



Università Campus Bio-Medico di Roma

Corso di dottorato di ricerca in
scienze della plasticità d'organo
e della rigenerazione tissutale
per il recupero funzionale
XXV ciclo anno 2010

**Ruolo rigenerativo del Nerve Growth Factor
nelle patologie degenerative oculari**

Dott. Flavio Mantelli

Coordinatore
Prof. Raffaele Antonelli Incalzi

Tutore
Prof. Stefano Bonini

23 Aprile 2013

INDICE

ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	
1.1 - Il nerve growth factor: cenni storici	4
1.2 - Struttura del nerve growth factor	7
1.3 - Il gene del nerve growth factor	9
1.4 - Sorgenti di nerve growth factor	10
1.5 - Spettro di azione del nerve growth factor in condizioni fisiologiche	12
1.6 - Meccanismo d'azione del nerve growth factor	17
1.7 - Meccanismi di traduzione del segnale	21
1.12 - Nerve growth factor nel sistema visivo	27
1.12.1 – Segmento anteriore	27
1.12.2 – Retina e nervo ottico	32
1.13 – Nerve Growth Factor nelle patologie degenerative oculari	35
1.13.1 – Disfunzione lacrimale e occhio secco	35
1.13.2 – Ulcere corneali	36
1.13.3 – Congiuntivite allergica	37
1.13.4 – Degenerazioni retiniche e glaucoma	38
RISULTATI SPERIMENTALI	
2.1 – Ruolo del NGF nella disfunzione lacrimale e nell'occhio secco	40
2.2 – Ruolo del NGF nella cheratite neurotrofica	48
2.3 – Ruolo del NGF nella congiuntivite allergica	52
2.4 – Ruolo del NGF nelle degenerazioni retiniche	54
2.5 – Ruolo del NGF nel glaucoma	58
ELENCO PUBBLICAZIONI PERSONALI ALLEGATE	61
BIBLIOGRAFIA	63

ABSTRACT

Il nerve growth factor (NGF), capostipite della famiglia delle neurotrofine, è stato scoperto agli inizi degli anni '50. Le prime ricerche sul NGF hanno ben caratterizzato le sue molteplici attività a livello del sistema nervoso centrale e periferico. A partire dagli anni '80, è stato dimostrato come questa neurotrofina agisca su molti altri organi e tessuti modulando la risposta del sistema immunitario ed endocrino. Dagli inizi degli anni '80, è stata dimostrata la sua azione anche sul sistema visivo sia a livello delle vie nervose centrali che del nervo ottico e della retina. Dalla metà degli anni '90 abbiamo, per la prima volta, dimostrato un ruolo fondamentale del NGF nella fisiopatologia della superficie oculare, in particolare nel trofismo e nei meccanismi riparativi corneali e nella risposta immunitaria. Gli studi sperimentali in vitro e in modelli animali, hanno consentito di identificare nuovi meccanismi fisiopatologici e di prospettare il possibile impiego in terapia del NGF per somministrazione topica. Infatti, studi successivi hanno dimostrato l'efficacia terapeutica della somministrazione del NGF in collirio per il trattamento delle ulcere corneali neurotrofiche ed autoimmuni, che non rispondevano alle terapie convenzionali. Studi sperimentali dimostrano come in realtà l'impiego del NGF risulti efficace in un ampio gruppo di patologie della superficie oculare, incluse la cheratocongiuntivite secca e la cheratite erpetica.

Inoltre la dimostrazione che il NGF somministrato in collirio raggiunge la retina ed il nervo ottico in concentrazioni biologicamente attive, apre nuove prospettive terapeutiche per il trattamento di patologie degenerative della retina e del nervo ottico. La conferma nell'uomo dell'efficacia del trattamento con NGF in collirio nelle affezioni del segmento posteriore oculare introdurrebbe la terapia neuroprotettiva e/o neurorigenerativa, attualmente solo ipotizzata, tra i trattamenti clinici effettuabili di routine.

INTRODUZIONE

1.1 - Il nerve growth factor: cenni storici

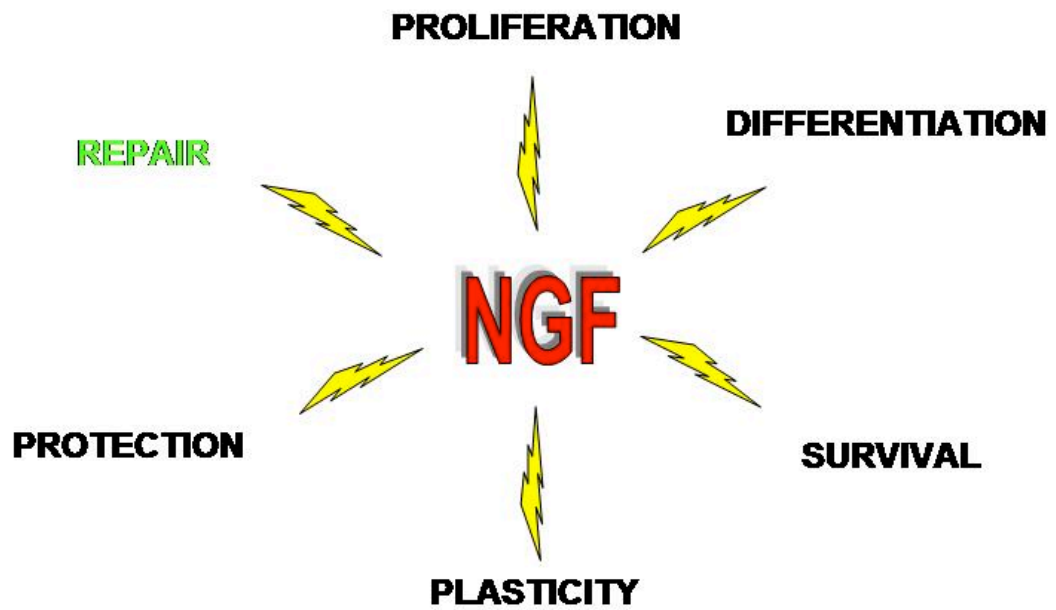
Il Nerve Growth Factor (NGF) è il primo membro di una famiglia di proteine, le Neurotrofine (NTs), in grado di influenzare lo sviluppo, il mantenimento delle funzioni biologiche e la rigenerazione dei neuroni. L'NGF esercita una funzione chiave nella formazione del Sistema Nervoso Simpatico e la sua scoperta ha rappresentato un passo importante nello studio dei meccanismi di crescita e di differenziazione della cellula nervosa (Levi Montalcini, 1966).

La sua scoperta è avvenuta nell'Istituto di Zoologia diretto da Viktor Hamburger della Washington University, dove nel 1950 E.D. Bueker ebbe l'intuizione di impiantare nella parete addominale di embrioni di pollo, al 3° giorno di sviluppo, un tumore murino di origine connettivale noto come Sarcoma 180. Dopo cinque giorni dall'impianto, in questi embrioni si osservò che i gangli sensitivi adiacenti al tumore erano andati incontro ad un considerevole aumento di sviluppo, processo che aveva interessato anche i gangli simpatici. I tessuti neoplastici erano stati invasi da fibre nervose emergenti ed i visceri dell'embrione erano stati raggiunti da un grande numero di fibre simpatiche in un tempo più rapido rispetto a quello di embrioni di controllo. Identici risultati furono ottenuti trapiantando frammenti del Sarcoma 180 o del Sarcoma 37 (che possiedono caratteristiche molto simili tra loro) nella membrana corion-allantoidea dell'uovo di pollo, che essendo molto vascolarizzato, poteva alimentare sia il tessuto normale in sviluppo, che quello neoplastico (Levi-Montalcini e Hamburger, 1951). Tali osservazioni indussero ad ipotizzare che il tumore fosse in grado di rilasciare un fattore chimico capace di indurre la crescita gangliare, la produzione e la ramificazione atipica delle fibre nervose (Cohen et al., 1954). Questo fattore era capace di svolgere un'azione stimolante sulle cellule nervose sensitive e simpatiche dell'embrione di pollo, agendo per via umorale (Levi-

Montalcini ed Hamburger, 1951). Per verificare se l'NGF fosse un acido nucleico ed una proteina, Cohen e Levi-Montalcini trattarono l'estratto di cellule tumorali con veleno di serpente che contiene le fosfodiesterasi, enzimi capaci di degradare gli acidi nucleici (Cohen et al., 1954). L'aggiunta di aliquote di veleno alla frazione tumorale era in grado di aumentare enormemente l'effetto di crescita del tumore stesso, anziché ridurlo. Aggiungendo inoltre una piccola quantità di veleno ad un mezzo di coltura, privo della frazione tumorale, si aveva la produzione di un fittissimo alone di fibre nervose provenienti dai gangli sensitivi e simpatici del pollo. Nel 1959 Cohen riuscì a purificare l'NGF dal veleno di serpente ed a dimostrare che si trattava di una proteina (Cohen, 1959). Nel 1958 si scoprì che le ghiandole salivari di topo erano un'eccellente fonte per la purificazione dell'NGF, dal momento che esse ne contengono una quantità circa diecimila volte superiore a quella del sarcoma di topo e circa dieci volte maggiore di quella presente nel veleno di serpente (Cohen, 1959; Levi-Montalcini e Angeletti, 1968). Una volta isolato e purificato l'NGF, numerosi studi hanno avuto come finalità l'identificazione della sua struttura chimica, dei siti di sintesi, delle cellule bersaglio e dei meccanismi di azione. La scoperta dell'NGF ha inoltre promosso un'intensa ricerca per identificare altri fattori di crescita della famiglia delle NTs, tra i quali il Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), la Neurotrofina 3 (NT-3), la Neurotrofina 4 (NT-4) e la Neurotrofina 5 (NT-5). Tutti questi fattori di crescita mostrano fra loro una forte omologia, non solo a livello strutturale, ma anche a livello dei siti recettoriali (Ebendal, 1992).

Infine, mentre inizialmente si ipotizzava per l'NGF una funzione ristretta al sistema nervoso, le osservazioni raccolte negli ultimi anni indicano che questo polipeptide può svolgere un'azione molto più ampia come modulatore delle funzioni dell'asse Neuro-Immuno-Endocrino, in particolare nella regolazione dell'omeostasi (Levi-Montalcini et al., 1990) (figura 1).

