

Efecto de la administración de glicina en la función motora de la rata después de lesión traumática de la médula espinal

Marco Antonio Paredes-Espinosa, Gabriela Flores-Mondragón, José Martín Perea-Paz, Carlos Jorge Martínez-Canseco, Joel Méndez-Heredia

RESUMEN

En la lesión traumática de la médula espinal (LTME) se disminuyen los niveles de glicina y los efectos de su administración no son completamente conocidos. *Objetivos:* examinar el efecto de la administración de glicina inmediatamente después de la lesión traumática aguda de la médula espinal sobre la función motora de la rata. *Material y métodos:* se realizó lesión traumática en la médula espinal (LTME) en T8, a dos grupos de ratas *Wistar*. Uno recibió inmediatamente después glicina (LTME+GLI), y el otro (LTME+VEH) y a un tercero sano vehículo. Evaluamos la función motora en la barra de equilibrio y el análisis de huellas después de la LTME, durante 8 semanas. *Resultados:* LTME produjo espasticidad. El análisis de huellas y la barra de equilibrio mostraron alteración motora importante. La recuperación funcional en el grupo LTME+GLI fue mejor, pero no tuvo significancia estadística con respecto al grupo LTME+VEH. *Conclusiones:* la alteración motora producida por la LTME fue valorada de manera adecuada por la batería de pruebas motoras empleadas. La glicina no produjo un efecto estadísticamente significativo sobre la recuperación de los patrones complejos de integración sensorimotora después de la LTME, sugiriendo la utilización de diferentes dosis de glicina y fármacos que afectan la formación de radicales libres, como la ciclosporina-A, la cual también es un agente anti-inflamatorio y desferroxamina.

Palabras clave: espasticidad, glicina, lesión traumática de la médula espinal, radicales libres, óxido nítrico, recuperación funcional motora.

Effect of glycine administration on motor function in rats after traumatic injury of the spinal cord

ABSTRACT

After traumatic spinal cord injury (TSCI) decrease glycine level. The effects of administration of glycine are not fully understood. *Objective:* evaluate functional motor recovery of TSCI in rats after administration of glycine. *Material and method:* TSCI was made in T8, under anesthesia in two groups *Wistar* rats. One group received glycine (TSCI+GLI), the other (TSCI+VEH) and healthy rats group received vehicle. After the lesion, the spasticity and motor performance was assessed after TSCI using beam-walking paradigm and the footprint analysis for 8 weeks. *Results:* after the lesion, spasticity and beam-walking and footprint analysis showed an important motor deficit. Moreover, a slightly improvement were observed in the TSCI+GLI group, although no significant differences were found when the TSCI+GLI and TSCI+VEH groups were compared. *Conclusions:* the motor alteration taken place by the TSCI was valued appropriately by the battery of tests used motor performance. The glycine didn't produce an effect statistically significant on the recovery of the complex patterns of sensory-motor integration after the TSCI, suggesting the use of different glycine dose and of pharmaceutical that inhibit the formation of free radicals, inflammatory reaction, such cyclosporin-A, and deferoxamine to completely abolish the oxidative effect of ferrous iron.

Key words: spasticity, glycine, spinal cord contusion injury, recovery motor function, free radicals, nitric oxide.

La lesión de la médula espinal (LME) puede afectar severamente la calidad de vida, llegando incluso a la muerte. Dependiendo del nivel de lesión y por debajo de ella, se produce pérdida de sensación y movimientos voluntarios, acompañados comúnmente de dolor y espasticidad, e inclusive alcanza la interrupción de las funciones corporales como respiración, control de esfínteres, entre otros. Es importante destacar que la frecuencia de la LME; es mayor en el periodo más productivo de la vida, alcanzando un alto impacto socioeconómico.

Dependiendo de la severidad de la LME se puede originar un proceso neurodegenerativo crónico, abarcando mas allá del sitio inicial de lesión.

En la zona focal de la lesión traumática de la médula espinal (LTME) se inicia la alteración del parénquima medular a través de la intervención de procesos de inflamación e isquemia, hemorragia, y muerte celular por apoptosis y necrosis. Con una participación importante del estrés oxidativo y excitotoxicidad, esta última debido a elevación de aminoácidos excitadores, después del trauma, por lo que el daño se extiende más allá del foco de lesión. La recuperación funcional después de LME es limitada, debido a que los axones dañados severamente no se pueden regenerar. Después de lesiones incompletas de la médula espinal se produce cierta recuperación de las funciones sensoriales y motoras, debido a la participación de una compleja red de diferentes mecanismos fisiológicos.

