta los avances experimentales y conceptos desarrollados en los últimos años, para tratar de reparar el SNC después de que ha sufrido una lesión. No obstante todos los avances recientes en el campo, obtener una evidencia clara y contundente de regeneración funcional del SNC en adultos todavía está pendiente.

Palabras clave: médula espinal, regeneración, crecimiento axonal.

Damage and Reparation of the Nervous System

Abstract. At the early part of the last century, the pioneering work of Ramon y Cajal demonstrated that the axons of central nervous system (CNS) neurons are intrinsically able to regenerate. Seventy years later, Aguayo replicated this work confirming that CNS neurons regenerate if they are provided with the right environment, as it is with neurons in the peripheral nervous system (PNS). Since then, intensive work has focused on determining the cellular and molecular mechanisms responsible for supporting regeneration both in the CNS and PNS; as well as determining which components of the central nervous system environment may be hostile to axon regeneration. This review provides an overview of the experimental advances and concepts that have been achieved during recent years in the repair of the CNS after injury. Notwithstanding these recent advances in the field, clear and conclusive evidence for functional regeneration in the adult CNS remains to be shown.

Key words: spinal cord, regeneration, axonal growth.

Introducción

Uno de los grandes problemas en la neurobiología es la incapacidad regenerativa de los axones en el sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados superiores. En contraste con el SNC, el sistema nervioso periférico (SNP) presenta vigorosa regeneración axonal, tanto en los mamíferos adultos como en todos los otros vertebrados. Asimismo, los vertebrados

inferiores como peces y anfibios son capaces de restaurar exitosamente la conectividad y la función de los axones dañados, tanto en el SNC como en el SNP (Horner y Gage, 2000). Cuando los tejidos neurales en el SNC sufren daño, la función se pierde cuando se destruyen las células o se interrumpe la comunicación de las fibras nerviosas, lo cual conlleva a una cascada de eventos que puede terminar en la muerte celular. Debido a que las neuronas no son reemplazadas en

los mamíferos adultos, la recuperación de la función depende de que vuelvan a crecer los axones de las neuronas dañadas y formen las conexiones adecuadas. Sin embargo, el crecimiento de los axones es muy limitado y muchas de las funciones bloqueadas por el daño en el cerebro o en la médula espinal son permanentes. Así, las personas con lesiones en la médula espinal quedan paraplégicas (sin movimiento de las piernas), o tetraplégicas (sin movimiento de brazos y piernas) dependiendo del daño que hayan sufrido.

Las lesiones de la médula espinal se mencionan desde la antigüedad en los papiros de Edwin Smith, alrededor del 2500 a.C., en los cuales un médico egipcio describe con precisión las características clínicas de la tetraplegia traumática y menciona el terrible diagnóstico de “un padecimiento que no puede ser tratado” (Grundy y Swain, 1993). Durante la Primera Guerra Mundial, 90% de los pacientes que sufrieron lesiones espinales murieron antes de un año y sólo el 1% sobrevivió más de 20 años. Actualmente, un mejor entendimiento y cuidado de las lesiones de la médula espinal ha reducido la mortalidad y a una mayor incidencia de daño parcial en la médula espinal en aquellos que la sobreviven. Sin embargo, las lesiones de la médula espinal aún son devastadoras, tanto para el paciente como para los familiares y amigos. Se calcula que alrededor de 5 de cada 100 mil habitantes sufre este tipo de lesión en Estados Unidos y cifras similares se reportan en otros países, los cuales en su mayoría son adultos jóvenes (Olson, 2002). En Inglaterra, las principales causas reportadas por lesiones de médula espinal son por accidentes automovilísticos (51.5%), seguidos por accidentes domésticos e industriales (27%), accidentes deportivos (16%), violencia (5%), e incidentes mayores como el desplome de un avión (0.5%) (Grundy y Swain, 1993). Estas cifras varían dependiendo de cada país, por ejemplo en Estados Unidos las lesiones por violencia son mayores.

Los experimentos realizados por el neuroanatomista español Santiago Ramón y Cajal (1928), mostraron que después de una lesión las fibras dañadas en la médula espinal adulta empiezan a crecer y ramificarse por un cierto tiempo, pero después estos brotes se paralizan por los obstáculos insuperables con que se encuentran, hasta que se retraen y desaparecen. Es decir, que la condición traumática es suficiente para sacar a los axones de su ‘letargo’, ya que las neuronas intentan regenerarse mostrando conos de crecimiento y



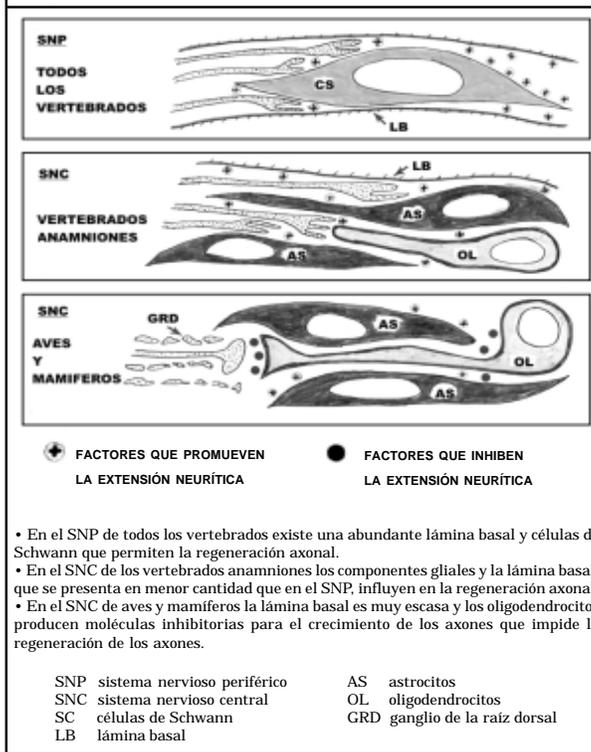
Santiago Ramón y Cajal

arborizaciones. De acuerdo con Ramón y Cajal, esta condición se frustra primero por la falta de sustancias capaces de generar una vigorosa capacidad de crecimiento, y segundo, por la ausencia de sustancias capaces de atraer y dirigir a los axones a sus destinos. En 1911 Tello llevó a cabo unos experimentos en el laboratorio de Ramón y Cajal y reportados por éste en 1928. Estos experimentos mostraron que cuando se cortaba profundamente la corteza cerebral y se transplantaba un pedazo de nervio ciático previamente dañado entre 8 a 12 días antes, se observaba que fibras de varios puntos de la corteza convergían y pene-

traban en el trasplante a los 12 a 14 días. Sin embargo, a los 40 días el trasplante disminuía de volumen, se encontraba penetrado por tejido conectivo y en proceso de atrofia y reabsorción, posiblemente porque las sustancias tróficas habían dejado de secretarse. Por lo tanto, ellos concluyeron que “estos experimentos confirman que el crecimiento de los axones depende de la presencia de una comida especial, la cual es producida en proporciones efectivas únicamente por las células de Schwann de los nervios”. Es decir, se demostró que la neuronas pueden crecer si se encuentran en un medio ambiente permisivo, como es el nervio ciático.