Figura 1

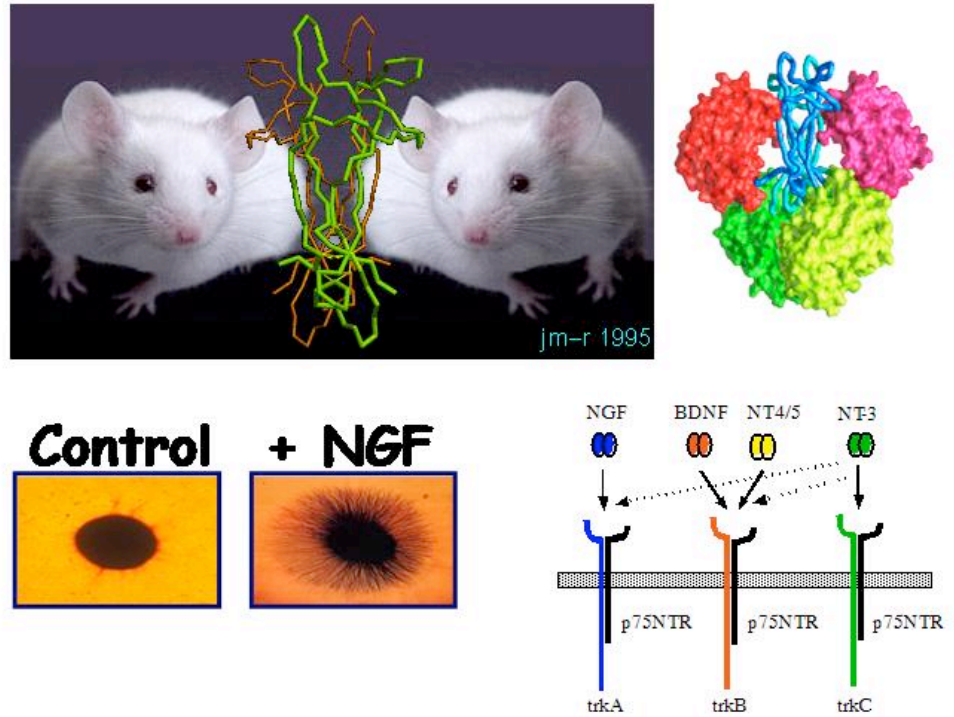


1.2 - Struttura dell'NGF

Dal momento che le ghiandole sottomandibolari di topo sono state ampiamente utilizzate come sorgente per la purificazione dell'NGF la descrizione delle proprietà chimiche sarà limitata all'NGF di topo (Thoenen e Barde, 1980). L'NGF rilasciato dal tessuto ghiandolare e purificato secondo il metodo di Varon et al. (1967) è un complesso molecolare, $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, di 140 KD ed un coefficiente di sedimentazione pari a 7S. La molecola dell'NGF è costituita da tre diverse subunità: α , β e γ . La subunità β (P.M. di 26 KD) rappresenta la forma attiva dell'NGF, mentre la subunità γ è un'arginina peptidasi (P.M. 26 KD). Il ruolo della subunità α (P.M. 26000 Dalton) non è stato ancora completamente chiarito (Thoenen e Barde, 1980). La subunità β , detta anche β NGF, con coefficiente di sedimentazione pari a 2,5S, è costituita da due catene identiche di 118 amminoacidi, ciascuna con un P.M. di 13 KD (Bocchini e Angeletti, 1969). Ogni singola catena è stabilizzata da tre ponti disolfuro (legame covalente), mentre delle forze di legame non covalente garantiscono la formazione della struttura dimerica (Angeletti e Bradshaw, 1971). Le due catene della subunità β vengono sintetizzate a partire da un precursore di più grandi dimensioni, detto pro-NGF, che viene trasformato nel dimero attivo attraverso l'azione proteasica della subunità γ . Le subunità γ , svolta la loro azione proteasica, restano legate al dimero β NGF, al quale si aggiungono anche le subunità α . In tal modo si origina un complesso molecolare capace di proteggere il β NGF da ulteriori azioni proteolitiche indesiderate (Greene e Shooter, 1980). Di recente, la struttura del β NGF è stata ulteriormente chiarita mediante analisi cristallografica. Questa analisi ha rilevato la presenza di tre coppie antiparallele di filamenti, con struttura secondaria di tipo β , in grado di formare una superficie piana lungo la quale si associano le due catene per dare il dimero attivo (Macdonald et al., 1991). Inoltre, su tali catene del β NGF si è evidenziata la presenza di quattro regioni "loop" in cui sono localizzati molti amminoacidi variabili ai quali,

probabilmente, è legata la specificità di riconoscimento da parte del recettore (Ebendal, 1992; McDonald et al., 1991) (figura 2).

Figura 2



1.3 - Il gene dell'NGF

Una volta ottenuta la sequenza primaria dell'NGF murino, con un'indagine bio-molecolare si è determinata la sequenza dell'intero gene che codifica questa proteina. Questo gene è presente in singola copia (sul cromosoma 1) con all'estremità 3', l'esone codificante l'intera sequenza per la catena del β NGF (esone IV) ed all'estremità 5' una serie di piccoli esoni, solo di recente identificati (Selby et al., 1987). Il confronto dell'organizzazione fra il gene murino e la porzione nota del gene umano dell'NGF ha rilevato una perfetta corrispondenza delle dimensioni degli esoni all'estremità 5' e della localizzazione degli introni (Selby et al., 1987; Ullrich et al., 1983). Dal gene murino si ottengono quattro trascritti di diversa lunghezza che codificano tre proteine precursori dell'NGF differenti a livello dell'estremità NH₂-terminale. Questa eterogeneità di trascritti può essere dovuta sia all'utilizzo di differenti siti di inizio di trascrizione, sia a processi di splicing alternativi dell'esone II. Entrambi questi meccanismi molecolari permetterebbero di produrre, da un singolo gene, peptidi simili ma con una diversa localizzazione cellulare. Dal trascritto più corto probabilmente si origina una forma secretoria dell'NGF, mentre dal trascritto di maggiore lunghezza si origina la forma di membrana, capace di interagire con recettori specifici localizzati sulla membrana delle cellule contigue sensibili all'azione dell'NGF (Edwards et al., 1986). Dal clonaggio molecolare del gene per l'NGF di diverse specie (topo, uomo, pollo, bue, maiale, cobra e *Xenopus*), si è evidenziata una forte omologia di sequenza (tra il 66% ed il 98%), indice del fatto che questa molecola si è altamente conservata nel corso dell'evoluzione. Una forte omologia di sequenza è presente anche tra l'NGF e le altre NTs. Tale omologia suggerisce che tutte le NTs appartengono ad una stessa famiglia genica. Su questa base si sono realizzati degli alberi genealogici con un precursore comune, la pro-insulina umana, dalla quale, per i processi di duplicazione e divergenza genica, si suppone siano derivate le differenti forme di neurotrofine attualmente note (Frazier et al., 1972).

1.4 - Sorgenti di nerve growth factor

Dalla scoperta dell'NGF fino ad oggi sono stati individuati molti tessuti in grado di produrre e/o accumulare NGF, sia nei vertebrati inferiori che superiori. L'NGF è sintetizzato e rilasciato in quantità variabili da differenti fonti animali, tra cui alcuni tumori maligni di topo (Levi-Montalcini e Hamburger, 1951), le ghiandole velenifere degli Ofidi (Cohen, 1959), la ghiandola sottomascellare di topo maschio (Cohen, 1960; Levi-Montalcini 1966), la prostata di cavia (Harper, 1979; Harper e Thoenen, 1980), i testicoli di mammifero (Harper e Thoenen, 1980), le parotidi e la tiroide di ratto (Dicou et al., 1986), e la placenta umana (Goldstein et al., 1978). Attualmente la maggior fonte di NGF, utilizzata per la purificazione del fattore, è rappresentata dalle ghiandole sottomandibolari di topo. La ghiandola di topo è costituita da due diverse componenti: gli acini, contenenti mucopolisaccaridi ed i tubuli convoluti. In questi ultimi, caratterizzati da dimorfismo sessuale, oltre ad accumularsi gli enzimi idrolitici, viene sintetizzato ed accumulato l'NGF. In particolare, l'NGF è assente nelle ghiandole dei topi neonati, nei quali i tubuli non sono ancora differenziati; comincia ad apparire nella pubertà e subisce un aumento progressivo negli stadi successivi di sviluppo per raggiungere, infine un plateau nel maschio adulto. Queste osservazioni, correlate al fatto che la concentrazione dell'NGF nelle ghiandole è dieci volte più alta nei topi maschi che nelle femmine, hanno fatto ipotizzare che la sintesi ed il rilascio di NGF siano modulati dall' azione dell' ormone maschile testosterone (Cohen et al., 1960). Infatti l'iniezione di testosterone in femmine di topo aumenta di circa dieci volte il contenuto dell'NGF nelle loro ghiandole salivari, mentre la castrazione dei topi maschi comporta una netta diminuzione dei livelli dell'NGF salivare (Thoenen e Barde, 1980; Levi-Montalcini et al., 1990). Studi compiuti da Aloe e Levi-Montalcini (1979) sugli effetti della tiroxina e del testosterone sulla differenziazione dei tubuli convoluti delle ghiandole salivari e sul contenuto dell'NGF durante le fasi di sviluppo post-natale del topo,

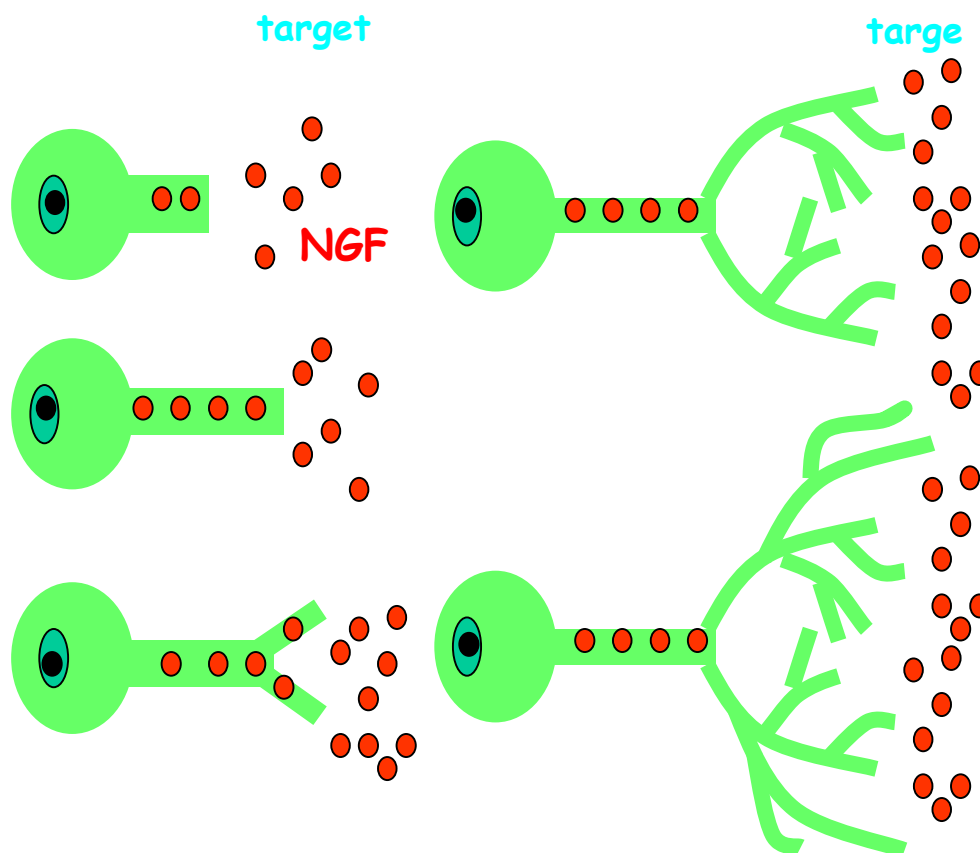
hanno dimostrato che entrambi questi ormoni influenzano la sintesi e l'accumolo dell'NGF nelle ghiandole salivari e che durante la fase pre-puberale, gli effetti della tiroxina sul differenziamento dei tubuli convoluti e sulla produzione dell'NGF sono molto più marcati di quelli del testosterone. Studi di correlazione tra gli ormoni tiroidei e l'NGF sono stati condotti anche a livello del Sistema Nervoso Centrale ed è stato dimostrato che, nei topi neonati ed in quelli adulti, i livelli dell'NGF sono linearmente correlati con i livelli sierici degli ormoni tiroidei, tiroxina (T4) e di 3-idrossitironina (T3) (Walker et al., 1981). Inoltre nel 1986 Aloe e Levi-Montalcini hanno osservato che le lotte intraspecifiche, indotte da un isolamento di 6-8 settimane, stimolano il rilascio massiccio dell'NGF nel sangue di topi maschi adulti. Attraverso studi biologici, radioimmunologici ed immunoistochimici, gli stessi Autori hanno dimostrato che l'NGF è rilasciato nel sangue dopo pochi minuti dal combattimento e raggiunge un valore massimo dopo tre-quattro ore (Aloe e Levi-Montalcini, 1986). Poichè le lotte intraspecifiche rappresentano un noto modello di stress, questi studi hanno messo in evidenza una stretta correlazione fra l'NGF rilasciato e lo stress in corso. Questo rapporto tra NGF e stress, era stato messo in luce per la prima volta da Otten (Otten et al., 1979), che mediante somministrazione intravenosa di NGF in ratti adulti aveva indotto uno stimolo dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene, la cui attivazione è noto essere strettamente associata ad una condizione di stressogena. Sicuramente le ghiandole salivari hanno un ruolo attivo nel mantenere i livelli di NGF nel sangue, ma non ci sono prove a favore dell'ipotesi che esse siano essenziali o almeno necessarie per l'utilizzo di tale neurotrofina da parte delle cellule bersaglio. Una delle tante questioni che resta ancora da chiarire è se questa NTs, presente in così grandi quantità nelle ghiandole salivari murine, possa avere anche altre funzioni, alcune connesse con la digestione, altre collegate alla produzione ed al rilascio di sostanze tossiche nella saliva stessa (Levi-Montalcini e Angeletti, 1968).