La glicina, es el aminoácido no esencial más sencillo, participa en el metabolismo de proteínas, síntesis del ADN, fosfolípidos, colágeno, y almacenamiento de glucógeno. Es precursor de glutatión, creatina e interviene en la biosíntesis de purinas, adenosin trifosfato, glucosa, glucógeno, sales biliares, L-serina y de otros aminoácidos, se incorpora en las porfirinas (hemoglobina y citocromos). En el sistema nervioso central (SNC), se ha demostrado que la glicina desempeña la función de neurotransmisor inhibitor y neuromodulador de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). La concentración de este aminoácido es en particular alta en la médula espinal.

En la lesión de la médula espinal, descienden los niveles de glicina en la zona dañada, paralelamente disminuyen el recambio y liberación de este aminoácido. Lo cual sugiere la posibilidad de utilizar glicina como parte del tratamiento de la lesión espinal. En este sentido se ha demostrado que la administración de glicina o sus agonistas mejora algunos signos clínicos de la espasticidad después de la lesión de la médula espinal, como la reducción del tono muscular, y quizás el dolor. En cuanto a los antagonistas de la glicina, estos incrementan el tono muscular en la LME. Un precursor de la glicina, la treonina ha mostrado tener la capacidad de disminuir los síntomas de la espasticidad en el hombre, sin la aparición de efectos secundarios observables. Sin embargo, *in vitro*, en cortes de

hipocampo, la elevación de glicina lleva a la excitotoxicidad, en contraste *in vivo*, se ha reportado que la glicina no potencia la despolarización evocada por los receptores NMDA, y en cultivo cortical, la glicina protege a las neuronas de toxicidad inducida por hipoxia. Se ha reportado que la glicina también facilita la neurogénesis a través de la modulación de los receptores NMDA, además de la capacidad de reducir la excitotoxicidad.

Nuestro interés es conocer mejor los efectos de la glicina en la atención a la lesión de la médula espinal, debido a su posible influencia en la recuperación de la función motora, ya que la información que se dispone es limitada e incluso controversial.

OBJETIVO

Examinar el efecto de la administración de glicina inmediatamente después de la lesión traumática aguda de la médula espinal sobre la función motora de la rata.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas macho Wistar de 280 a 350 g de peso, con agua y alimento libremente proporcionados, y un ciclo de luz-oscuridad de 12 hs cada uno. Se mantuvieron individualmente después de la LTME en cajas de acrílico transparente. La utilización y manejo de animales en este trabajo estuvo bajo la aprobación del Comité de Ética del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Procedimiento experimental

Se formaron tres grupos, cada uno con 6 ratas. Al grupo experimental (LT+GLI) se le realizó la LTME a nivel de T8, 24 hs después se les administro 0.5 ml de glicina v. i. p. (Merck) a una concentración de 40 mM disueltos en solución fisiológica, durante 5 días. Al grupo testigo (LT+VEH) se realizó la LTME en T8, 24 hs después se les administro 0.5 ml de solución fisiológica diariamente durante 5 días. Al grupo control (CT) se realizó únicamente laminectomía y se administro 0.5 ml de vehículo diariamente, durante 5 días.

La evaluación de la locomoción comprendió dos fases. En la primera se entreno a los animales para la eje-

Recibido: 17 enero 2011. Aceptado: 2 febrero 2011.

Instituto Nacional de Rehabilitación. Correspondencia: Marco Antonio Paredes-Espinosa. Instituto Nacional de Rehabilitación. Calzada México Xochimilco # 289. Col. Arenal de Guadalupe. 14389 México, D.F. E-mail: maparedes@inr.gob.mx lunaconejo@yahoo.es

cución de las pruebas del análisis de las huellas y barra de equilibrio, iniciando 14 días antes de la LTME. En la fase siguiente, dos semanas después de la LTME cuando los animales ya podían desplazarse soportando su peso, se aplicaron las pruebas motoras, dos veces a la semana, durante 8 semanas. Se analizaron los resultados aplicando el análisis de la varianza (ANOVA) y posanálisis de *Tukey*, para determinar las diferencias entre los grupos, con el programa *Prisma Graphics*, versión 3.0.