A pesar de todos estos trabajos, la idea general de que las neuronas eran incapaces de regenerarse persistió por 70 años, hasta que los trabajos clásicos de Aguayo y colaboradores en 1980 replicaron estos estudios con nuevos métodos y transformaron esta visión. Inicialmente transplantaron células gliales del SNC en los nervios periféricos, mostrando que a pesar de que los axones del SNP tienen capacidad de regenerarse, las células gliales del SNC transplantadas evitan el crecimiento de las fibras neuronales del SNP. Después transplantaron segmentos de nervio periférico en la médula espinal transectada del SNC de ratas adultas, observando que los axones de las neuronas maduras eran capaces de crecer en los componentes del SNP, usando al nervio como guía (Richardson *et al.*, 1980). Subsecuentemente, segmentos de nervio periférico fueron usados como ‘puentes’ entre dos segmentos de médula, observando que las neuronas incapaces de crecer unos pocos milímetros en el SNC extendían sus axones por aproximadamente 30 centímetros en los nervios del SNP (David y Aguayo, 1981). Estos resultados mostraron el potencial regenerativo de las neuronas del SNC cuando el medio ambiente glial se cambia por el del SNP, es decir, confirmaron los trabajos de Tello y Cajal, demostrando que la incapacidad de

Figura 1. Factores que influyen en la capacidad de regeneración de los axones en el SNP y SNC en varios vertebrados.



regenerarse de los axones del SNC no es debido a su inhabilidad intrínseca, sino a la naturaleza no permisiva del medio ambiente, en el cual los componentes neurogliales y el parénquima densamente empacado del SNC son hostiles para la regeneración. Es decir, que las condiciones favorables que permiten o promueven el elongamiento axonal durante el desarrollo no están presentes en el medio ambiente de los vertebrados superiores adultos. En los últimos 22 años, mucho progreso se ha hecho al tratar de identificar los elementos responsables de las diferencias entre el SNC y el SNP, y en los últimos años las bases moleculares y celulares de las respuestas regenerativas comparadas con las no regenerativas se han empezado a vislumbrar.

1. ¿Qué distingue al SNP del SNC que lo hace permisible al crecimiento axonal?

Además de las neuronas, el SNC se encuentra constituido por una lámina basal muy reducida y diferentes tipos de células gliales conocidos como oligodendrocitos, astrocitos y microglia. En contraste, el SNP contiene una abundante matriz extracelular y dos tipos de células gliales, que son las células de Schwann que forman y que no forman mielina (figura 1). Los oligodendrocitos y las células de Schwann

producen mielina en el SNC y SNP respectivamente, que consiste de una extensión de la membrana plasmática de estas células que envuelve a los axones. Aunque morfológicamente la mielina en ambos sistemas parece ser idéntica, emplean moléculas y métodos diferentes, aunque semejantes. Mientras que las células de Schwann sólo envuelven a un axón por célula, en el SNC un solo oligodendrocito envuelve a múltiples axones (Hudson, 1990). Asimismo, las células de Schwann son totalmente dependientes tanto del contacto como de las señales axonales, es decir, si la comunicación con el axón se bloquea o desaparece, las células de Schwann se desdiferencian. Por otra parte, los oligodendrocitos no son tan dependientes del contacto neuronal y por lo tanto no presentan la plasticidad de las células de Schwann de desdiferenciarse. Otra diferencia importante son las proteínas de la mielina que varían entre ambos sistemas. Las proteínas proteolípicas (PLP) y las proteínas básicas de mielina (MBP) corresponden a 50% y 30%, respectivamente, de las proteínas de la mielina del SNC. En tanto que en el SNC la glicoproteína Po, que no está presente en el SNC, corresponde a 50% de las proteínas de mielina. PLP y MBP también se encuentran en el SNP en una proporción de 5% a 15%, pero no son esenciales para la mielina normal del SNP (*ibid.*).

2. Las bases celulares de la regeneración del nervio periférico

Cuando se produce daño en los nervios periféricos, los axones y la mielina asociada con ellos se degenera (degeneración walleriana). Estos restos celulares son removidos por las células de Schwann y por los macrófagos invasores. Los macrófagos a su vez producen factores mitogénicos que permiten que las células de Schwann sobrevivientes proliferen sobre los tubos de la membrana basal que rodean las fibras nerviosas originales. Estos tubos formados por células de Schwann y rodeadas de lámina basal sin axones se conocen como bandas de Büngner que Cajal describió como 'el cordón tutorial'.

Otros investigadores de principios del siglo XX atribuyeron a la falta de capacidad regenerativa del SNC la ausencia de células de Schwann en este sistema. Sin embargo, varios experimentos han mostrado que para crecer, los axones requieren no sólo estar acompañados de las células de Schwann, sino que ciertos componentes de la lámina basal (laminina, colágena tipo IV, entactina y otros) son también potentes promotores del crecimiento de las neuritas (Ide *et al.*, 1983). Esto se ha demostrado con un pedazo de nervio periférico que se congela y se descongela, de manera que las células de Schwann se mueren, pero la lámina basal que las rodea permanece intacta. Cuando el nervio tratado de

esta manera se transplanta al muñón proximal de un nervio axotomizado de otro animal, los axones se regeneran a través del nervio transplantado pero sólo por una corta distancia. Estos axones migran acompañados de las células de Schwann presentes en el muñón del nervio proximal. Por otro lado, si las células de Schwann presentes en el nervio proximal se inactivan con agentes citotóxicos, se observa en los axones muy poca o ninguna regeneración. De la misma manera, si la lámina basal se desnaturaliza por calor, además de congelarla y descongelarla, los axones no penetran en el trasplante hasta que las células de Schwann migran primero del nervio proximal a los remanentes extracelulares del trasplante (Sketelj *et al.*, 1989). Experimentos *in vitro* son también ilustrativos: cuando las células de Schwann crecen en condiciones que no forman la lámina basal, son capaces de promover el crecimiento axonal de las neuronas periféricas. De la misma forma, cuando las células de Schwann crecen en condiciones que depositan lámina basal al medio y después se remueven, la matriz extracelular que las células generaron sobre las cajas de cultivo es también eficaz en promover el crecimiento axonal de las neuronas del SNP. En conclusión, estos experimentos demuestran que tanto las células de Schwann como la lámina basal son importantes en promover una regeneración axonal exitosa en el SNP.

3. Regeneración en vertebrados anamniones y algunos reptiles

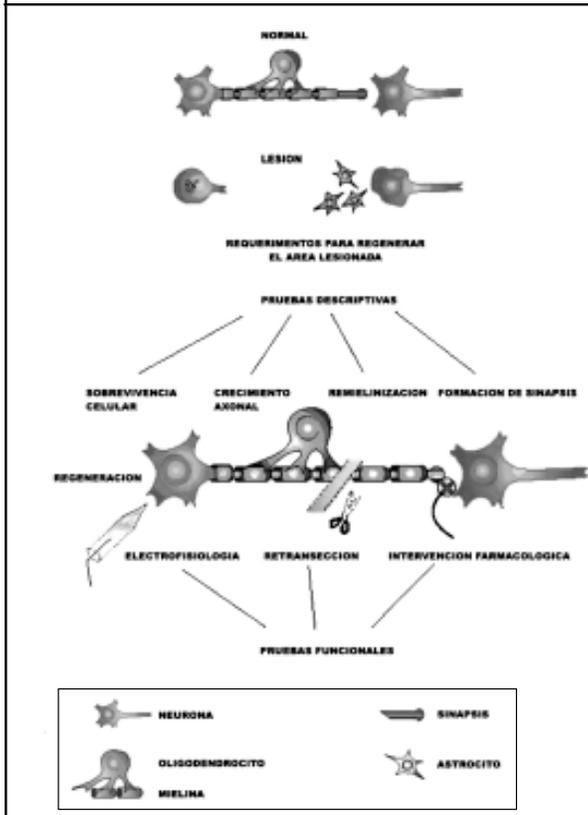
Mientras que la capacidad de regeneración del nervio periférico parece ser universal a través de todos los órdenes de vertebrados, esto no es equivalente para el SNC. Los vertebrados anamniones (peces y anfibios) así como algunos reptiles exhiben en diferentes grados una notable capacidad de regeneración de los axones lesionados del SNC, lo que los distingue de aves y mamíferos. Por ejemplo, cuando la médula espinal es transectada en el pez dorado (*Carassius auratus*) de un adulto, ésta recupera su función normal aunque anatómicamente los tractos regenerados son imperfectos y algunos axones como los de Mauthner no se regeneran (Coggeshall y Youngblood, 1983). En los anfibios urodelos (lagartijas acuáticas), las células epéndimas producen un nuevo tubo neural cuando la cola se les amputa. Estas células se diferencian posteriormente en neuronas y glía, reconstituyendo progresivamente la médula espinal en la regeneración de la cola. Cuando se le amputa la cola a la lagartija *Anolis carolinensis*, un nuevo tubo neural consistente de células epéndimas derivadas del canal central de la médula espinal se genera, las cuales no se diferencian en