1.5 - Spettro di azione dell'NGF in condizioni fisiologiche

E' ormai ampiamente noto che nel Sistema Nervoso Periferico (SNP), l'NGF è essenziale per la sopravvivenza dei neuroni simpatici e sensitivi in ristretti periodi dello sviluppo embrionale (Levi-Montalcini e Angeletti, 1968; Thoenen e Barde, 1980). L'NGF regola la sintesi di specifici enzimi necessari per la sintesi delle catecolamine e di peptidi neurospecifici, come la Sostanza P, la Somatostatina e la Colecistochinina (Otten, 1984). Queste azioni di regolazione sono svolte dall'NGF non solo durante il periodo differenziativo ma anche nell'adulto (Thoenen et al., 1987). L'azione biologica dell'NGF si esplica attraverso il flusso retrogrado assonale, mediante il quale l'NGF, captato dalle terminazioni nervose, raggiunge il corpo cellulare muovendosi con una velocità di 2,5 mm/ora lungo l'assone (Hendry et al., 1974a). Attraverso questo trasporto retrogrado assonale, l'NGF raggiunge il soma delle cellule bersaglio, dove innesca una serie di processi metabolici e sintetici (Hendry et al., 1974b; Schwab e Thoenen, 1977; Schwab, 1977). Il processo di captazione dell'NGF è altamente specifico (Stockel et al., 1974) ed comporta il legame con il recettore specifico presente sulla membrane delle terminazioni nervose (Thoenen e Barde, 1980). Il complesso recettore-NGF viene internalizzato e mediante il trasporto retrogrado assonale (associato ai neurotubuli) raggiunge il corpo cellulare all'interno di piccole vescicole (clatrina) che si vanno a fondere con altre membrane intracellulari e con strutture lisosomiali (Schwab e Thoenen, 1977; Schwab, 1977). Sulle cellule bersaglio, l'NGF esercita una serie di azioni (figura 3) che possono essere schematizzate in:

- a) azione trofica;**
- b) azione tropica;**
- c) azione differenziativa**

Figura 3



a) azione trofica. In uccelli e mammiferi, l'NGF è indispensabile per il mantenimento e la sopravvivenza di due popolazioni neuronali ben distinte: i neuroni adrenergici della catena simpatica ed i neuroni sensitivi originatisi dalla cresta neurale. Sebbene l'effetto dell'NGF si estenda ai neuroni sensitivi di alcuni gangli cefalici, la maggior parte delle ricerche hanno riguardato i gangli delle radici dorsali (DRG) del midollo spinale; nei DRG, nei primi stadi dello sviluppo embrionale, le cellule recettive all'NGF rappresentano il 50% della popolazione cellulare complessiva. Il loro numero si riduce nettamente negli ultimi stadi di sviluppo embrionale, a causa di

una morte neuronale che determina la scomparsa di circa la metà dei neuroni gangliari (Levi-Montalcini e Hamburger, 1951; Landmesser e Pilar, 1976). Indagini effettuate su roditori adulti e su altre specie animali hanno evidenziato che il numero delle cellule recettive all'NGF ammonta a circa il 20% della popolazione neuronale complessiva dei DGR (Landmesser e Pilar, 1976). Questi neuroni recettivi all'NGF sono capaci di sintetizzare e rilasciare la sostanza P ed appartengono alla categoria dei piccoli neuroni di senso (Schwartz e Costa, 1979; Otten et al., 1985a). I loro sottili assoni amielinici terminano negli strati superficiali delle corna dorsali del midollo spinale ed attraverso un interneurone trasportano segnali nocicettivi al fascio spino-talamico laterale. Il 90% della sostanza P prodotta nei corpi cellulari viene trasportata antidromicamente ai terminali periferici, dove il rilascio di sostanza P può essere evocato da stimoli elettrici e fisiologici. Il ruolo fisiologico essenziale dell'NGF per i neuroni sensitivi e simpatici durante gli stadi di sviluppo è stato dimostrato analizzando gli effetti provocati dalla deprivazione dell'NGF circolante, ottenuta somministrando anticorpi specifici (immunosimpatectomia; Levi-Montalcini e Angeletti, 1968; Aloe et al., 1981) o impedendo l'accesso dell'NGF al corpo cellulare mediante farmaci che bloccano la captazione delle terminazioni nervose, come la 6-idrossidopamina (6-OHDA) (Angeletti e Levi-Montalcini, 1969) o la vinblastina che impediscono il trasporto retrogrado assonale (Calissano et al., 1978). In tutti questi esperimenti si giunge ad una riduzione, più o meno accentuata a seconda dello stadio di sviluppo, dei neuroni recettivi all'NGF a seguito della degenerazione neuronale che però può essere prevenuta con la somministrazione dell'NGF esogeno (Levi-Montalcini, 1976), il cui potere protettivo è legato con tutta probabilità all'utilizzo di una via di accesso alternativa alla cellula.

b) Azione tropica. Il fenomeno noto col termine di “neurotropismo”, ossia la capacità di promuovere e dirigere la crescita neuritica lungo un gradiente di concentrazione, è un'altra importante azione esercitata dall'NGF sulle cellule

bersaglio. Infatti oltre a svolgere una funzione essenziale per la sopravvivenza dei neuroni simpatici e sensitivi, l'NGF è anche capace di conferire direzionalità alle fibre nervose in via di crescita verso gli organi bersaglio. Il primo ad ipotizzare l'esistenza di questo fenomeno definendolo "neurotropismo" fu il grande neurologo spagnolo Santiago Ramón y Cajal che con questo termine definì la capacità dei fattori di crescita di promuovere e dirigere la crescita neuritica. Esperimenti in vivo ed in vitro hanno fornito la dimostrazione del ruolo tropico dell'NGF. La prima evidenza dell'effetto tropico dell'NGF si è ottenuta da esperimenti su ratti e topi neonati, sottoposti ad iniezione intracerebrale (IV° ventricolo) giornaliera dell'NGF (Levi-Montalcini, 1976). Dopo 7 giorni di trattamento si poteva osservare sulla catena dei gangli simpatici una crescita di fibre adrenergiche attraverso il midollo spinale in direzione della sorgente endocerebrale dell'NGF. Una dimostrazione ancora più diretta di questa azione è stata ottenuta con esperimenti su culture cellulari di gangli sensitivi di embrioni di pollo di otto giorni (Gundersen e Barret, 1979). In questo caso la sorgente dell'NGF era costituita da un microcapillare contenente una soluzione concentrata del fattore, e la direzione di crescita assonale variava in base alla posizione della sorgente locale dell'NGF.

c) azione differenziativa. L'NGF non agisce solo sulla sopravvivenza neuronale, ma interviene anche sul differenziamento, determinando una serie di modificazioni strutturali e biochimiche sulla cellule nervose (Levi-Montalcini e Angeletti, 1968; Mobley, 1977). I neuroni simpatici maturi, noto bersaglio dell'NGF, rispondono a questo fattore con un forte aumento dell'attività metabolica, così da fornire l'energia ed i materiali necessari alla crescita delle fibre nervose ed alla produzione di neurotrasmettitori. In particolare, le cellule che rispondono all'NGF incrementano la loro sintesi lipidica, proteica, trasportano al loro interno gli amminoacidi circolanti e metabolizzano più rapidamente il glucosio ed altri componenti ricchi di energia (Levi-Montalcini e Angeletti, 1968). Sempre in risposta

all'interazione NGF-recettore, la cellula nervosa va incontro ad un'estesa riorganizzazione dei costituenti proteici del citoplasma; le strutture filamentose dei microtubuli e dei neurofilamenti subiscono un forte aumento che li porta a riempire lo spazio fra il nucleo e la membrana, fornendo così la struttura portante e la forza propulsiva necessarie per l'allungamento della cellula nervosa; inoltre si osserva un aumento sia dei ribosomi liberi che associati al reticolo endoplasmatico ed un maggiore sviluppo del Golgi (Angeletti e Bradshaw, 1971). Prove a sostegno dell'azione differenziativa dell'NGF sono state fornite dallo studio condotto sulle cellule cromaffini che, come le cellule simpatiche, originano da uno stesso precursore cellulare derivante dalla cresta neurale. In particolare Aloe e Levi-Montalcini hanno dimostrato che iniezioni di NGF, eseguite dal 17° giorno di gestazione fino al 10° giorno di vita, determinano a livello della midollare del surrene di ratto la trasformazione delle cellule cromaffini non ancora differenziate, e dei loro precursori, in cellule nervose simpatiche (Aloe e Levi-Montalcini, 1979). Inoltre l'effetto più caratteristico dell'azione differenziativa dell'NGF a livello del SNP è rappresentata dalla sua capacità di induzione selettiva della tirosinidrossilasi e della betaidrossilasi, enzimi impegnati nella via biosintetica della noradrenalina e presenti nelle cellule simpatiche noradrenergiche (Thoenen et al., 1971).

1.6 - Meccanismo d'azione dell'NGF

I neuroni simpatici e sensitivi, con particolare riferimento a quelli dei gangli dorsomediali di pollo, rappresentano un modello adeguato per poter dimostrare le tre azioni dell'NGF: il ruolo trofico, durante gli stadi precoci di sviluppo; la capacità di favorire i processi differenziativi, come la crescita neuritica; e l'azione tropica, ossia la capacità di guidare la crescita o la rigenerazione neuritica lungo un gradiente di concentrazione. Se le cellule sensitive e simpatiche hanno giocato un ruolo chiave nel rilevare queste proprietà tipiche dell'NGF, la linea cellulare clonale derivata da un feocromocitoma di topo, detta PC12, è divenuta il modello sperimentale più utilizzato per lo studio della capacità dell'NGF di modulare espressioni fenotipiche e meccanismi molecolari. Le PC12 in presenza di NGF vanno incontro a differenziamento e conversione fenotipica in cellule nervose simpatiche (Greene e Tischler, 1976). I cambiamenti che avvengono a livello biochimico, morfologico ed ultrastrutturale le rendono così simili alle cellule nervose. In particolare, la presenza dell'NGF determina nelle PC12 un aumento dei livelli di tubulina, delle proteine associate ai microtubuli (MAP1, MAP2) e dei neurofilamenti necessari per la crescita neuritica (Black et al., 1986), mentre a livello morfologico si assiste alla formazione di una complessa rete neuritica elettricamente eccitabile (Greene e Tischler, 1976). Sempre nelle PC12 si è osservato che l'azione dell'NGF è possibile grazie alla presenza sulla superficie delle cellule bersaglio di specifiche strutture recettoriali (Landreth e Shooter, 1980); in seguito alla loro interazione, entro pochi minuti, si ha l'attivazione di una serie di potenziali secondi messaggeri quali: l'AMP-ciclico, il calcio ed il fosfoinosidite (Cremins et al., 1986; Pandiella-Alfonso, 1986) ed una variazione nella sintesi di alcune proteine (McGuire, 1978). Questi dati suggeriscono un'azione regolativa dell'NGF a livello del DNA di specifici geni (trascrizione genica). Come altri peptici, l'NGF interagisce con le cellule responsive con una cinetica di equilibrio di legame bifasica (Sutter et al., 1979). Sono attualmente

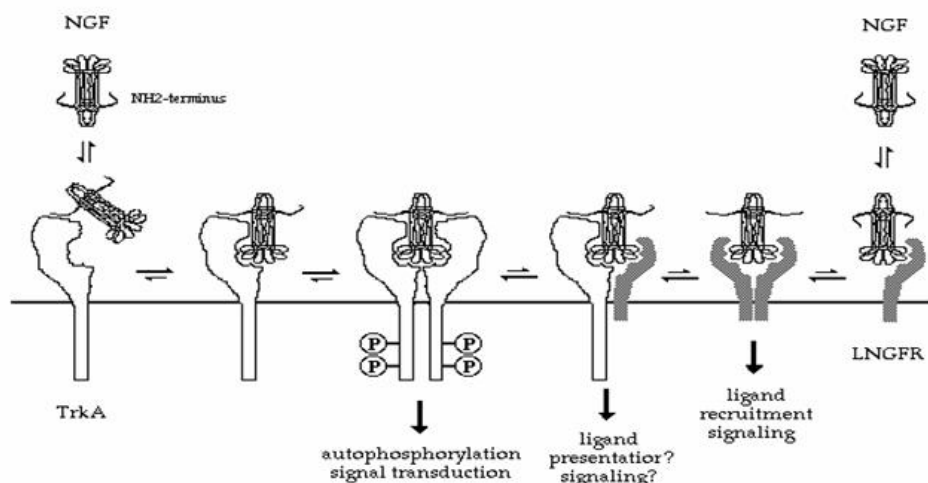
ampiamente studiati i due recettori specifici per l'NGF: il $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$ ed il p75^{NTR} . L'unione dei due recettori determina la formazione di un recettore ad alta affinità ($K_d=10^{-11}\text{M}$), mentre i legami ai singoli recettori mostrano un legame a bassa affinità ($K_d=10^{-9}\text{M}$) (Hempstead et al., 1991). Nel 1986 Greene e coll. hanno dimostrato che dopo esposizione all'NGF le cellule sensibili mostrano una risposta funzionale solo quando il fattore si lega al recettore ad alta affinità (Greene et al, 1986).