Evaluación de la función motora

La función motriz de las ratas se evaluó por medio de dos pruebas. El paradigma de la barra de equilibrio, examinó el desplazamiento y postura de la rata, el análisis de las huellas, evaluó de manera precisa las características principales de la zancada de la rata. La primera consistió en pasar al animal sobre una barra de madera de 2.5 cm de espesor por 2 m de largo suspendida a una altura de 50 cm contando el número de errores al atravesar dicha barra (modificada de Knigh J. 2000). La segunda se realizó pasando a la rata con las patas posteriores entintadas (tinta no tóxica) a lo largo de un corredor de 1 m de largo y 20 cm de ancho, en cuyo piso se coloca una tira de papel, quedando marcadas las huellas del animal, sobre estas se realizaron las mediciones de largo y ángulo de la zancada (modificado de Hruska, et al, 1979).

Lesión traumática

Para realizar la LTME, se anestesió a cada rata con una mezcla de Xilazina (12 mg/kg) (Bayer) y Ketamina (75 mg/kg) (Bayer), inyectados por vía intramuscular. Se realizó laminectomía bajo el microscopio en la vértebra T8 sin retirar las meninges, se lesionó la médula dejando caer un cilindro de acero inoxidable de 10 g de peso y 2 mm de diámetro a 5 cm de altura. En todos los grupos la herida de las ratas fue suturada (sutura Vicryl 4-0, Ethicon), se administró por vía intramuscular 0.5 ml de penicilina G (Bayer).

Atención posquirúrgica

Todas las ratas se colocaron individualmente en cajas de acrílico con aserrín estéril absorbente. Al día siguiente por la mañana se procedió a cambiar la cama por aserrín limpio, agua y alimento. En los animales lesionados la limpieza se realizó con agua y jabón quirúrgico todos los días, se procedió a inducir manualmente la evacuación de la orina y excremento, hasta la recuperación del control reflejo.

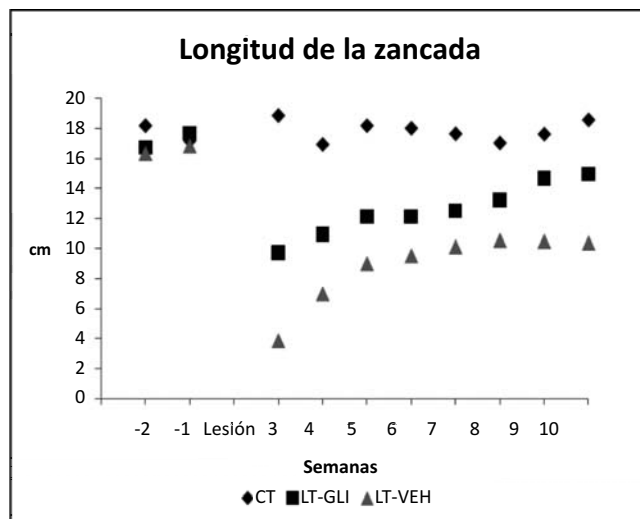


Figura 1. Durante las 2 primeras semanas del entrenamiento antes de la lesión traumática de la médula espinal, los tres grupos tienen similar longitud de zancada. El grupo con glicina se aproxima más al nivel motor del grupo control. Entre los tres grupos hubo diferencia significativa (CT vs LT+GLI, $p < 0.01$; CT vs LT+VEH, $p < 0.01$; LT+GLI vs LT+VEH, $p < 0.01$). (CT: control; LT+GLI: lesión traumática y glicina; LT+VEH: lesión traumática y vehículo).