neuronas, sino que guían y sustentan la regeneración de los axones que se originan de las neuronas sobrevivientes (Simpson, 1968). No se sabe qué papel juegan las células gliales en estos eventos, o si las células epéndimas adquieren características de células gliales. La regeneración de la médula espinal transectada no se ha estudiado en reptiles y no ocurre en anuros (ranas) adultos. Sin embargo, el sistema visual, tanto del pez dorado como de los urodelos y anuros, es un ejemplo clásico de regeneración del SNC (Maturana *et al.*, 1959). Las proyecciones normales retinotectales se reconstituyen después de que ocurre una transección o cuando se presiona el nervio óptico, dando como resultado una total recuperación de la visión normal. Para que se lleve a cabo esta recuperación después de que se produce una axotomía, se requiere que las células ganglionares retinales sobrevivan y generen nuevas neuritas. Estas neuritas deben atravesar el medio ambiente glial del nervio óptico, así como los tractos para llegar a las capas específicas del tectum óptico formando las conexiones topográficas adecuadas.

Varios aspectos se distinguen entre el sistema visual del pez dorado y el del mamífero, los cuales involucran tanto características neuronales como gliales. La transección de los axones de las células ganglionares del pez dorado cerca del ojo no induce muerte celular retrógrada, como sucede en la retina de mamíferos. Además, en el pez dorado después de una axotomía se produce una respuesta anabólica (inflamación, incremento de la sustancia de Nissl e incremento en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos), en tanto en los mamíferos se produce una respuesta atrófica (encogimiento y reducción de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos) (Bunge y Hopkins, 1990).

A nivel molecular también existen diferencias en las proteínas de mielina que median la adhesión entre las láminas de mielina y que posiblemente tengan un papel importante en la diferenciación de los oligodendrocitos y las células de Schwann antes de la formación de la capa de mielina (Schneider *et al.*, 1992). En aves y mamíferos, la proteína de mielina Po se encuentra restringida al SNP, mientras que en el SNC se encuentran principalmente las proteínas de mielina PLP y DM-20. Estas proteínas difieren entre ellas por la presencia de un segmento de 35 aminoácidos que se encuentra en la molécula de PLP. Sin embargo, en peces el mayor componente de las proteínas de mielina tanto en el SNC como en el SNP es la proteína Po, que coexiste con la proteína de mielina DM-20. La proteína PLP aparece en los anfibios, la cual coexiste con DM-20 y Po en el SNC (Yoshida y Colman, 1996). Eventualmente, Po se excluye del SNC en vertebrados superiores y se limita al SNP.

Figura 2. Pasos para obtener una regeneración funcional. Se muestran los criterios que se necesitan alcanzar antes de que la regeneración funcional sea validada. Es necesario correlacionar los datos descriptivos con evidencias fisiológicas y conductuales para lograr la regeneración del SNC.



4. Regeneración central en los mamíferos adultos

Aunque en general los axones dañados en el SNC del adulto son incapaces de regenerarse, existe siempre la excepción que confirma la regla. En el SNC de los mamíferos adultos existen dos excepciones bien conocidas en donde los axones son capaces de regenerarse: estos son los ganglios retinales y el bulbo olfatorio, que difieren del resto del SNC en su componente glial (Bunge y Hopkins, 1990).

La retina contiene astrocitos, microglia y una clase especial de células neurogliales retinales llamadas células de Müller, que forman el grueso de las células gliales en la retina adulta. Debido a la ausencia de oligodendrocitos, la retina carece de mielina y los axones ganglionares retinales son incapaces de crecer en el nervio óptico que contiene oligodendrocitos. El bulbo olfatorio, que también presenta regeneración a lo largo de toda la vida del organismo, presenta los axones cubiertos por un tipo especial de células gliales conocidas como células fundadoras en las dos primeras capas del bulbo olfatorio, además de tener astrocitos, oligodendrocitos y microglia. Tra-

bajos recientes muestran que las células gliales de Müller y las células fundadoras son las que permiten la regeneración de los axones en la retina y en el bulbo olfatorio, respectivamente (Ramón-Cueto *et al.*, 2000).

5. La reparación del daño en mamíferos adultos

Cuando se produce daño en el SNC, se producen una serie de cambios muy diferentes al del SNP. En un principio los fibroblastos invaden la región dañada y se produce una densa acumulación de colágena. Las células del epéndimo proliferan y migran a esta región en donde un número pequeño de neuritas crecen por un periodo muy corto. Los astrocitos hipertrofiados proliferan y elaboran una malla extensa y gruesa conocida como 'cicatriz de astrocitos' que cubre la lesión. Asimismo, se produce una necrosis en el sitio lesionado, que gradualmente se extiende en todas direcciones (Guth *et al.*, 1983).

Regenerar el área dañada requiere por lo tanto de varios factores: primero que las neuronas dañadas sobrevivan y después estimular el crecimiento axonal a sus blancos neuronales originales. Un crecimiento axonal exitoso necesita la presencia de un buen sustrato y agentes neurotróficos que promuevan un crecimiento axonal dirigido. También implica tanto de mecanismos intrínsecos con las neuronas, como de la interacción de éstas con las células gliales y en ocasiones también de otras neuronas. Es necesario también remover la cicatriz de astrocitos, así como la presencia de moléculas inhibitoras. Una vez que el contacto axonal se efectúa, el axón requiere ser remielinado y necesita formar las sinapsis específicas funcionales sobre las neuronas blanco (figura 2).

Diferentes áreas se han desarrollado para abordar diferentes aspectos de este proceso, por ejemplo el papel de los factores de crecimiento, el papel de los inhibidores asociados a la mielina o a la cicatriz de astrocitos, o el reemplazamiento celular, ya sea por células fetales o por células madre o troncales, y el trasplante de células fundadoras.

5.1. Factores de crecimiento

Mucho trabajo se ha enfocado en tratar de elucidar cuáles son las moléculas que promueven el crecimiento de los axones, tanto durante el desarrollo, como después del daño neural. Los factores de crecimiento como las neurotrofinas promueven que sobreviva un tipo característico de neuronas durante el desarrollo y el factor de crecimiento de fibroblasto (FGF) estimula la proliferación y el crecimiento neural. La proteína asociada al crecimiento-43 (GAP-43) se expresa en los conos de crecimiento durante el desarrollo del SNC y en las sinapsis del cerebro adulto. Cuando los nervios son le-