Il recettore storico per eccellenza dell'NGF è rappresentato dal p75^{NTR} , il primo ad essere isolato e caratterizzato. Nel 1984, il DNA complementare all'RNAm (cDNA) del recettore dell'NGF è stato isolato, dopo trasferimento genico in cellule umane e PC12 di ratto, con l'utilizzo di un anticorpo monoclonale capace di bloccare od alterare il legame con l'NGF (Chandler et al., 1984). L'analisi di questo cDNA, ottenuto da specie differenti come l'uomo (Johnson et al., 1986), il ratto (Radeke et al., 1987) ed il pollo (Large et al., 1989), ha dimostrato che il recettore per l'NGF è una proteina transmembrana di P.M. pari a 42 KD, che viene glicosilata e raggiunge così un P.M. di 75 KD (p75^{NTR}). Tuttavia la sua espressione associata a quella di altre molecole cellula-specifiche, porterebbe alla formazione del complesso recettoriale ad alta affinità e quindi ad una risposta funzionale del NGF. Questo recettore, sebbene presente in tutte le cellule responsive all'azione dell'NGF, non è però dotato di attività enzimatica.

Studi successivi hanno messo in evidenza la presenza di un altro recettore specifico per l'NGF, con un PM di 140KD. Questa volta, la proteina è dotata di attività tirosin-chinasica e viene codificata dal protooncogene *trk* (Chao, 1991). Basandosi su studi di legame, di cross-reattività e di trasfezione di cDNA (Hempstead et al., 1991; Klein et al., 1991; Loeb et al., 1991) sono stati proposti alcuni modelli in grado di spiegare il legame ad alta affinità ed i meccanismi di trasduzione (Bothwell, 1991).

In uno di questi modelli, probabilmente il più rappresentativo, l'NGF si lega sia ai singoli omodimeri del $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$ e del p75^{NTR} , che al complesso formato dai due recettori (eterodimero) (vedi Figura 4, Hempstead et al., 1991).

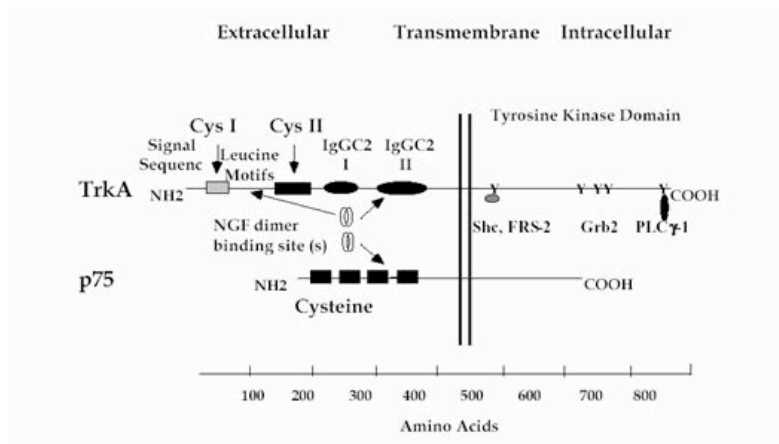
Figura 4



Dopo la scoperta del $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$, dotato di attività tirosin kinasica e di una traduzione del segnale all'interno della cellula altamente complessa, al p75^{NTR} è stato dato un ruolo secondario nel legame con l'NGF (Holtzman et al., 1992). Solo recentemente si è giunti alla conclusione che il legame ad alta affinità dell'NGF con il suo recettore richiede la coespressione dei due diversi prodotti genici: il $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$ ed il p75^{NTR} (figura 5).

Figura 5

Schematic Representation of $trkA^{NGFR}$ and $p75^{NTR}$



1.7 - Meccanismi di traduzione del segnale

I meccanismi successivi al legame dell'NGF alla cellula target sono stati ampiamente studiati e tutt'ora in continua evoluzione. I primi studi a sostegno dell'esistenza di un'attività di trasduzione risalgono al 1988, quando Maher dimostrò che il trattamento con NGF era in grado di promuovere rapidamente nelle cellule PC12 la fosforilazione di alcune proteine non ben identificate (Maher, 1988).

In presenza di $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$, il p75^{NTR} partecipa nella formazione del legame ad alta affinità risultando in un incremento della risposta all'NGF e promuovendo segnali di crescita (Chao and Hempstead, 1995). Oltre a promuovere la crescita, differenziazione e sopravvivenza dei diversi tipi cellulari appartenenti al sistema nervoso, a quello endocrino, a quello immunitario e, come recentemente descritto a quello visivo, l'NGF può paradossalmente indurre un segnale di morte cellulare, completamente divergente da quelli precedenti. ha addirittura prospettato un coinvolgimento del tutto nuovo del $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$ nell'induzione dell'apoptosi in condizioni particolari.

Come ampiamente discusso, l'NGF lega indipendentemente i suoi due recettori: il $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$ ed il p75^{NTR} , mediando una serie di segnali che vanno dalla proliferazione, alla differenziazione e perfino all'apoptosi. Alcuni studi hanno dimostrato che la durata e l'intensità del segnale dipendono dal rapporto $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$ e p75^{NTR} sulla superficie cellulare (Yoon et al., 1998).

TrkA^{NGFR}

Per quanto riguarda il gene *trk*, la sua natura di oncogene venne evidenziata grazie alla formazione di foci nelle cellule 3T3 (Chao, 1991). L'evento genomico che determina la trasformazione maligna di queste cellule consiste in un riarrangiamento genomico in cui le sequenze della tropomiosina non muscolare si fondono in modo aberrante con le sequenze dei domini citoplasmatici e transmembrana di *trk* in tal

modo si creerebbe una proteina citoplasmatica di 70 KD in grado di sfruttare la sua attività catalitica per alterare la capacità replicativa della cellula. Il $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$ ha delle caratteristiche che lo rendono strutturalmente diverso dalla famiglia dei recettori tirosinchinasi a cui appartiene. Infatti, rispetto al recettore per il PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) e a quello dell'EGF (Epidermal Growth Factor), il $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$ possiede un inserto di 14 amminoacidi che interrompe una regione conservata del dominio catalitico ed ha inoltre una coda -COOH terminal più corta (15 amminoacidi).

Il $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$ possiede nel suo dominio extracellulare una serie di segmenti ripetitivi in tandem, ricchi di leucina, legati a loro volta a due clusters di residui di cisteina ed a due domini che sono simili alle regioni C2 delle immunoglobuline e che permettono l'interazione del recettore con proteine superficiali (Ullrich e Schlessinger, 1990). Il legame dell'NGF con il $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$ determina l'autofosforilazione della Tyr-490 posizionata nel dominio intracitoplasmatico, seguito da legame allo stesso sito delle proteine Shc, acquistando la sua attività tirosin-chinasica (RTK-signaling, Meakin e Shooter, 1991; Kaplan et al., 1991; Holtzman et al., 1992) e divenendo così capace di fosforilare tutta una serie di substrati come: la fosfolipasi C (Vetter et al., 1991), la tirosina kinasi Src, la proteina Ras GTP-binding e le proteine chinasi citoplasmatiche (serina/treonina) Raf (Keegan e Halegoua, 1993). Studi sulle cellule PC12 hanno dimostrato che dopo fosforilazione della fosfolipasi C i livelli dell'inositolo trifosfato (IP_3) e del diacilglicerolo (DAG) aumentano determinando la liberazione di calcio dai depositi cellulari e l'attivazione della protein chinasi C (PKC) (Ulrich e Schlessinger, 1990). Tutti gli passaggi coinvolti nella trasduzione del segnale del $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$ all'interno della cellula sono schematizzati in figura 6 e figura 7.

Figura 6

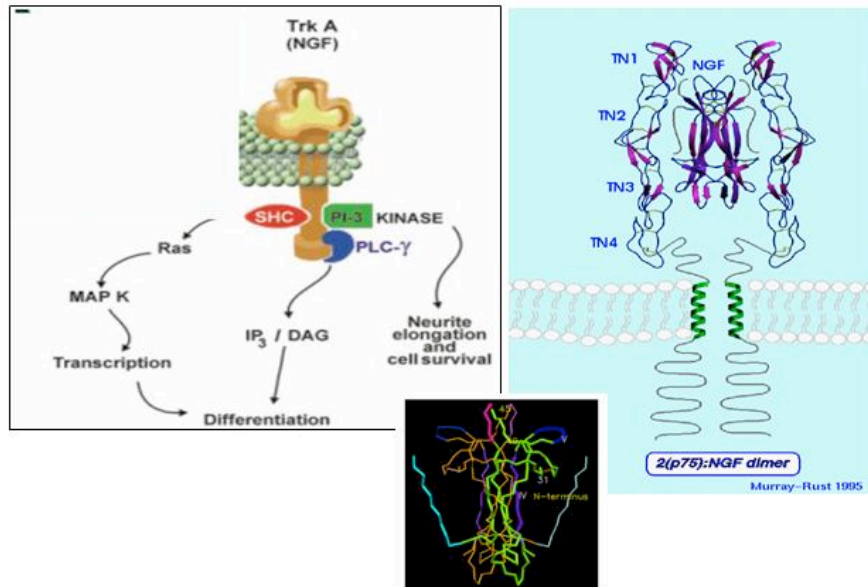
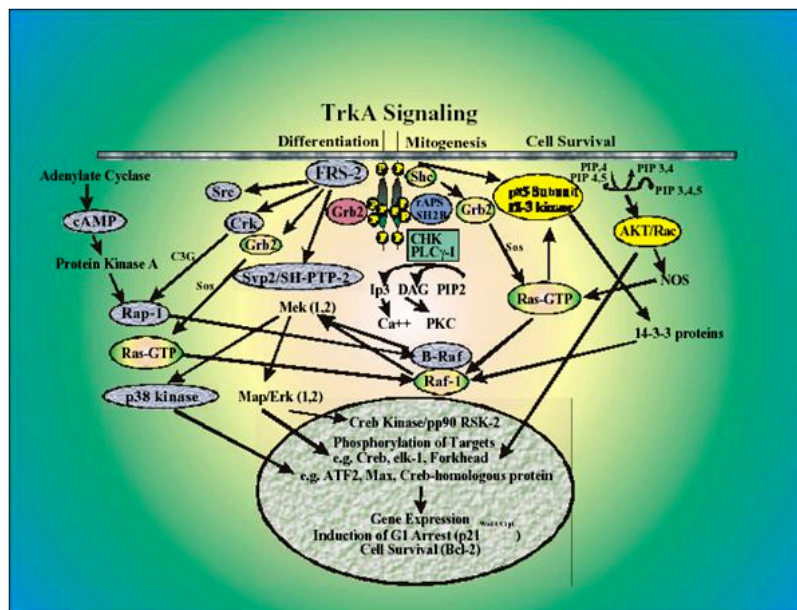


Figura 7



p75^{NTR}

Il p75^{NTR} è stato il primo recettore per l'NGF ad essere scoperto, ma dopo la scoperta del trkA^{NGFR} e della sua attività tirosin-chinasica, il p75^{NTR} è stato relegato in una posizione secondaria, essendo solo un modulatore del segnale del trkA^{NGFR}. Attualmente, il p75^{NTR} sembra in grado di tradurre il segnale dell'NGF in assenza di trkA^{NGFR}, cambiando l'idea che si era creata nell'arco degli anni. Per quanto riguarda il p75^{NTR} attualmente lo studio di questo recettore si è rivelato di grande interesse in virtù della sua appartenenza alla famiglia del tumor necrosis receptor factors, mediatori della morte cellulare via apoptosi. Recentemente, è stato osservato che l'NGF è in grado di legare direttamente il p75^{NTR} e mediare un messaggio all'interno della cellula in assenza di attività tirosin-chinasica, attivando una serie di messaggi che porterebbero alla morte cellulare via apoptosi (Barbacid, 1993). Per queste caratteristiche il p75^{NTR}, recettore in grado di legare tutte le NTs, è stato incluso nel superfamiglia dei recettori che portano un dominio di morte (Tumor Necrosis Factor superfamily), la quale comprende diversi antigeni di superficie e citochine (Casaccia-Bonofil et al., 1998).