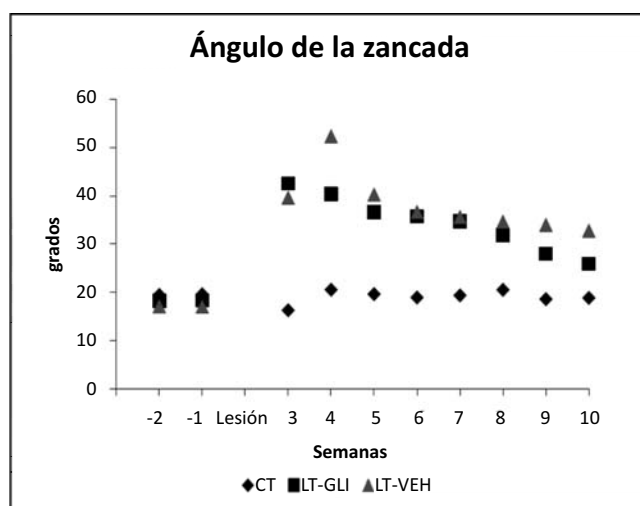


Figura 2. Se observó diferencia significativa entre el grupo control y ambos grupos lesionados, pero no entre estos; sin embargo, al final del experimento, el grupo con glicina mostró un ángulo más cercano al grupo control. (CT vs LT+GLI, $p < 0.01$; CT vs LT+VEH, $p < 0.01$; LT+GLI vs LT+VEH, no significativa, $p > 0.05$). (CT: control; LT+GLI: lesión traumática y glicina; LT+VEH: lesión traumática y vehículo).

RESULTADOS

Inicialmente la LTME alteró severamente la función motora, en el grupo con vehículo como los tratados con glicina, produciendo espasticidad y pérdida total de movimiento de las extremidades inferiores. El grupo control mostró una conducta motora normal, manteniéndose de esta manera en las diferentes pruebas motoras empleadas

durante todo el experimento.

Longitud y ángulo de la zancada

El nivel de recuperación después de 8 semanas poslesión, fue mejor en el grupo de ratas con glicina (figura 1, 2), aún que esta recuperación no fue estadísticamente significativa.

Barra de equilibrio

La prueba de la barra examina mayor complejidad motora que las pruebas anteriormente mencionadas. La LTME altera completamente la ejecución de esta prueba. Dos semanas después de la lesión cuando las ratas ya podían soportar su peso, el grado de error fue con claridad significativo con respecto al grupo control. Funcionalmente la tendencia de ambos grupos lesionados fue hacia la disminución de errores, en particular en el caso del grupo de ratas con LTME y glicina aunque no fue significativa con respecto al grupo de ratas con lesión y vehículo (figura 3).

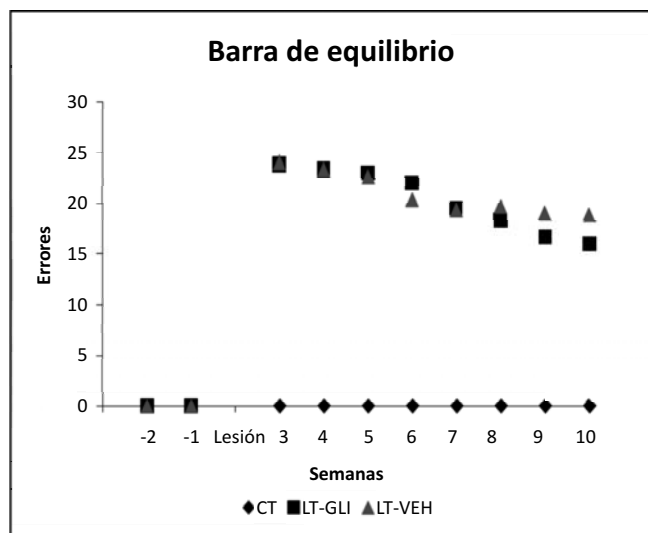


Figura 3. En la prueba de la barra, los animales con lesión traumática de la médula espinal recuperan parcialmente la habilidad motora, no hay diferencia estadísticamente significativa entre ellos, pero si respecto al grupo control (CT vs LT+GLI, $p < 0.01$; CT vs LT+VEH, $p < 0.01$; LT+GLI vs LT+VEH, no significativa, $p > 0.05$). (CT: control; LT+GLI: lesión traumática y glicina; LT+VEH: lesión traumática y vehículo).

DISCUSIÓN

Se provocó lesión traumática incompleta en médula espinal de la rata, con la hipótesis de la administración inmediata de glicina influenciaría sobre el proceso de recuperación funcional motora. Examinando el patrón básico de la marcha a través del análisis de huellas sobre una superficie plana y de barra de equilibrio, que examina la integración

detallada de destrezas sensorimotoras, los cuales constituyen un indicador confiable de la alteración en los movimientos locomotores, en correlación con la extensión de la lesión de la médula espinal. Observamos que la lesión traumática de la médula espinal, altera los patrones complejos de integración sensorimotora, en cambio en el grupo de ratas control, sin lesión, no se modifica el grado de coordinación sensorimotora: la administración de dosis bajas de glicina no tuvo un efecto estadísticamente significativo en la recuperación funcional después de la LTME.