sionados, aumentan los niveles de expresión de algunas proteínas como es GAP-43, las neurotrofinas, el factor de crecimiento neuronal (NGF), actina entre otras. También FGF se ha utilizado en varios experimentos, por ejemplo Cheng *et al.* (1996) transectaron la médula espinal de una rata adulta y utilizaron nervios periféricos para unir los tractos de axones de la médula espinal (materia blanca) con áreas de cuerpos celulares neuronales (materia gris), aplicando un pegamento de fibrina impregnado de FGF para estabilizar las uniones. Cuando se llevaron a cabo las uniones con nervios periféricos y FGF entre la materia blanca y la materia gris, se observó regeneración de axones y una recuperación conductual limitada. Sin embargo, en los controles y en las uniones que se hacían de materia blanca a materia blanca no se mostraba ninguna recuperación. Este trabajo es importante porque demuestra la regeneración funcional, aunque parcial, de la médula espinal completamente transectada de un mamífero adulto. Otra aproximación a este problema es utilizar células de Schwann, dado que desde los experimentos de Cajal se sabe que son un sustrato permisivo para los axones. Por ejemplo, Menei *et al.* (1998) transplantaron células de Schwann modificadas genéticamente que expresaban el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Éstas fueron puestas en tubos de polímeros y transplantadas entre los muñones de la médula espinal transectada, así como inyectadas en los muñones distal y proximal. Los resultados mostraron que BDNF generó un incremento en la respuesta regenerativa de los axones que expresan *trkB*; sin embargo, los axones nunca dejaron el sustrato permisivo de las células de Schwann para crecer en la médula espinal transectada. En un experimento similar, Liu *et al.* (1999) usaron fibroblastos que expresaban BDNF para incrementar el crecimiento de los axones rubroespinales en la médula espinal hemiseccionada. Ellos observaron que los axones se regeneraban alrededor de la lesión, así como varios milímetros hacia la región blanco, lo cual se correlacionaba con una mejoría en el comportamiento. Este experimento muestra que las neurotrofinas por sí mismas pueden estimular la migración axonal a través del SNC lesionado; sin embargo, no prueban una correlación entre la regeneración axonal y el comportamiento. Otros trabajos han mostrado que la administración de neurotrofinas genera cambios como brotes en los axones no lesionados, activación de caminos redundantes y alteraciones en la excitabilidad de las neuronas y la glía que sobreviven (Houweling *et al.*, 1998; Ribotta *et al.*, 2000). A pesar del uso extensivo de las neurotrofinas, muchas preguntas permanecen sin resolver respecto de la aplicación práctica de estas moléculas, ya que las neurotrofinas tienen

muchas propiedades aparte de la de ser importantes en el crecimiento axonal y en la sobrevivencia de las neuronas. Por ejemplo, las neurotrofinas que son transportadas anterógradamente y sirven para modular la excitabilidad de las membranas, afectan la diferenciación celular. Todas estas otras funciones de las neurotrofinas tienen que ser consideradas en la interpretación de futuros estudios.

5.2. Moléculas inhibitoras de mielina

En contraste con el SNC adulto, las neuronas jóvenes son capaces de extender sus axones y de regenerarse después de que se produce una lesión. Es decir, conforme el SNC madura en embriones y neonatos, se pierde de alguna forma la capacidad intrínseca de las neuronas de volver a crecer cuando se produce una lesión en la médula espinal. El tiempo exacto en que la regeneración axonal cesa varía entre especie y especie, y entre cada animal, dependiendo de la maduración de las neuronas que se lesionan. Al parecer, la mielina tiene un papel importante en bloquear activamente la regeneración, es decir, durante el desarrollo dos eventos ocurren que resultan en la pérdida de la capacidad regenerativa: los cambios en el medio ambiente (formación de la mielina) y la respuesta axonal intrínseca a los cambios del medio ambiente (el crecimiento axonal es inhibido por la mielina) (Filbin, 2000). De hecho, si el inicio de la mielinización se aplaza, se extiende el periodo por el cual los axones jóvenes pueden regenerarse *in vivo* (Keirstead *et al.*, 1992). Por ello, considerable atención se ha dirigido al hecho de que la mielina contiene inhibidores que contribuyen a la pérdida de regeneración conforme el SNC madura (Varga *et al.*, 1995). Algunos de los trabajos en este campo provienen de los estudios realizados por Schwab y colaboradores, los cuales se han enfocado a estudiar las bases de estos efectos inhibitorios (para revisión ver Schwab y Bartholdi, 1996). Ellos sugirieron que los oligodendrocitos son los responsables de crear un medio ambiente inhibitorio para la regeneración de los axones. Esta actividad inhibitoria asociada con la mielina es un obstáculo mayor para una regeneración exitosa del SNC de los mamíferos adultos. Este concepto deriva en parte de las observaciones hechas en cultivo de tejidos en donde mostraron que ciertas neuritas cuando crecen evitan el contacto con los oligodendrocitos. Posteriormente, identificaron dos proteínas inhibitorias derivadas de las preparaciones de mielina consideradas ser producto de los oligodendrocitos. Anticuerpos neutralizantes contra estas proteínas inyectadas en la médula espinal dañada mostraron que incrementan la regeneración axonal, aunque las distancias que recorren son muy cortas. Otro experimento de este mismo grupo ha sido inyectando en la

médula espinal dañada neurotrofina-3, que es un miembro de la familia de las neurotrofinas, junto con los anticuerpos contra las proteínas inhibitoras. Los resultados mostraron un efecto sinérgico en un 5% a 10% de los casos, en los cuales las fibras presentaban regeneración en grandes distancias, equivalente al observado únicamente con neuronas fetales transplantadas. Sin embargo, a pesar de observarse una mayor regeneración, en ningún caso los axones regenerados eran capaces de cruzar la lesión (Schnell *et al.*, 1994). El gen de uno de estos inhibidores ha sido secuenciado y se conoce como Nogo-A (Chen *et al.*, 2000), el cual se pega al receptor Nogo (NgR). Otras dos proteínas descritas como potentes inhibidores del crecimiento de las neuritas son la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) y la glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos (OMgp). Recientemente se ha descrito que MAG (Liu *et al.*, 2002) y OMgp (Wang *et al.*, 2002) también se pegan al receptor Nogo. Esto significa que una forma de promover el crecimiento axonal de las neuronas del SNC es bloqueando el receptor Nogo. Recientemente se ha mostrado que un péptido pequeño de una porción de la proteína Nogo que se pega, más que activa, a NgR induce tanto el crecimiento neuronal como recuperación funcional en ratas con lesiones en la médula espinal (GrandPré *et al.*, 2002).

También se ha descrito que la inhibición por MAG se encuentra mediada por un decremento en los niveles de AMPc (que es un segundo mensajero involucrado en las vías de señalamiento intracelular) de las neuronas, que está regulado durante el desarrollo (Cai *et al.*, 2001). Cuando el AMPc se inyecta en lo ganglios de la raíz dorsal antes de que se lleve a cabo una lesión, se induce una amplia regeneración.

Por otro lado, cuando se rompe la mielina por una activación inmune o se induce una reacción autoinmune contra la mielina, se incrementa la regeneración en la médula espinal adulta. Por ejemplo, cuando se inmunizaron ratones en contra de los inhibidores de mielina antes de hacer una lesión, ya sea con mielina aislada o con preparaciones de médula espinal enriquecidas en mielina, se observó que en más de 50% de los ratones inmunizados los axones se regeneraban por largas distancias comparados con el control (Huang *et al.*, 1999). Es decir, si se bloquean o se eliminan inhibidores de mielina endógenos se puede permitir un mayor potencial de regeneración de los axones. Sin embargo, otros trabajos han mostrado que la geometría de la materia blanca puede ser de tal manera que la mielina no siempre sea inhibitora sino permisiva. Por ejemplo, en un modelo *in vitro* de regeneración los axones periféricos fueron inhibidos únicamente cuando el alineamiento de la materia blanca era perpendicular a la dirección del crecimiento axonal (Pettigrew y Crutcher, 1999).