L'internalizzazione del complesso NGF e recettore gioca un ruolo importante nella trasduzione del segnale da parte dell'NGF, dato che il trasporto retrograde assonale all'interno della cellula, avviene dalla periferia verso il nucleo. The internalization of the complex involves endocytosis and the formation of signaling endosomes, specific structures in which NGF continues to bind its specific receptors. Receptor activation appears to occur predominantly in caveolae-like membranes.

La maggior parte delle attività biologiche mediate da NGF (dalla differenziazione/differenziamento alla proliferazione/sopravvivenza) sono dovute al legame con il trkA^{NGFR} e sub-sequente attivazione di un segnale a cascata comprendente MAPK-Ras-Erk pathway, fosfolipasi C γ 1, chinasi P³I e piccole proteine

di trasduzione nucleari. Il pathway di traduzione del segnale del $p75^{\text{NTR}}$ include NFkB (i fattori di trascrizione Rel/NF-kB) and c-Jun kinase (JNK), così come un incremento nella produzione di ceramide, responsabili della trascrizione genica o della morte programmata per apoptosi. Questi effetti opposti mediati dall'NGF (sopravvivenza e morte cellulare), apparentemente non mostrati dalle altre NTs, sebbene tutte leganti il $p75^{\text{NTR}}$.

Una osservazione interessante riguarda la scoperta di una proteina citoplasmatica di 94 kDa in grado di legare il $p75^{\text{NTR}}$, chiamata NRFI (fattore legante il complesso NGF-recettore), la quale si legherebbe al dominio citoplasmatico del $p75^{\text{NTR}}$ ed è successivamente al legame specifico rilasciata (Frade et al., 1998).

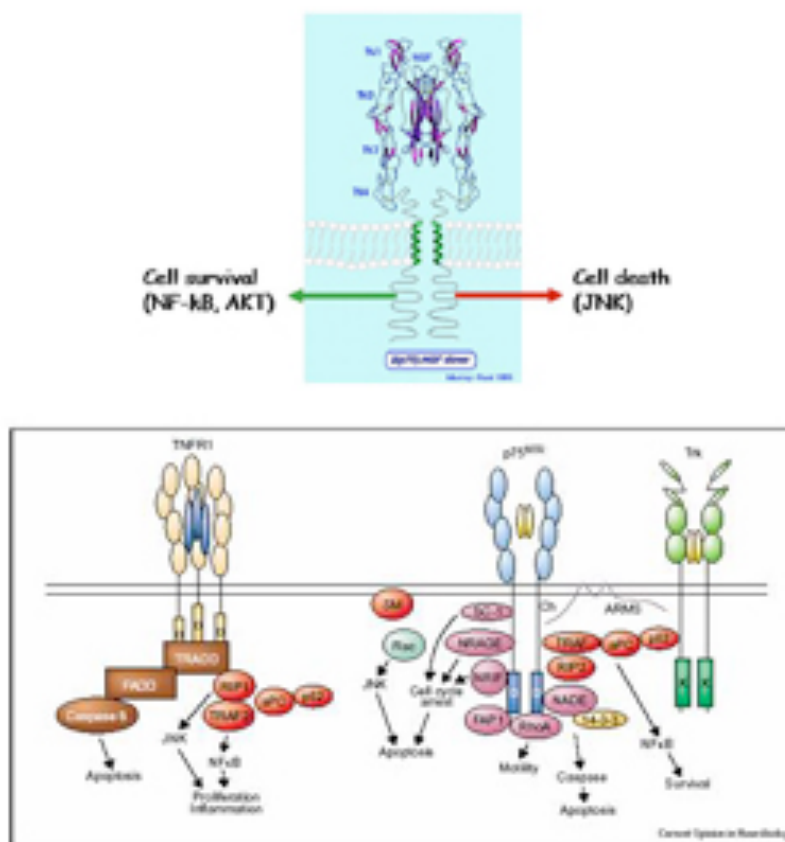
Malgrado le continue osservazioni sulla comprensione dei fenomeni molecolari collegati al legame dell'NGF con il suo recettore, ancora poco si conosce sulla natura e sul percorso intracellulare dei secondi messaggeri.

Il pro-NGF, isolato da diversi tessuti, sembrerebbe come recentemente dimostrato, il legante ad alta affinità del $p75^{\text{NTR}}$, in grado di promuovere segnali di apoptosi in cellule neuronali in coltura presentati minima attivazione dei segnali di differenziazione e sopravvivenza mediati dal $trkA^{\text{NGFR}}$. Questa recente osservazione rafforza l'ipotesi che gli enzimi proteolitici giochino un ruolo fondamentale nel regolare l'attività biologica dell'NGF, dato che il pro-NGF legherebbe maggiormente il $p75^{\text{NTR}}$ (apoptosi) mentre la forma matura dell'NGF legherebbe maggiormente il $trkA^{\text{NGFR}}$ per promuovere la sopravvivenza.

Singularmente, come osservato recentemente, l'NGF sembrerebbe in grado di attivare la cascata delle proteine Smad, un pathway tipico del Transforming Growth Factor- β , tramite un meccanismo TGF- β indipendente. In particolare, nelle PC12, l'NGF sembrerebbe indurre l'associazione Smad3-Smad4, la traslocazione del complesso nel nucleo e la successiva trascrizione genica, in modo specifico (Lutz et al., 2004). Queste recenti osservazioni aprono la via ad ulteriori studi al fine di

investigare questo nuovo pathway di traduzione del segnale mediato dall'NGF, considerato il fatto che l'NGF è spesso associato al rimodellamento tissutale, spesso in associazione con il TGF- β 1, il fattore chiave per eccellenza di questo processo (Micera et al., 2003). La figura 8 mostra una rappresentazione schematica del recettore p75NTR e la sua possibile traduzione del segnale all'interno della cellula, confrontata con quella del TNF- α , il prototipo della famiglia di recettori a cui appartiene.

Figura 8



1.12 - NGF e sistema visivo

1.12.1 - Segmento anteriore

La prima dimostrazione della presenza dell'NGF nel segmento anteriore oculare risale al 1980-1983 quando Ebendal dimostrò per la prima volta la presenza dell'NGF nell'iride di ratto adulto (5-10 pg/iride di NGF). Studiando le interazioni tra le terminazioni nervose simpatiche e sensoriali e gli organi bersaglio, Ebendal dimostrò inoltre che la denervazione chirurgica sensoriale e/o simpatica determinava un aumento della quantità dell'NGF nell'iride, maggiore nella denervazione sensoriale rispetto alla simpatica. Queste osservazioni suggerivano che i nervi sensoriali influenzassero i livelli di NGF nei territori di innervazione attraverso captazione/rimozione del fattore o esercitando un feedback negativo sulla produzione o sull'utilizzo dell'NGF. Ebendal rilevò inoltre un forte aumento dell'NGF nell'iride di ratto isolata e posta in coltura. Sulla base di questa osservazione, Barth (1984) osservò nell'iride in coltura un aumento di NGF di 200 volte rispetto ai normali valori in vivo e un rilascio del fattore nel medium. Inoltre dimostrò che l'aumento dell'NGF in coltura derivava da una sintesi e rilascio da parte dell'iride, infatti, la produzione dell'NGF era bloccata da inibitori della sintesi dell'RNAm e della trascrizione. Si potevano pertanto ipotizzare diversi meccanismi responsabili dell'aumento dell'NGF osservato dopo espianto o denervazione dell'iride: un aumento della sintesi dell'NGF e/o una riduzione della sua degradazione o una rimozione da parte delle terminazioni nervose sezionate.

Nel 1986 Heuman dimostrò in vitro un aumento dei livelli dell'RNAm per l'NGF nell'iride di ratto dimostrando formalmente che era l'iride stessa ad aumentare la produzione di NGF in coltura. Nello stesso anno, Shelton eseguì (1986) uno studio sull'espressione dell'RNAm per l'NGF nell'iride di ratto dopo denervazione in vivo e dopo espianto e coltura rilevando che non c'era un aumento dei livelli dell'RNAm

dell'NGF dopo denervazione chirurgica e chimica, ad indicare che dovevano esistere altri meccanismi che determinavano a livello dell'iride in coltura l'aumento dell'NGF precedentemente osservato in queste condizioni (Ebendal 1980). Contrariamente al dato sugli studi in vivo, i risultati di Shelton sull'iride in coltura confermavano un importante aumento dei livelli del messaggero dell'NGF nel tessuto irideo e lo stesso autore concluse che l'importante aumento dell'espressione del gene dell'NGF fosse il principale responsabile del forte aumento dell'NGF osservato nell'iride in coltura (Ebendal et al 1980, Barth et al 1984).

Sulla base delle evidenze che l'NGF rappresentava una molecola chiave nell'interazione tra alcuni tipi di neuroni e i loro tessuti bersaglio (Ebendal et al 1980), nel 1985 Kessler studiò le interazioni tra neuroni sensoriali peptidergici, i neuroni simpatici noradrenergici e i neuroni parasimpatici colinergici nell'iride di ratto in vivo. L'iniezione dell'NGF nella camera anteriore dell'occhio determinava un aumento della produzione di sostanza P dall'iride, mimando gli effetti della simpatectomia, e anche un aumento dell'attività della tirosina idrossilasi con un lieve aumento della acetilcolinaterasi; per contro, l'iniezione di anticorpi anti-NGF preveniva sia l'aumento della sostanza P e della AchT dopo ablazione simpatica, sia l'aumento di TH e AchT dopo l'ablazione del trigemino. Kessler ipotizzò che l'innervazione simpatica, parasimpatica e sensoriale dell'iride interagissero influenzando la produzione di NGF da parte del loro comune tessuto bersaglio.

Al fine di studiare se anche i neurotrasmettitori potessero influenzare la produzione dell'NGF da parte dei tessuti bersaglio dei nervi (Hellweg et al., 1988) studiò gli effetti delle amine biogene neurotrasmettitorie e dei neuropeptidi sulla concentrazione e sulla sintesi dell'NGF paragonandoli alla reazione al trauma causato dalla dissezione dell'iride. Tra le molte sostanze testate nessuna era in grado di provocare il forte aumento iniziale nella sintesi dell'NGF osservato in coltura. Inoltre Hellweg dimostrò che tagliando l'iride in coltura in piccoli pezzi la produzione dell'NGF aumentava di

duecentocinquanta volte rispetto al controllo, questo aumento dimostrava che era il trauma irideo il principale responsabile del transitorio aumento dell'NGF osservato.