La recuperación funcional espontánea del grupo de ratas con LTME y vehículo, fue parcial y gradual. Debido a la contribución de los mecanismos que intervienen en la recuperación funcional, como son, el restablecimiento del desbloqueo de axones dañados; la remielinización de axones supervivientes; así como, las contribuciones de las vías espinales sensoriales; motoras y autónomas después de LME aún no completamente entendidas.

Tanto el largo y ángulo de zancada son parámetros que requieren una coordinación e integración y control voluntario menor que la prueba de la barra de equilibrio, lo cual explica que la habilidad motora gruesa (largo y ángulo de zancada) mejora sustancialmente después de la LTME, en tanto que la recuperación motora fina (barra de equilibrio) es mas limitada. Es sin duda sorprendente la recuperación espontánea de la rata después de la lesión medular. Las ratas con lesión y glicina exhiben una mejora progresiva en la marcha tanto en las pruebas de superficie plana (largo y ángulo de zancada) como sobre la barra, en mayor grado que las ratas lesionadas tratadas sólo con vehículo, aunque esta mejora no fue estadísticamente significativa. No se usó el ancho de la zancada, ya que en la literatura se ha reportado que este parámetro de la marcha varía muy poco en la lesión experimental de la médula espinal. Lo que sugiere se trate de una respuesta adaptativa a la variabilidad de la habilidad locomotora gruesa.

Aunque la tendencia general del grupo con LTME y glicina hacia la reducción del déficit funcional no es significativa, las observaciones hacen pensar que existe la posibilidad de que la glicina podría mejorar la actividad motora. Además se sabe que después de la LME disminuyen los niveles de glicina y su elevación inhibe la actividad nerviosa evocada por los receptores NMDA, y con ello se disminuiría el efecto de la excitotoxicidad. Otro de los efectos de este aminoácido se relacionaría con el óxido nítrico (ON), ya que esta molécula, promueve la recaptura e inhibe la liberación de glicina, que después de la LTME se incrementa la actividad y expresión de su enzima de síntesis, la óxido nítrico sintasa. El ON participa en la patogénesis de la lesión secundaria, debido a su capacidad de generar radicales libres. En tanto que la inhibición de la óxido nítrico sintasa en su isoforma neuronal (nONS) es importante en la neuroprotección y sobre las alteraciones motoras

después de LME. La administración de glicina bloquearía el ingreso de calcio y con ello la activación de la nONS y otras isoformas que se encuentran en el parénquima medular de tal manera que disminuyera la síntesis del ON y con ello su participación en la producción de radicales libres. Además de disminuir una cascada compleja donde la elevación del calcio es el factor principal, que desemboca en la muerte celular.

Por las implicaciones que tiene la LME, es interesante examinar profundamente el papel de la glicina en el tratamiento de la lesión de la médula espinal.