5.3. La cicatriz de astrocitos

Cuando se produce una lesión se genera una cicatriz de astrocitos que inhibe el crecimiento de los axones. Entre 1940 y 1950 algunos investigadores encontraron que si suprimían la proliferación de la cicatriz de tejido neuroglial que se forma cerca del sitio de la médula espinal dañada, y se promovía en su lugar la formación de tejido conectivo laxo entre los dos muñones de médula espinal, muchas fibras nerviosas eran capaces de penetrar la cicatriz. Estos investigadores propusieron que la incapacidad de regeneración del SNC se debe principalmente a que no existen rutas adecuadas para que las fibras nerviosas crezcan de nuevo, como consecuencia del rápido crecimiento de las células gliales y del tejido conectivo que forman una masa impenetrable. Esta cicatriz de astrocitos también contiene moléculas de la matriz extracelular como proteoglicanos de condroitin sulfato (PCS) o queratinas. Por ejemplo, el proteoglicano NG2 se expresa en células gliales inmaduras, pero también se incrementa después de una lesión cortical y puede inhibir el crecimiento de los axones cuando lo producen los astrocitos. Se ha demostrado que en general los PCS son moléculas inhibitoras para el crecimiento de los axones y la degradación de PCS con condroitinasa ABC (una enzima bacteriana que corta las cadenas laterales de los carbohidratos de largas proteínas extracelulares) incrementa la permisividad de los axones en lesiones de médula espinal (Zuo *et al.*, 1998). Inclusive cuando se administra la enzima condroitinasa ABC, inmediatamente después de haber lesionado parcialmente la médula espinal de ratas, se degradan los PCS en el sitio de la lesión, permitiendo que los nervios motores severamente lesionados se regeneren. Las ratas tratadas de esta manera presentan la capacidad de caminar normal o casi normal, aunque las funciones sensoriales no se recuperan (Bradbury *et al.*, 2002). Sin embargo, es necesario saber si la recuperación con esta enzima también se observa en lesiones de la médula espinal en donde la cicatriz de astrocitos ya está formada, o si produce algún efecto secundario. Otro hallazgo importante es la evidencia física de que la cicatriz de astrocitos puede inhibir la difusión entre las células en el sitio de la lesión. Es decir, la difusión decrece en regiones de hipertrofia astrocítica y en donde el condroitin sulfato se incrementa (Roitbak y Sykova, 1999). Por lo tanto, la cicatriz no sólo contiene moléculas inhibitoras, sino que también actúa como una barrera en la difusión de moléculas que promueven el crecimiento.

5.4. Reemplazamiento de células por tejido fetal

En muchos casos de trauma del SNC, tanto las neuronas como la glía se pierden. El reemplazamiento celular es un paso vital en este tipo de lesiones, en donde el sistema no puede reem-

plazar la función de las células perdidas. Por ejemplo, cuando existe daño en la parte cervical de la médula espinal, irremediablemente se pierden las neuronas motoras que proyectan a los músculos. Una propuesta son los trasplantes de tejido fetal para reemplazar las células perdidas durante el daño neural. Por ejemplo, Iwashita *et al.* (1994) transplantaron un pedazo de médula espinal de embrión en ratas de 1 a 2 días de nacidas que tenían la médula espinal transectada. Algunos de los trasplantes fueron capaces de fusionarse perfectamente, permitiendo el crecimiento de los axones a través del trasplante. Los animales fueron capaces de caminar y correr casi con una coordinación normal. Sin embargo, es necesario repetir estos experimentos en animales adultos, para determinar si esta recuperación también se observa en adultos. En otro trabajo, se transplantó médula espinal de tejido fetal, junto con neurotrofinas en ratas adultas a las que se había lesionado la médula espinal; de esta forma se observó una mayor regeneración axonal que si se transplantaba el tejido fetal o las neurotrofinas en forma independiente. Sorpresivamente, la regeneración de las vías supraespinales y de las funciones motoras se incrementaba dramáticamente cuando los trasplantes se colocaban entre 2 y 4 semanas después de haber hecho la transección, que si se aplicaban inmediatamente después de haber hecho la lesión (Coumans *et al.*, 2001). Por otro lado, los modelos de animales a los que se han destruido los axones de las células dopaminérgicas muestran problemas motores como en la enfermedad de Parkinson. Estos problemas se revierten cuando se transplantan suspensiones de células fetales que contienen células dopaminérgicas. Los resultados exitosos de estos experimentos en ratas han promovido al trasplante de tejido embrionario en pacientes con la enfermedad de Parkinson. Por ejemplo, en Suecia se han llevado a cabo estos trasplantes, en donde un número sustancial de personas (aunque está lejos de ser el total) han mostrado una mejoría clínica (Gray *et al.*, 1999). Sin embargo, los problemas mecánicos, físicos y éticos de usar tejido fetal limita su uso en gran escala.

5.5. Reemplazamiento de células por células madre o troncales

Recientemente, una de las grandes técnicas en la biología del desarrollo de los últimos 20 años es el uso de las células madre embrionarias o troncales (ME). Se sabe que el huevo fertilizado del cual se deriva cada individuo humano es multipotente, es decir, tiene la habilidad de generar todos los diferentes tipos celulares que componen el cuerpo humano, como las neuronas o los hepatocitos. Conforme el huevo empieza a dividirse y el embrión crece durante el desarrollo normal, las células se van restringiendo en los tejidos que generan.

La importancia de esta área fue el descubrimiento de técnicas que permiten la expansión de células pluripotentes derivadas de la masa de células internas del blastocisto (forma embrionaria temprana producida por las divisiones del huevo fertilizado; que consiste de una capa de células que rodean una cavidad esférica llena de fluido llamado blastocele y que es una etapa anterior a la gastrulación) y de células germinales primordiales, las cuales pueden ser propagadas indefinidamente en un estado indiferenciado (Gearhart, 1998). Esto se llevó a cabo primero con células de ratón y después con células de humano. Las células madre embrionarias (ME) fueron las que primero se derivaron del blastocisto en 1980, y más recientemente se encontró que los cultivos de células primordiales germinales dan lugar a células con las características de células ME y se designaron gemas embrionarias (GE) para distinguirlas de su tejido de origen. Las líneas de células ME prometen una revolución en la medicina reconstructiva, dado que en principio, estas células pueden diferenciarse en todas las líneas celulares *in vivo* y diferenciarse en muchos tipos celulares *in vitro*.

En la neurobiología se aprecia con un gran potencial el uso de estas células como fuente para introducir nuevas células neuronales y gliales en tejido dañado. Las células ME diferenciadas en un tejido, como pueden ser células neuronales, líneas hematopoyéticas o cardiomiocitos, tienen menos habilidad de autorrenovarse que las células ME no diferenciadas y, aunque todavía pueden diferenciarse en múltiples líneas, ya no son pluripotentes. El material que se usa para derivar las células ME de humano consiste en usar los huevos fertilizados que sobran cuando se lleva a cabo un programa de fertilización *in vitro*, o huevos que han sido fertilizados *in vitro* específicamente para el propósito de generar células. Otra fuente de material para obtener células ME son abortos de embriones humanos, de alrededor de 2 a 4 meses de gestación. En lugar de ser destruidos, los embriones se disectan para obtener tejido neural y mediante diferentes métodos se obtienen células ME neurales. Las células se immortalizan introduciendo un oncogen o expandiendo el cultivo con altas concentraciones de factores de crecimiento (Bjorklund y Lindvall, 2000).

Otra fuente de material para obtener células madre es el cerebro humano de adulto. Recientemente se ha descubierto que nuevas neuronas se generan en el adulto, en particular en respuesta al daño y que las células con propiedades de células madre se pueden aislar de tejido de cerebro adulto (Gross, 2000; Gage, 2000). Estas células ME o de adulto resultantes son multipotenciales (tienen la capacidad de generar el rango completo de células neurales) y tienen la habilidad de autorreplicarse (de generar más células madre como

ellas), lo cual permite que se puedan marcar genéticamente con diferentes marcadores o genes terapéuticos y transplantarlas en el SNC en desarrollo o adulto. Una vez transplantadas en el cerebro, las células ME neurales pueden adaptarse y diferenciarse en las subpoblaciones neuronales o gliales apropiadas. Por ejemplo, se transplantó la línea celular multipotente MHP, derivada del hipocampo de un ratón transgénico en desarrollo, al hipocampo de ratas dañadas en la región CA1 del hipocampo. Los trasplantes mostraron que las células MHP migraron a la región dañada y adoptaron tanto fenotipos neuronales como gliales *in vivo* reconstituyendo la apariencia laminada de la región CA1 del hipocampo. Se observó también una completa recuperación de la función cognitiva (Gray *et al.*, 1999). Por otro lado, cuando células ME neurales fueron transplantadas en la médula espinal de una rata adulta normal, la mayoría de las células se diferenciaban en astrocitos y algunos pocos en oligodendrocitos, y también se encontraban otras células indiferenciadas que eran positivas a nestina. Cuando estas mismas células se transplantaron después de generar una lesión en la médula espinal, las células se diferenciaban en astrocitos y unas pocas células positivas a nestina. Ninguna célula se diferenció en oligodendrocito o neurona (Cao *et al.*, 2001).