Successivamente si cominciò a valutare la presenza e la funzione dell'NGF anche a livello della superficie oculare. La prima evidenza della presenza dell'NGF a livello corneale la ottenne Ebendal (1988) studiando i livelli di RNAm dell'NGF negli embrioni di pollo. In seguito è stata dimostrata la presenza dell'NGF e del $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$ nell'epitelio e nell'endotelio corneale (Lambiase, 1998) e nei cheratociti (Kruse et al., 2000) nella cornea umana e nel ratto adulto, e come queste stesse cellule fossero in grado di sintetizzare direttamente l'NGF (Lambiase et al., 2000). Queste osservazioni suggerivano un ruolo dell'NGF nel trofismo e nel mantenimento dell'integrità dell'epitelio corneale in condizioni basali, mentre la coespressione del $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$ sulle stesse cellule suggeriva un meccanismo d'azione dell'NGF di tipo autocrino e/o paracrino. Sulla base di questa ipotesi numerosi Autori hanno studiato il potenziale ruolo dell'NGF endogeno sulla fisiopatologia corneale. Impiegando un modello sperimentale di lesione dell'epitelio corneale è stato dimostrato come il tessuto corneale reagisce all'insulto meccanico con un aumento dei livelli corneali dell'NGF, dovuto a sintesi diretta da parte della stessa cornea (Lambiase et al., 2000). La neutralizzazione dell'attività biologica dell'NGF mediante la somministrazione di anticorpi anti-NGF determina invece una inibizione del processo di riepitelizzazione corneale, con la presenza di alterazioni cicatriziali a livello dello stroma, a supporto dell'importante ruolo dell'NGF nel processo riparativo.

Impiegando un altro tipo di approccio sperimentale è stato dimostrato come l'innervazione sensoriale corneale murina è dipendente dall'NGF e che i topi knockout per il $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$, mostrano una riduzione della sensibilità corneale (de Castro et al., 1995). Inoltre Joo (2004) ha dimostrato come la somministrazione dell'NGF esogeno induca una più rapida reinnervazione corneale in un modello animale di laser in situ keratomileusis. Tali evidenze sperimentali dimostrano come l'NGF rappresenti a

livello corneale una molecola di “comunicazione” tra la innervazione sensitiva e le cellule epiteliali, influenzando reciprocamente la funzione e il trofismo in maniera simile a quanto osservato nel tessuto irideo.

Queste osservazioni hanno suggerito di valutare la possibilità di modulare i processi riparativi corneali mediante la somministrazione di NGF esogeno. I primi studi condotti in vitro sull'epitelio corneale di coniglio hanno dimostrato come l'aggiunta di NGF al terreno di coltura stimoli la proliferazione ma non il differenziamento delle cellule epiteliali (Kruse, 1993). Successivamente, utilizzando un modello sperimentale in cui gli animali venivano sottoposti a lesione corneale, è stato dimostrato che la somministrazione topica dell'NGF accelerava la guarigione dell'epitelio e diminuiva le alterazioni cicatriziali stromali, normalmente presenti dopo una lesione corneale. Si poteva quindi ipotizzare anche un ruolo dell'NGF endogeno ed esogeno nella comunicazione epitelio-stroma al fine di regolare la riparazione e il rimodellamento dello stroma corneale oppure che la più rapida riparazione epiteliale indotta dall'NGF potesse evitare l'instaurarsi di opacità stromali. Sulla base di tali studi sono stati condotti alcuni trials clinici in utilizzando l'applicazione topica dell'NGF, nel trattamento delle ulcere corneali neurotrofiche di grado severo. Questa patologia è causata dalla perdita dell'innervazione sensoriale corneale e si accompagna ad una riduzione della sensibilità, a ripetute disepitelizzazioni con formazione di ulcere che compromettono gravemente la funzione visiva. Per tale patologia non esiste ad oggi una terapia farmacologica efficace. La somministrazione topica dell'NGF ha determinato una riepitelizzazione dell'ulcera con un recupero della sensibilità corneale di tutti i pazienti trattati senza effetti collaterali locali o sistemici importanti, durante o dopo il trattamento (Lambiase et al., 1998). Recentemente, oltre al ruolo dell'NGF nella fisiopatologia della cornea e dell'iride, è stato dimostrato un potenziale ruolo di questa neurotrofina anche sugli altri tessuti del segmento anteriore oculare (cristallino e corpo ciliare) (Lambiase et al. 2000) oltre alla presenza dell'NGF nell'umore acqueo

(Lambiase et al 1997). Attualmente il coinvolgimento dell'NGF nel sistema visivo è riassunto in figura 11 e 12.

Figura 11

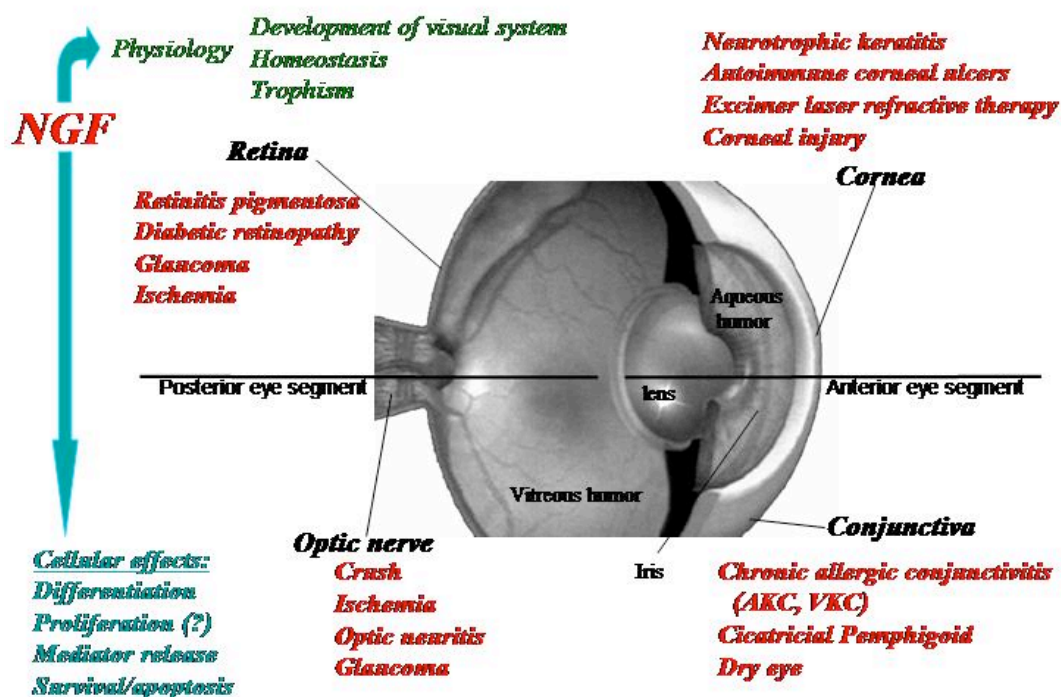
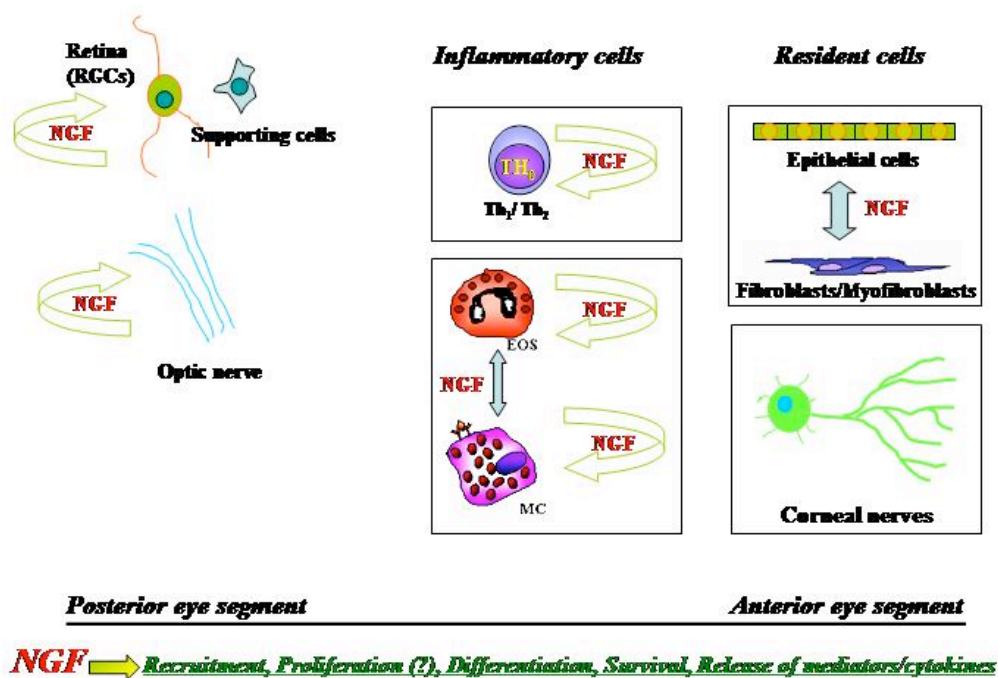


Figura 12



1.12.2 - Retina e nervo ottico.

Numerose sono le evidenze che alcuni fattori di crescita, e tra questi l'NGF, agiscano su cellule della retina sia durante lo sviluppo che allo stato adulto.

La sintesi dell'NGF e la presenza di recettori specifici è stata riscontrata nella retina di embrione di pollo (Ebendal et al., 1988; Large et al., 1989; Lehwalder et al., 1989) e di ratti in via di sviluppo, dove l'NGF sembra svolgere un ruolo cruciale per lo sviluppo e la differenziazione della retina stessa (Ayer-Lelievre et al., 1989; Yan e Johnson, 1988).

In seguito è stata dimostrata la produzione dell'NGF da parte delle cellule gangliari, delle cellule di Muller e dell'epitelio pigmentato nella retina di ratti adulti (Chakrabarti

et al., 1990), ed è stata evidenziata la presenza dei recettori dell'NGF anche su cellule di retina di ratti adulti: epitelio pigmentato e cellule di Muller (Chakrabarti et al., 1990), cellule gangliari e cellule di Muller (Carmignoto et al, 1991). Inoltre è stata dimostrata la presenza di trasporto anterogrado e retrogrado del recettore dell'NGF da parte delle cellule gangliari nella retina di ratto (Carmignoto et al, 1991) ed è stato evidenziato come dopo sezione del nervo ottico di pesce si abbia un trasporto retrogrado dell'NGF se si somministra nel sito di lesione (Yip e Johnson, 1983).

Il lavoro dei ricercatori ha riguardato in particolare l'azione del NGF su alcune popolazioni cellulari retiniche, in particolare le cellule dell'epitelio pigmentato, i fotorecettori e le cellule gangliari. Alcuni studi in vitro hanno dimostrato che l'aggiunta di NGF al terreno di cultura di cellule dell'epitelio pigmentato umano indurrebbe un aumento dei livelli intracellulari di calcio e cambiamenti della forma e della distribuzione dell'actina intracitoplasmatica, indici indiretti di stimolazione alla proliferazione e migrazione cellulare (Kuriyama et al., 1991; Shirakawa et al., 1986).

Inoltre in uno studio condotto su un ceppo mutante di topo, il C3H, utilizzato come modello sperimentale di retinite pigmentosa, la somministrazione dell'NGF esogeno sia per via intravitreale che retroculare era in grado di ritardare la degenerazione dei fotorecettori (Lambiase e Aloe, 1996).

Numerosi lavori dimostrano un effetto del NGF sulle cellule gangliari: in particolare diversi studi hanno valutato l'azione del NGF sulla crescita e differenziazione della retina in vitro; nel 1985 Oka ed altri (Oka et al., 1985) hanno coltivato cellule di retina umana per 28 giorni, in presenza di NGF ottenevano la crescita e differenziazione dei diversi tipi neuronali.

Nel 1986 Johnson (Johnson et al., 1986b) ha coltivato retina di ratto aggiungendo al mezzo di coltura un fattore trofico NGF simile (BDNF), ottenendo selettivamente un aumento della sopravvivenza dei soli neuroni gangliari.

Numerosi studi su modelli animali hanno riguardato il ruolo dell'NGF nel proteggere le cellule gangliari da un danno di natura meccanica o ischemica.

Diversi studi sono stati compiuti in numerose specie animali, le salamandre (Turner e Delaney, 1979), i pesci (Turner et al., 1980), i ratti (Carmignoto et al., 1989) per studiare l'effetto del NGF sulle cellule gangliari in occhi sottoposti a sezione del nervo ottico.

Tutti i lavori hanno messo in evidenza un'efficacia del neuropeptide nell'inibire la degenerazione di queste cellule, in particolare lo studio sui ratti ha dimostrato che il trattamento con NGF retrobulbare consente una sopravvivenza delle cellule gangliari e delle fibre nervose del nervo ottico per circa 7 settimane (Carmignoto et al., 1989).