CONCLUSIONES

La LTME altera la función motora de la rata, la cual fue valorada de manera adecuada por la batería de pruebas motoras empleadas. El proceso de restauración funcional en la lesión aguda de la ME no fue afectado significativamente por pequeñas dosis de glicina inmediatamente después de la LTME. A pesar de esto, la administración de glicina mostró cierto grado de recuperación por encima del grupo con LTME y vehículo. La importancia de este trabajo estriba en el tratamiento farmacológico con dosis bajas de glicina en la LME. Por lo que creemos importante la necesidad de mejorar nuestro conocimiento en el abordaje farmacológico de la LME con otras dosis de glicina aprovechando entre otras cosas su bajo costo, y el incremento constante en la literatura demostrando el efecto de este aminoácido sobre la recuperación del daño celular y administración de otros fármacos, por ejemplo la desferroxamina, para evitar la actividad prooxidante del hierro o un inhibidor de la oxidonítrico sintasa, para reducir la inflamación después de la lesión de la médula espinal.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Carlos Francisco Argüelles y a la M. en C. Ma. Carmen Parra Cid, por su apoyo al contenido científico de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Buchanan E, Nawoczenski D. An overview. Spinal cord injury: concepts and management approaches: Editorial William and Wilkins, 1997.
- Adams MM, Hicks AL. Spasticity after spinal cord injury. *Spinal Cord* 2005; 43: 577-86.
- Kita M, Goodkin DE. Drugs used to treat spasticity. *Drugs* 2000; 59(3):487-95.
- Bender del Busto JA, Hernández E, Prida M, Araujo F, Zamora P. Caracterización clínica de pacientes con lesión medular traumática. *Rev Mex Neurosci* 2002;3(3):135-42.
- Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, Petratos S. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis.* 2004; 15(3):415-36.
- Mautes A EM, Weinzierl MR, Donovan F, Noble LJ. Vascular events after spinal cord injury: Contribution to secondary pathogenesis. *Physical Therapy* 2000;89(7):673-8.
- Tator HT. Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain pathology* 1995;5:407-13.
- Faden AI, Demediuk P, Panter SS, Vink R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* 1989; 244(4906):798-800.
- Panter S, Faden AI. Pretreatment with NMDA antagonists limits release of excitatory amino acids following traumatic brain injury. *Neuroscience Letters* 1992;136(2):165-8.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002; 82 (1): 47-95.
- Bao F, John SM, Chen Y, Mathison RD, Weaver LC. The tripeptide phenylalanine-(d) glutamate-(d) glycine modulates leukocyte infiltration and oxidative damage in rat injured spinal cord. *Neuroscience* 2006; 14083:1011-22.
- Azbill R, Mu X, Bruce-Keller A, Mattson M, Springer J. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res.* 1997; 765: 283-90.
- Paredes MA. Mecanismos patofisiológicos de la lesión traumática de la médula espinal. En Paredes MA. Influencia de la desferroxamina sobre el nivel de hierro después de lesión traumática de la médula espinal en rata. Tesis de maestría 2005:16-8.
- Vavrek RJ, Girgis W, Tetzlaff G, Hiebert W, Fouad K. BDNF promotes connections of corticospinal neurons onto spared descending interneurons in spinal cord injured rats. *Brain* 2006;129:1534-45.
- Zhang L, Peoples R, Oz M, Judith Harvey-White J, Weight F, Brauneis U. Potentiation of NMDA receptor-mediated responses by dynorphin at low extracellular glycine concentrations. *J Neurophysiol* 1997;78(2):582-90.
- Ahmadi S, Muth-Selbach U, Lauterbach A, Lipfert P, Neuhofer W, Zeilhofer UH. Facilitation of Spinal NMDA Receptor Currents by Spillover of Synaptically Released Glycine. *Science* 2000; 3300 (5628): 2094-7.
- Madry Ch, Betz H, Geiger J, Laube B. Potentiation of glycine-gated NR1/NR3A NMDA receptors relieves Ca²⁺-dependent outward rectification. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2010; (3):1-8.
- Simpson RK Jr, Gondo M, Robertson CS, Goodman JC. The influence of glycine and related compounds on spinal cord injury-induced spasticity. *Neurochem Res* 1995; 20 (10):1203-10.
- Baskys A, Bayazitov I, Fang L, Blaabjerg M, Poulsen FR, Zimmer J. Group I metabotropic glutamate receptors reduce excitotoxic injury and may facilitate neurogenesis. *Neuropharmacology* 2005; 49 (Suppl 1): 146-56.
- De Leon R, Roy R, Edgerton R. Is the recovery of stepping following spinal cord injury mediated by modifying existing neural pathways or by generating new pathways? a perspective. *Physical Therapy* 2001; 81 (12):1904-11.
- Matilla B, Mauriz JL, Culebras M, González-Gallego J, González P. La glicina: un nutriente antioxidante protector celular. *Nutr Hosp* 2002;17(1):2-9.
- Wheeler M, Stachlewitz RF, Yamashina S, Ikejima K, Morrow AL, Thurman RG. Glycine-gated chloride channels in neutrophils attenuate calcium influx and superoxide production. *FAESB J.* 2000; 14: 476-84.
- Miyazato M, Sugaya K, Nishijima S, Ashitomi K, Hatano T, Ogawa Y. Inhibitory effect of intrathecal glycine on the micturition reflex in normal and spinal cord injury rats. *Exp Neurol* 2003; 183(1): 232-40.
- Simpson RK Jr, Robertson CS, Goodman JC. The role of glycine in spinal shock. *J Spinal Cord Med.*1996; 19(4):215-24.
- Hall P, Smith J, Mote T, Campbell R. Glycine and experimental spinal spasticity. *Neurology* 1979;29:262-7.