Sin embargo, en otro trabajo se transplantaron células ME neurales en la médula espinal después de una lesión y se observó que las células se diferenciaban en astrocitos, oligodendrocitos y neuronas. Además, los animales eran capaces de soportar su peso y mostrar una coordinación parcial con los miembros posteriores (McDonald *et al.*, 1999). Esto sugiere que es necesario manipular estas células *in vitro* y/o modificar el medio ambiente del hospedero antes de ser transplantadas, para controlar el tipo de línea que se quiere obtener. Algunos trabajos han utilizado células ME neurales y diferenciado principalmente en oligodendrocitos con ácido retinoico. Cuando estas células diferenciadas en oligodendrocitos se transplantan en la médula espinal de ratas químicamente desmielinizadas (Liu *et al.*, 2000) o en la médula espinal lesionada (McDonald y Howard, 2002) de roedores adultos, las células precursoras se diferencian en oligodendrocitos y mielinizan los axones del hospedero. Sin embargo, la capacidad funcional de remielinización que se obtiene en estos trasplantes es muy limitada.

Aunque estas células ME han sido aisladas en humanos (Thomson *et al.*, 1998), su uso en la investigación y en la clínica se encuentra encubierto por consideraciones éticas que se han hecho del uso de estas células, tanto actuales como potenciales. Más allá de estas consideraciones éticas, existen obstáculos técnicos en el uso de células ME que recientemente se han reportado. Primero, estas células sólo

pueden ser obtenidas de embriones muy tempranos en el desarrollo, y aunque varias líneas celulares de diferentes tejidos de células ME se han desarrollado, éstas no son compatibles inmunológicamente con la mayoría de los pacientes que requieren trasplantes de células. Esto se debe a que las proteínas que existen sobre la superficie de estas células pueden ser reconocidas como extrañas por el sistema inmune. Es decir, los pacientes tienen el riesgo de rechazar el trasplante, por lo que tendrían que tomar inmunosupresores del mismo tipo de los que se les administra a las personas con órganos transplantados. Segundo, la alternativa sería usar células ME indiferenciadas, pero éstas forman teratomas (tumores benignos que contienen una mezcla de diferentes tipos de tejidos) después de ser transplantadas. Por lo tanto, las células ME tienen que estar primero diferenciadas en cultivo en el tipo de célula apropiado, antes de ser transplantadas.

Los estudios realizados con células madre de adulto (MA) se encuentran en un periodo muy temprano de desarrollo. Recientemente se mostró que estas células transplantadas se fusionan con las del hospedero sin diferenciarse en un tipo particular de célula. Asimismo, cuando se hicieron estudios para saber si células MA cambian en un tipo de células embrionarias cuando se cultivan con células ME, se observó que las células MA simplemente se fusionan con las células embrionarias creando células gigantes con un número mayor de cromosomas. Éticamente el uso de tejido adulto es el que menos discusión presenta, pero también es el menos explorado, por lo que su potencial, si es que existe, se encuentra todavía lejos de llegar a ser utilizado (Gross, 2000; Gage, 2000).

En conclusión, aunque las células ME o MA parecen tener un gran potencial terapéutico, por el momento todavía el uso de estas células no ha sido del todo exitoso. Un conocimiento más profundo de los mecanismos de diferenciación de las células ME neurales dentro del contexto del SNC lesionado es crítico para que estas células se conviertan en una posible estrategia terapéutica.

5.6. Trasplantes de células enfundadoras olfatorias

Por otro lado, las células enfundadoras que se encuentran en el bulbo olfatorio también han sido sujetas de estudio, ya que se ha sugerido que sean las responsables del crecimiento de los axones olfatorios en el bulbo olfatorio de un adulto. Varios trabajos sugieren que estas células secretan factores tróficos, los cuales contribuyen para generar un medio ambiente apropiado para el crecimiento de los axones. Cuando los axones de la raíz dorsal son transectados y las células enfundadoras transplantadas, los axones son capaces de entrar y regenerarse en la médula espinal de la rata adulta. Es decir, los axones son capaces de cruzar tanto la materia blanca,

como la cicatriz de astrocitos que se ha generado en la zona de transición, crecer en la materia gris de la médula espinal y llegar a la zona que inerva en condiciones normales (Ramón-Cueto y Nieto-Sampedro, 1994). De la misma manera, cuando la médula espinal es transectada completamente y las células olfatorias enfundadoras son transplantadas, las ratas recuperan funciones locomotoras y reflejos sensorio-motores (Li *et al.*, 1997; Ramón-Cueto *et al.*, 2000).

Dado que las células enfundadoras se pueden aislar de ratas adultas, los resultados sugieren la posibilidad de hacer trasplantes autólogos, es decir, que se obtengan células enfundadoras del mismo paciente para ser transplantadas a la lesión, evitando así problemas de rechazo inmunológico.

Todo este trabajo ha estado enfocado a tratar de encontrar la forma de regenerar los axones de las neuronas o de reemplazarlas. Sin embargo, una vez que los axones logren crecer y cruzar la lesión, es necesario estudiar el tipo de sinapsis que se forman una vez que los axones se han regenerado. Es decir, saber si las sinapsis que se forman son específicas para los diferentes tipos de neuronas que se encuentran en el SNC, ya que esto es muy importante para obtener una completa regeneración del SNC.

Aunque todavía falta mucho para poder producir una verdadera terapia regenerativa en humanos, estos resultados abren grandes posibilidades para considerar una terapia regenerativa efectiva en lesiones de la médula espinal en humanos. Algunas terapias potenciales se han descrito anteriormente como serían los anticuerpos contra Nogo que bloquean la actividad del inhibidor Nogo, el péptido Nogo que bloquea la acción del receptor Nogo o el AMPc que bloquea la acción de las moléculas inhibitoras. También la enzima condroitinasa ABC que induce el crecimiento de las fibras nerviosas digiriendo la cicatriz de astrocitos. Asimismo el trasplante de células, ya sea con células madre, o células enfundadoras olfatorias, o tejido fetal con factores de crecimiento o células de Schwann modificadas. Todas estas células favorecen la recuperación de la médula espinal. Ya en la práctica se han tratado lesiones de la médula espinal con el esteroide antiinflamatorio metilprednisolona, para reducir el daño que el proceso inflamatorio produce. Sin embargo, la droga necesita ser administrada dentro de las primeras 8 horas después del accidente, y el efecto que produce es muy modesto. Por otro lado, se ha observado que la mayoría de las lesiones de la médula espinal son incompletas, pero que las fibras no transectadas presentan también cierto daño, que

La hipótesis de Cajal ha sido corroborada una vez más, ya que las neuronas del SNC regeneran sus axones si se encuentran en el medio ambiente adecuado.