Inoltre Siliprandi (1993) dimostra che la somministrazione di NGF retrobulbare in gatti in cui era stata indotta un'ischemia acuta a carico della retina, è in grado di aumentare il numero di cellule gangliari che sopravvivono all'insulto ischemico.

Lambiase (1997), ha dimostrato che in un modello sperimentale di ipertensione oculare nel coniglio la somministrazione retrobulbare di NGF determina una riduzione della perdita delle cellule ganglionari, d'altra parte, la somministrazione di anticorpi anti-NGF, che inibiscono l'azione dell'NGF endogeno, aumentano il danno retinico indotto dall'ipertensione. I risultati di tale studio suggeriscono un ruolo protettivo dell'NGF sulle cellule ganglionari retiniche sottoposte ad un danno ipertensivo.

1.13 – Nerve Growth Factor nelle patologie degenerative oculari

1.13.1 – Disfunzione lacrimale e occhio secco

Il dry eye (occhio secco) è una patologia cronica infiammatoria della superficie oculare caratterizzata da una riduzione della produzione lacrimale e/o da disfunzione del film lacrimale (Rolando and Zierhut, 2001). L'irritazione della superficie oculare, causata dall'insufficiente lubrificazione, può degenerare nella formazione di una serie di alterazioni della superficie oculare come la riduzione della densità delle cellule mucipare congiuntivali, la cheratinizzazione dell'epitelio, difetti epiteliali o ulcere corneali, neovascolarizzazione e cicatrizzazione (Benitez-del-Castillo et al., 2001). Non esistono attualmente trattamenti clinici risolutivi: la somministrazione di lacrime artificiali viene comunemente impiegata in clinica per alleviare i sintomi ma non risolve le alterazioni oculari caratteristiche della patologia (Calonge et al., 2001). Una volta instaurate le alterazioni corneali ne risulta una compromissione irreversibile della funzione visiva, dato che il trapianto della cornea presenta una pessima prognosi in questa patologia (Kruse and Tseng, 1993). Uno dei principali meccanismi di controllo della secrezione lacrimale è rappresentato dal sistema sensitivo che veicola gli stimoli dalla superficie oculare stimolando una secrezione lacrimale riflessa.

Nonostante a livello oculare non siano ancora stati descritte alterazioni dell'innervazione in corso di sindrome di Sjögren o di altri tipi di occhio secco, è presumibile che il ruolo del sistema nervoso periferico e dei neuromediatrici sia importante nella patogenesi delle alterazioni a carico delle ghiandole lacrimali, poiché cambiamenti nei livelli circolanti di neuropeptidi e neurotrofine sono già stati descritti a livello delle ghiandole salivari dei pazienti affetti. Inoltre, in modelli animali della patologia è stata anche descritta una riduzione dell'innervazione delle ghiandole salivari, che potrebbe spiegare – almeno in parte – la discrepanza tra il modesto danno infiammatorio delle ghiandole e la importante diminuzione della produzione di saliva

nei pazienti con sindrome di Sjögren. La compromissione della componente nervosa potrebbe a sua volta essere innescata da fenomeni infiammatori locali che causano disregolazione e alterazione delle fibre nervosa ghiandolari, iniziando così un circolo vizioso responsabile dei segni clinici da progressiva atrofia acinare (Santavirta N, 1997). A supporto dell'ipotesi che anche a livello oculare il sistema nervoso periferico ed i neuromediatrici possano giocare un ruolo patogenetico importante, è stato di recente descritto un incremento dei livelli di NGF nelle lacrime di pazienti con sindrome di Sjögren. Inoltre, è stato descritto in vitro che il NGF è in grado di aumentare la produzione e secrezione della mucina MUC5AC da parte delle cellule caliciformi congiuntivali, suggerendo che questa neurotrofina possa essere utilizzata in futuro per migliorare la stabilità del film lacrimale in pazienti con occhio secco.

1.13.2 – Ulcere corneali

Come precedentemente riportato, l'NGF svolge un ruolo cardine nel mantenimento del trofismo corneale e nei meccanismi riparativi (Lambiase et al., 1998; Lambiase et al., 2000; You et al., 2000). In condizioni normali, l'epitelio corneale, i cheratociti e l'endotelio corneale producono ed esprimono l'NGF, il $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$ ed il p75^{NTR} (Lambiase et al., 1998; You et al., 2000). L'NGF legandosi al $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$ induce proliferazione ed attivazione cellulare, mentre legandosi al p75^{NTR} veicola principalmente un segnale di apoptosi, mantenendo l'omeostasi dei tessuti con un fine equilibrio tra proliferazione, differenziazione ed apoptosi cellulare (Sofroniew et al., 2001). Animali knockout per il $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$ o per il p75^{NTR} sviluppano ulcere ed opacità corneali associate ad una riduzione dell'innervazione corneale (Lee et al., 1992; Smeyne et al., 1994; de Castro et al., 1998). La somministrazione dell'NGF in vitro ed in vivo induce proliferazione e differenziazione dell'epitelio corneale ed un continuo supporto ai neuroni sensitivi del trigemino (Kruse et al., 1993; Lambiase et al., 2000; Levi-Montalcini, 1987). Inoltre il trattamento topico con NGF induce la

guarigione delle ulcere corneali in pazienti affetti da cheratite neurotrofica od ulcere autoimmuni, associata ad un ripristino della sensibilità corneale (Lambiase et al., 1998; Lambiase et al., 2000).

1.13.3 – Congiuntivite allergica

Negli ultimi anni svariate evidenze scientifiche hanno provato che le reazioni allergiche sono influenzate dal sistema nervoso periferico attraverso il rilascio di neuropeptidi tra cui sostanza P (SP), neuropeptide Y (NPY), peptide intestinale vasoattivo (VIP), calcitonine gene-related peptide (CGRP) e il nerve growth factor (NGF). Nello specifico, è stato ampiamente dimostrato che SP, NPY, e CGRP vengono rilasciati dalle terminazioni nervose nei siti di infiammazione e, più recentemente, è stato ipotizzato anche un ruolo del VIP nell'infiammazione neurogenica grazie a risultati preliminari su modelli animali. Nelle vie aeree, questo rilascio di neuropeptidi da terminazioni nervose si traduce in una importante infiammazione neurogenica che innesca la reazione allergica con secrezione di muco, broncocostrizione, ed iperemia della mucosa. Ad esempio è stato descritto che SP viene rilasciato durante test di provocazione con allergeni in pazienti con asma e rinite allergica, stimolando la secrezione di muco e rilascio di istamina dai mastociti, migliorando la migrazione e l'attività citotossica di eosinofili e stimolando la proliferazione delle cellule T. Allo stesso tempo un incremento di CGRP e VIP è in grado di indurre vasodilatazione e secrezione di muco, mentre VIP e NPY sono noti per svolgere un ruolo immunomodulatorio inducendo le reazioni Th2 e inibendo le reazioni Th1.

Rispetto ai dati pubblicati sul ruolo dei neuropeptidi nelle malattie allergiche respiratorie, sono disponibili meno dati sulle patologie della superficie oculare, in particolar modo sulla congiuntivite allergica. Tuttavia, è noto che durante l'infiammazione allergica tutte le componenti della superficie oculare (cornea,

congiuntiva, ghiandole lacrimali, e film lacrimale), sono attivate attraverso un cross-talk mediato dal rilascio di citochine e mediatori infiammatori, ed è stato recentemente proposto un ruolo dei suddetti neuropeptidi in questo cross-talk. Nello specifico, in linea con questa ipotesi, sono stati descritti un incremento dei livelli plasmatici e lacrimali di SP e VIP, nonché dei livelli congiuntivali di SP in pazienti affetti da cheratocongiuntivite primaverile (VKC), una malattia oculare allergica grave che colpisce principalmente i bambini maschi. Sempre in questi pazienti, è stato dimostrato che l'NGF è in grado di modulare l'espressione dei recettori toll-like 4 e 9, andando quindi a modulare tutta la cascata citochinica e infiammatoria. Tuttavia, ad oggi gli effetti del NGF nella reazione allergica oculare non sono stati ancora completamente chiariti.

1.13.4 – Degenerazioni retiniche e glaucoma

Negli ultimi anni numerosi studi hanno dimostrato che le cellule retiniche sono sensibili all'azione dell'NGF. Nel 1979 Turner e Delaney per primi hanno dimostrato che l'NGF è in grado di ridurre od evitare il danno delle cellule ganglionali retiniche dopo resezione del nervo ottico. Recentemente altri studi hanno dimostrato che la somministrazione di NGF induce il recupero funzionale delle cellule ganglionali retiniche in un modello animale di ischemia acuta della retina (Siliprandi et al., 1993). In questo studio l'acuità visiva e la sensibilità al contrasto erano paragonabili all'animale normale e inoltre un numero significativo di cellule ganglionali erano protette dal danno ischemico dopo somministrazione dell'NGF. Il meccanismo alla base di questo effetto non è chiaro sebbene sia stato ipotizzato che l'NGF riduca l'ingresso di ioni calcio nei neuroni retinici dopo l'ischemia proteggendoli in questo modo dal danno. Un'altra possibile spiegazione è che l'NGF possa interferire con i meccanismi che regolano l'apoptosi. A sostegno di questa ipotesi è stato dimostrato che l'NGF riduce l'apoptosi delle cellule ganglionali dopo resezione del nervo ottico

in ratti neonati. E' anche possibile che il ruolo protettivo del NGF sulle cellule del sistema visivo sia una parte di una cascata di eventi che comprendono l'interazione tra vari tipi cellulari quali i neuroni, la glia, l'epitelio pigmentato retinico, aprendo quindi interessanti prospettive terapeutiche per patologie degenerative al momento prive di trattamenti efficaci, quali la degenerazione maculare legata all'età, la retinopatia diabetica, la retinite pigmentosa e il glaucoma.

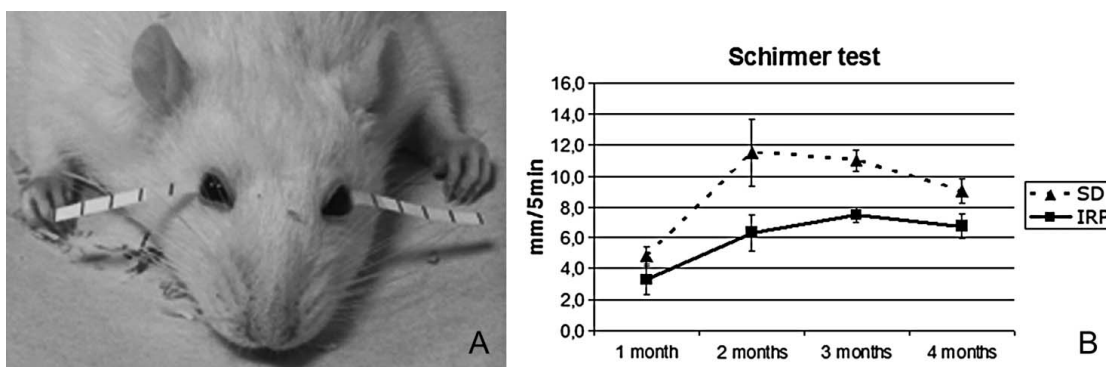
RISULTATI SPERIMENTALI

2.1 – Ruolo del NGF nella disfunzione lacrimale e nell'occhio secco

Come detto precedentemente, è stato dimostrato in vitro che il NGF è in grado di aumentare la produzione e la secrezione della mucina MUC5AC. Inoltre è stato di recente descritto un incremento dei livelli di NGF nelle lacrime di pazienti con occhio secco in corso di sindrome di Sjögren. Questi dati preliminari suggeriscono che il NGF possa svolgere un ruolo chiave nella patogenesi della disfunzione lacrimale in pazienti con occhio secco e possa essere rilasciato nelle fasi iniziali della patologia come meccanismo di compenso della superficie oculare per arrestare i processi degenerativi in atto. Tuttavia, non esistono ad oggi dati univoci sull'effettivo ruolo del NGF nella patogenesi del dry eye e, tantomeno, sul possibile impiego ad uso terapeutico del NGF in collirio in pazienti con occhio secco.