26. Smith J, Hall P, Galvin M. Effects of glycine administration on canine experimental spinal spasticity and the level of glycine, glutamate, and aspartate in the lumbar spinal cord. *Neurosurg.* 1979;4:153-6.
27. Kehne J, Ketteler H, Kane J, McCloskey TC, Senyah Y, Palfreyman M. MDL 27,531 reduces spontaneous hindlimb contractions in rats with chronic transections of the spinal cord. *Neuroscience Letters* 1992;147:101-5.
28. Lee A, Patterson V. A double-blind study of L-threonine in patients with spinal spasticity. *Acta Neurologica Scandinavica* 1993;88 (5):334-8.
29. Oda M, Kure S, Sugawara T, Yamaguchi S, Kojima K, Shinka T, et al. Direct correlation between ischemic injury and extracellular glycine concentration in mice with genetically altered activities of the glycine cleavage multienzyme system. *Stroke* 2007;38; 2157-64.
30. Knight J. Neural mechanisms of attention: The northern California years. *Neural Plasticity* 2000;7(1-2):127-31.
31. Hruska RE, Kennedy S, Silbergeld EK. Quantitative aspects of normal locomotion in rats. *Life Sciences* 1979;25:171-80.
32. Saadoun S, Bell A, Verkman A, Papodoupoulos M. Greatly improved neurological outcome after spinal cord compression injury in AQP4-deficient mice. *Brain* 2008;131:107-1098.
33. Fenrich K, Rose K. Spinal interneuron axons spontaneously regenerate after spinal cord injury in the adult feline. *J Neurosci* 2009;29:12145-58.
34. Grillner S. The spinal locomotor CPG: a target after spinal cord injury. En L. McKerracher, G. Doucet and S. Rossignol, Editores. *Progress in Brain Research*, Vol. 137 Elsevier Science B.V. 2002.
35. Grill R, Murai K, Blesch A, Gage FH, Tuszynski MH. 3 Cellular Delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci* 1997; 17(14):5560-72.
36. Karimi-Abdolrezaee S, Eftekharpour E, Wang J, Morshead CM, Fehlings MG. Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury. *J Neurosci* 2006;26(13):3377-89.
37. McEwen ML, Springer JE. Quantification of locomotor recovery following spinal cord contusion in adult rats. *J Neurotrauma* 2006; 23 (11): 1632-53.
38. Budai D, Wilcox GL, Larson A. Enhancement of NMDA-evoked neuronal activity by glycine in the rat spinal cord in vivo. *Neuroscience Letters* 1992; 135:265-8.
39. Diaz-Ruiz A, Vergara P, Perez-Severiano F, Segovia J, Guizar-Sahagun J, Ibarra A, et al. Cyclosporin-A inhibits constitutive nitric oxide synthase activity and neuronal and endothelial nitric oxide synthase expressions after spinal cord injury in rats. *Neurochem Res* 2005; 30(2):245-51.
40. Schulz JB, Matthews RT, Flint M. Role of nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Curr Opin in Neurology* 1995;8:480-6.
41. Sharma H S, Westman J, Olsson Y, Alm P. Involvement of nitric oxide in acute spinal cord injury: an immunocytochemical study using light and electron microscopy in the rat. *Neurosci Res* 1996; 24 (4):373-84.
42. Sharma HS, Badgaiyan RD, Alm P, Mohanty S, Wiklund L. Neuroprotective effects of nitric oxide synthase inhibitors in spinal cord injury induced pathophysiology and motor functions: an experimental study in the rat. *Ann. N.Y. Acad Sci* 2005;1053:422-34.
43. Hausmann ON. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord* 2003;41:369-78.
44. Díaz-Ruiz A, Vergara P, Pérez-Severiano F, Segovia J, Guizar-Sahagún G, et al. Cyclosporin-A inhibits constitutive nitric oxide synthase activity and neuronal and endothelial nitric oxide synthase expressions after spinal cord injury in rats. *Neurochem Res* 2005;30(2):245-51.
45. Urushitani M, Nakamizo T, Inoue R, Sawada H, Kihara T, Honda K, et al. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated mitochondrial Ca^{2+} overload in acute excitotoxic motor neuron death: a mechanism distinct from chronic neurotoxicity after Ca^{2+} influx. *J Neurosci Res* 2001;63(5):377-87.
46. Qu W, Ikejima K, Zhong Z, Waalkes MP, Thurman RG. Glycine blocks the increase in intracellular free Ca^{2+} due to vasoactive mediators in hepatic parenchymal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver* 2002; 283:G1249-G55.