deteriora su habilidad para conducir impulsos nerviosos. Una de las funciones de la mielina es concentrar los canales iónicos en los nodos de Ranvier. Sin mielina los canales se distribuyen a lo largo del axón permitiendo el flujo de iones, como el K^+ , de las neuronas, lo cual disminuye la conducción del impulso nervioso. Dado lo anterior la compañía farmacéutica Acorda Therapeutics en Hawthorn, Nueva York, diseñó un fármaco llamado fampridina (4-amino

nopyridina o 4-AP), la cual ayuda a compensar la falta de mielina, bloqueando los canales de K^+ en esas partes. Cuando se administra 4-AP a gatos que tienen lesiones en la médula espinal, se restablece la capacidad de las neuronas sobrevivientes de conducir el impulso eléctrico y estimula el patrón normal de actividad eléctrica en los músculos de la rata. Asimismo, observaron que este tratamiento en perros accidentados que estaban paralizados mejoraba la habilidad de sentarse y caminar, así como las funciones sensoriales y de la vejiga (Wickelgren, 2002). Acorda ha hecho pruebas en más de 200 pacientes por cinco años, observando que la fampridina mejora las funciones motoras y sensoriales muy modestamente. Sin embargo, la droga reduce significativamente la espasticidad, rigidez y los espasmos musculares involuntarios de las extremidades en algunos pacientes. También se mejora la función sexual, de la vejiga y del intestino en los individuos tratados con esta droga. Hasta el momento, parece que el único efecto secundario es un incremento en la excitabilidad de las neuronas sanas. En este momento se están llevando a cabo pruebas a gran escala en humanos. Sin embargo, la mayoría de los investigadores piensa que no existe una sola terapia capaz de reparar las lesiones de la médula espinal. Es decir, que es necesario pensar en una combinación de las diferentes posibilidades terapéuticas para lograr una completa regeneración neural, que en principio se cree que existe en la médula espinal.

En conclusión, puede decirse que todas las piezas del rompecabezas todavía no se conocen. Sin embargo, una vez más la hipótesis propuesta por Cajal ha sido corroborada, ya que las neuronas del SNC tienen capacidad regenerativa siempre y cuando se encuentren en el medio ambiente adecuado. Asimismo, parece ser que son las diferentes células gliales las responsables de permitir en los sistemas el bloqueo o la regeneración neuronal de las mismas y que existen moléculas inhibitoras que no permiten el crecimiento de los axones. Tanto las células de Schwann como las células enfundadoras, o las células madre o el tejido fetal

transplantados al SNC tienen una considerable influencia sobre el potencial regenerativo del SNC. Por otro lado, los trabajos de Young (1996) sugieren que sólo 10% de los axones originales de la médula espinal son necesarios para una recuperación motora. Es decir que son pocos los axones que se requieren para preservar, restablecer o regenerar una recuperación funcional.

Por último, cabe preguntarse el significado evolutivo de la inhibición 'normal' del crecimiento de los axones en el SNC, en otras palabras: ¿Qué ventajas le representa al SNC no poder regenerarse? Se ha sugerido que puede estar involucrado en la segregación y estabilización de los tractos

mielinizados durante el desarrollo (Schwab y Schnell, 1991), o estar relacionado con la estabilidad de las conexiones neuronales, en particular las regiones neuroanatómicas (Kapfhammer y Schwab, 1994). Otra posibilidad es que incrementa la plasticidad entre las neuronas, o que regenerarse implicaría un gasto tan grande de energía que no vale la pena llevarlo a cabo, o que no es posible asegurar que los axones una vez regenerados sean capaces de ser guiados adecuadamente a sus blancos originales y formen sinapsis específicas. Quizás la especulación de esta pregunta nos lleve a tratar de entender mejor el sistema, y en consecuencia a poder manipularlo más adecuadamente.



Bibliografía

- Bjorklund, A. and O. Lindvall (2000). "Cell Replacement Therapies for Central Nervous System Disorders", *Nature Neurosci* 3: 537-544.
- Bradbury, E. M.; L.D.F. Moon; R.M. Popat; V.R. King; G.S. Bennett; P.N. Patel; J. W. Fawcett and S.B. McMahon (2002). "Chondroitinase ABC Promotes Functional Recovery after Spinal Cord Injury", *Nature* 416: 636-640.
- Bunge, R.P. and J.M. Hopkins (1990). "The Role of Peripheral and Central Neuroglia in Neural Regeneration in Vertebrates", *Semin. Neurosci* 2: 509-518.
- Cai, D.; J. Qiu; Z. Cao; M. McAtee; B. S. Bregman and M. T. Filbin (2001). "Neuronal Cyclic AMP Controls the Developmental Loss in Ability of Axons to Regenerate", *J Neurosci* 21:4731-4739.
- Cao, Q.L.; Y.P. Zhang; R. M. Howard; W.M. Walters; P. Tsoufas and S. R. Whittemore (2001). "Pluripotent Stem Cells Engrafted into the Normal or Lesioned Adult Rat Spinal Cord are Restricted to a Glial Lineage", *Exp Neurol* 167: 48-58.
- Chen, M. S.; A. B. Huber; M. van der Haar; M. Frank; L. Schnell; A. A. Spillmann; F. Christ and M. E. Schwab (2000). "Nogo-A is a Myelin-Associated Neurite Outgrowth Inhibitor and an Antigen for Monoclonal Antibody IN-1", *Nature* 403:434-439.
- Cheng, H.; Y. Cao and L. Olson (1996). "Spinal Cord Repair in Adult Paraplegic Rats: Partial Restoration of Hind Limb Function", *Science* 273: 510-512.
- Coggeshall, R.E. and C. S. Youngblood (1983). "Recovery from Spinal Transection in Fish: Regrowth of Axons Past the Transection", *Neurosci. Lett* 38:227-231.
- Coumans, J.V.; T. T. Lin; H. N. Dai; L. Mac Arthur; M. McAtee; C. Nash and B. S. Bregman (2001). "Axonal Regeneration and Functional Recovery after Complete Spinal Cord Transection in Rats by Delayed Treatment with Transplants and Neurotrophins", *J Neurosci* 21: 9334-9344.
- David, S. and A. Aguayo (1981). "Axonal Elongation Into Peripheral Nervous System "Bridges" after Central Nervous System Injury in Adult Rats", *Science* 214: 931-933.
- Filbin, M.T. (2000). "Axon Regeneration: Vaccinating Against Spinal Cord Injury", *Current Biology* 10:R100-R103.
- Gage, F.H. (2000). "Mammalian Neural Stem Cells", *Science* 287:1433-1438.
- Gearhart, J. (1998). "New Potential for Human Embryonic Stem Cells", *Science* 282:1061-1062.
- GrandPré, T.; S. Li and S. M. Strittmatter (2002). "Nogo-66 Receptor Antagonist Peptide Promotes Axonal Regeneration", *Nature* 417: 547-551.
- Gray, J.A.; H. Hodges and J. Sinden (1999). "Prospects for the Clinical Application Of Neural Transplantation with the use of Conditionally Immortalized Neuroepithelial Stem Cells", *Phil Trans. R. Soc Lond. B* 354:1407-1421.
- Gross, C.G. (2000). "Neurogenesis in the Adult Brain: Death of a Dogma", *Nat. Rev. Neurosci* 1:67-73.
- Grundy, D. and A. Swain (1993). *ABC of Spinal Cord Injury*. 2nd edition. BMJ Publishing Group. pp. 1.
- Guth, L.I.; P. J. Reier; Ch.P. Barrett and E. J. Donati (1983). "Repair of the Mammalian Spinal Cord", *Trend. Neurosci* 3: 20-24.
- Horner, P.J. and F. H. Gage (2000). "Regenerating the Damaged Central Nervous System", *Nature* 407:963-970.
- Houweling, D.A.; A. J. Lankhorst; W. H. Gispen; P. R. Bar and E. A. Joosten (1998). "Collagen Containing Neurotrophin-3 (nt-3) Attracts Regrowing Injured Corticospinal Axons in the Adult Rat Spinal Cord and Promotes Partial Functional Recovery", *Exp. Neurol* 153: 49-59.
- Huang, D.W.; L. McKerracher; P. E. Braun and S. David (1999). "A Therapeutic Vaccine Approach to Stimulate Axon Regeneration in the Adult Mammalian Spinal Cord", *Neuron* 24:639-647.
- Hudson, L.D. (1990). "Molecular Biology of Myelin Proteins in the Central and Peripheral Nervous System", *Semin. Neurosci* 2: 483-496.
- Ide, C.; K. Tohyama; R. Yokota; T. Nitatori and

- H. Onodera (1983). "Schwann Cell Basal Lamina and Nerve Regeneration", *Brain Res* 288: 61-65.
- Iwashita, Y.; S. Kawaguchi and M. Murata (1994). "Restoration of Function by Replacement of Spinal Cord Segments in the Rat", *Nature* 367: 167-170.
- Kapfhammer, J.P. and M. E. Schwab (1994). "Inverse Patterns of Myelination and Gap-43 Expression in the Adult CNS: Neurite Growth Inhibitors as Regulators of Neural Plasticity", *J. Comp. Neurol.* 340:194-206.
- Keirstead, H.S.; S. J. Hasan; G. D. Muir and J. D. Steeves (1992). "Suppression of the Onset of Myelination Extends the Permissive Period for the Functional Repair of Embryonic Spinal Cord", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11664-11668.
- Li, Y.; P. M. Field and G. Raisman (1997). "Repair of Adult Rat Corticospinal Tract by Transplants of Olfactory Ensheathing Cells", *Science* 277:2000-2002.
- Liu, B.P.; A. Fournier; T. GrandPré and S. M. Strittmatter (2002). "Myelin-Associated Glycoprotein as a Functional Ligand for the Nogo-66 Receptor", *Science* 297: 1190-1193.
- Liu, S.; Y. Qu; T. J. Stewart; M. J. Howard; S. Chakraborty; T. F. Holekamp and J. W. McDonald (2000). "Embryonic Stem Cells Differentiate into Oligodendrocytes and Myelinate in Culture and After Spinal Cord Transplantation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6126-6131.
- Liu, Y.; D. Kim; B. T. Himes; S. Y. Chow; T. Schallert; M. Murray; A. Tessler and I. Fisher (1999). "Transplants of Fibroblasts Genetically Modified to Express BDNF Promote Regeneration of Adult Rat Rubrospinal Axons and Recovery of Forelimb Function", *J. Neurosci.* 19:4370-4387.
- Maturana, H.R.; J. Y. Lettvin; W. S. McCulloch and W. H. Pitts (1959). "Evidence that Cut Nerve Fibers in a Frog Regenerate to their Proper Places in the Tectum", *Science* 130: 1709-1710.
- McDonald, J.W. _____ and M. J. Howard (2002). "Repairing the Damaged Spinal Cord: a Summary of our Early Success with Embryonic Stem Cell Transplantation and Remyelination", *Prog. Brain Res* 137:299-309.
- _____; X. Z. Liu; Y. Qu; S. Liu; S. K. Mickey; D. Turetsky; D. I. Gottlieb and D. W. Choi (1999). "Transplanted Embryonic Stem Cells Survive, Differentiate and Promote Recovery in Injured Rat Spinal Cord", *Nat Med* 5:1410-1412.
- Menei, P.; C. Montero-Menei; S. R. Whitemore; R. P. Bunge and M. B. Bunge (1998). "Schwann Cells Genetically Modified to Secrete Human BDNF Promote Enhanced Axonal Regrowth Across Transected Adult Rat Spinal Cord", *Eur. J. Neurosci.* 10: 607-621.
- Olson, L. (2002). "Medicine: Clearing a Path for Nerve Growth", *Nature* 416: 589-590.
- Pettigrew, D.F. and K. A. Crutcher (1999). "White Matter of the CNS Supports or Inhibits Neurite Outgrowth in Vitro Depending on Geometry", *J. Neurosci* 19:8358-8366.
- Ramón y Cajal, S.R. (1928). *Degeneración y regeneración del sistema nervioso*, en DeFelipe, J. and E.G. Jones (1991) *Cajal's degeneration and regeneration of the nervous system*. Oxford University Press. pp. 734-760.
- Ramón-Cueto, A. _____; M. I. Cordero; F. F. Santos-Benito and J. Avila (2000). "Functional Recovery of Paraplegic Rats and Motor Axon Regeneration in Their Spinal Cords by Olfactory Ensheathing Glia", *Neuron* 25:425-435.
- ____ and Nieto-Sampedro, M. (1994). "Regeneration Into the Spinal Cord of Transected Dorsal Root Axons is Promoted by Ensheathing Glia Transplants", *Exp. Neurol.* 127:232-244.
- Ribotta, M.G.; I. Provencher; D. Feraboli-Lohnherr; S. Rossignol; A. Privat and D. Orsal (2000). "Activation of Locomotion in Adult Chronic Spinal Rats is Achieved by Transplantation of Embryonic Raphe Cells Reinnervating a Precise Lumbar Level", *J. Neurosci.* 20: 5144-5152.
- Richardson, P.M.; U.M. McGuinness and A. J. Aguayo (1980). "Axons from CNS Neurons Regenerate into PNS Grafts", *Nature* 284: 264-265.
- Roitbak, T. and E. Sykova (1999). "Diffusion Barriers Evoked in the Rat Cortex by Reactive Astroglia", *Exp. Neurol.* 148: 587-603.
- Schneider, A.; P. Montague; I. Griffiths; M. Fanarraga; P. Kennedy; P. Brophy and K. A. Nave (1992). "Uncoupling of Hypomyelination and Glial Cell Death by a Mutation in the Proteolipid Protein Gene", *Nature* 358: 758-761.
- Schnell, L.; R. Schneider; R. Kolbeck; Y. A. Barde and M. E. Schwab (1994). "Neurotrophin-3 Enhances Sprouting of Corticospinal Tract During Development and after Adult Spinal Cord Lesion", *Nature* 367: 170-173.
- Schwab, M.E. _____ and D. Bartholdi (1996). "Degeneration and Regeneration of Axons in the Lesioned Spinal Cord", *Physiol Rev* 76:319-370.
- ____ and L. Schnell (1991). "Channeling of Developing Rat Corticospinal Tract Axons by Myelin-Associated Neurite Growth Inhibitors", *J. Neurosci.* 11:709-721.
- Simpson Jr. S.B. (1968). "Morphology of the Regenerated Spinal Cord in the Lizard, *Anolis carolinensis*", *J. Comp. Neurol.* 134: 193-210
- Sketelj J.; M. Bresjanac and M. Popovic (1989). "Rapid Growth of Regenerating Axons Across the Segments of Sciatic Nerve Devoid of Schwann Cells", *J. Neurosci. Res* 24: 153-162.
- Thomson, J.A.; J. Itskovitz-Eldor; S. S. Shapiro; M. A. Waknitz; J. J. Swiergiel; V. S. Marshall and J. M. Jones (1998). "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts", *Science* 282:1145-1147.
- Varga, Z.M.; M. E. Schwab and I. G. Nicholls (1995). "Myelin-Associated Neurite Growth-Inhibitory Proteins and Suppression of Regeneration of Immature Mammalian Spinal Cord in Culture", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:10959-10963.
- Yoshida, M. and D. R. Colman (1996). "Parallel Evolution and Coexpression of The Proetolipid Proteins and Protein Zero in Vertebrate Myelin", *Neuron* 16:1115-1126.
- Young, W. (1996). "Spinal Cord Regeneration", *Science* 273:451.
- Wang, K.C.; V. Koprivica; J. A. Kim; R. Sivasankaran; Y. Guo; R. L. Neve and Z. He (2002). "Oligodendrocyte-Myelin Glycoprotein is a Nogo Receptor Ligand that Inhibits Neurite Outgrowth", *Nature* 417:941-944.
- Wickelgren, I. (2002). "Animal Studies Raise Hopes for Spinal Cord Repair", *Science* 297:178-181.
- Zuo, J. M.; D. Neubauer; K. Dyess; T. A. Ferguson and T. Muir (1998). "Degradation of Chondroitin Sulfate Proteoglycan Enhances the Neurite-Promoting Potential of Spinal Cord Tissue", *Exp. Neurol.* 154:654-662.