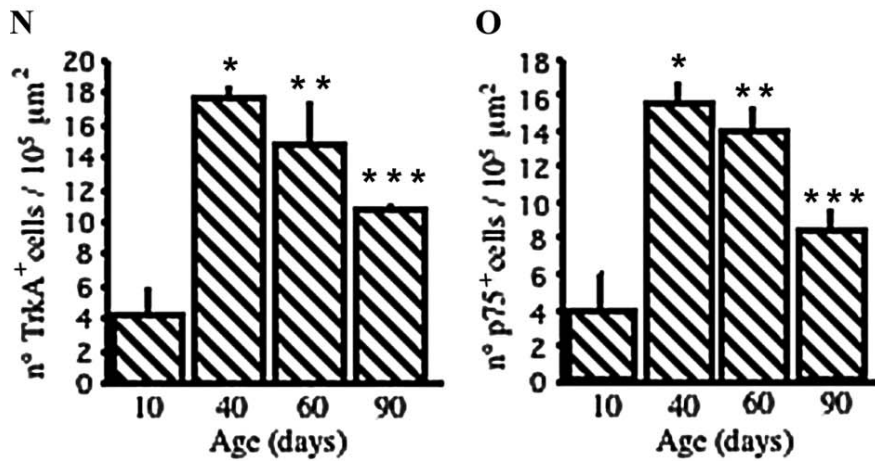
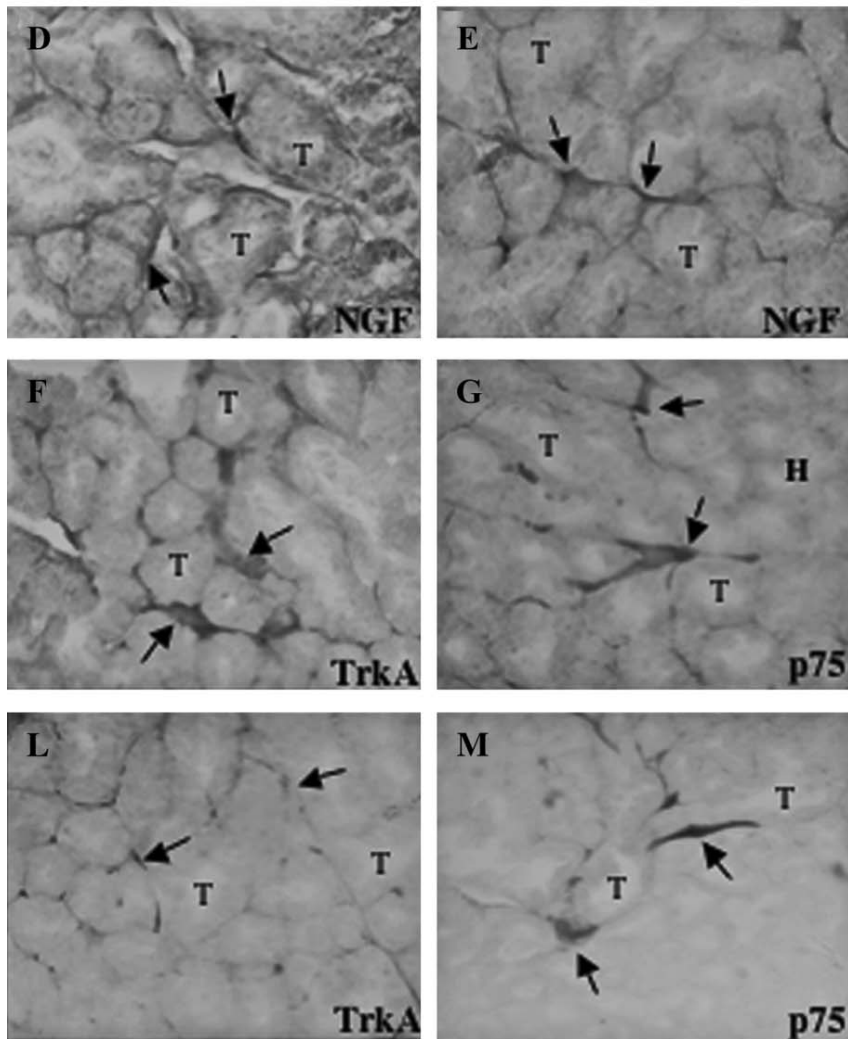
Per valutare il ruolo del NGF nel dry eye, nell'ambito di questo dottorato di ricerca abbiamo sviluppato un protocollo di studio che prendesse in considerazione sia modelli sperimentali in vivo sia pazienti con occhio secco. Nello specifico, il primo studio che abbiamo pubblicato sul ruolo del NGF nel dry eye ha utilizzato un modello animale di alterazione della pathway del NGF, il ratto IRP -inherited retinitis pigmentosa- anche noto come ratto RCS -Royal College of Surgeon- (Nerve growth factor in the developing and adult lacrimal glands of rat with and without inherited retinitis pigmentosa. Muzi S, Colafrancesco V, Sornelli F, **Mantelli F**, Lambiase A, Aloe L. Cornea. 2010 Oct;29(10):1163-8). I ratti IRP hanno una disfunzione genetica della pathway del NGF, che li porta a sviluppare una patologia degenerativa retinica (la retinite pigmentosa, come vedremo in seguito nel par. 2.4). Nonostante le alterazioni a livello retinico di questi ratti siano state già ampiamente studiate, fino ad ora non si era valutato il possibile coinvolgimento della ghiandola lacrimale nel processo degenerativo indotto dalla disfunzione della pathway del NGF. Per questo motivo abbiamo deciso di

utilizzare i ratti IRP e di valutare, nello studio suddetto, le alterazioni nella pathway del NGF a livello istologico nelle ghiandole lacrimali di ratti neonati e adulti per verificare se l'involuzione ghiandolare legata all'età fosse peggiorata dall'alterazione della pathway del NGF. Abbiamo anche valutato se questa alterazione avesse un riscontro clinico con riduzione di secrezione lacrimale, mettendo a punto un test di funzionalità lacrimale nel ratto che abbiamo denominato "modified Schirmer test" (in quanto basato sul principio del test di Schirmer ampiamente utilizzato nella pratica clinica), vedi fig. sottostante.



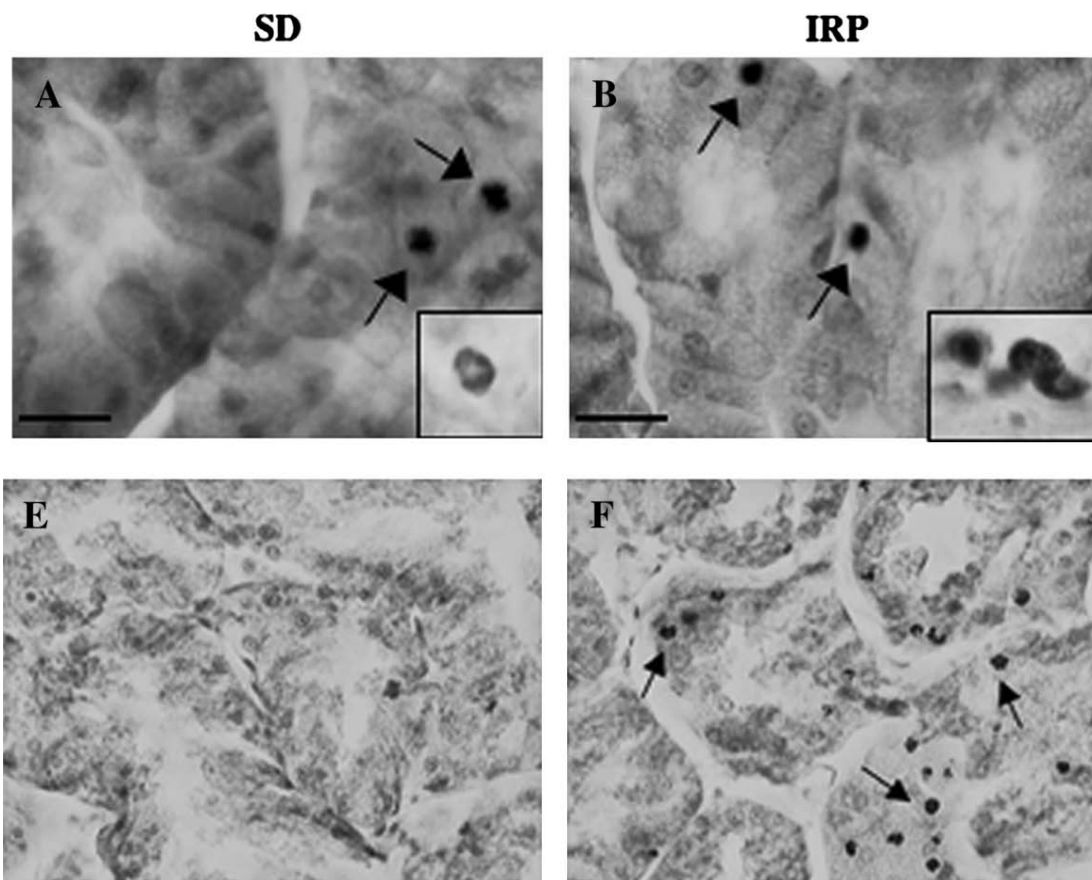
Come si può notare, il test con strisciole di carta millimetrata inserite al terzo laterale del fornice congiuntivale inferiore di ratti anestetizzati ha mostrato una differenza significativa della secrezione lacrimale che si palesava solo 2 mesi dopo la nascita, mentre nei ratti neonati non c'era differenza tra gruppo di controllo e ratti con disfunzione della pathway del NGF. La riduzione della secrezione nei ratti IRP adulti suggerisce che una disfunzione della pathway del NGF comporta una precoce degenerazione della ghiandola lacrimale legata all'età, con insorgenza precoce di occhio secco.

A supporto di questo dato l'analisi immunostochimica delle ghiandole lacrimali dei ratti RCS ha mostrato che i livelli di NGF e dei suoi recettori TrkA e p75 diminuiscono con l'età (vedi figura sottostante), mentre nei ratti di controllo si osserva un trend opposto.



Per analizzare se questa riduzione del NGF nei ratti IRP risulta in un'involuzione anatomica e funzionale della ghiandola lacrimale, abbiamo eseguito inoltre una

colorazione istologica con blu di toluidina che ha messo in evidenza un'involuzione acinare e diminuzione di secrezione evidenziata dall'accumulo di cristalli di secreto lacrimale, accompagnata da un infiltrato infiammatorio (vedi figg. sottostanti).



In conclusione, in questo studio abbiamo dimostrato che la riduzione del NGF svolge un ruolo nella patogenesi della disfunzione lacrimale causata da degenerazione ghiandolare legata all'età, aprendo interessanti prospettive per futuri studi clinici e/o sperimentali volti a valutare un possibile impiego di NGF esogeno in collirio in pazienti con occhio secco.

Per studiare più a fondo le cause e il significato delle suddette alterazioni strutturali e funzionali della ghiandola lacrimale, in un secondo studio condotto sullo stesso modello animale (ratti IRP/RCS), abbiamo voluto indagare se la responsabilità fosse esclusivamente del NGF o fossero coinvolti altri fattori di crescita. Per questo motivo, in questo studio abbiamo trattato per 3 settimane ratti adulti con un collirio a

base di anti-VEGF (Bevacizumab eye drop treatment stimulates tear secretion in rats through changes in VEGF and NGF lacrimal gland levels. Rossi S, **Mantelli F**, Lambiase A, Aloe L. Arch Ital Biol. 2012 Mar;150(1):15-21.). La scelta del VEGF come target del nostro studio è stata dettata dall'ampia letteratura che mostra come esista un cross-talk tra VEGF e NGF, tuttavia non ancora indagata a livello della ghiandola lacrimale. I risultati di questo studio hanno chiaramente dimostrato che la riduzione del VEGF a livello della ghiandola lacrimale indotto da terapia topica con anti-VEGF comporta un aumento della secrezione lacrimale, sia nei ratti di controllo, sia nei ratti IRP/RCS, come si può vedere nella figura sottostante.

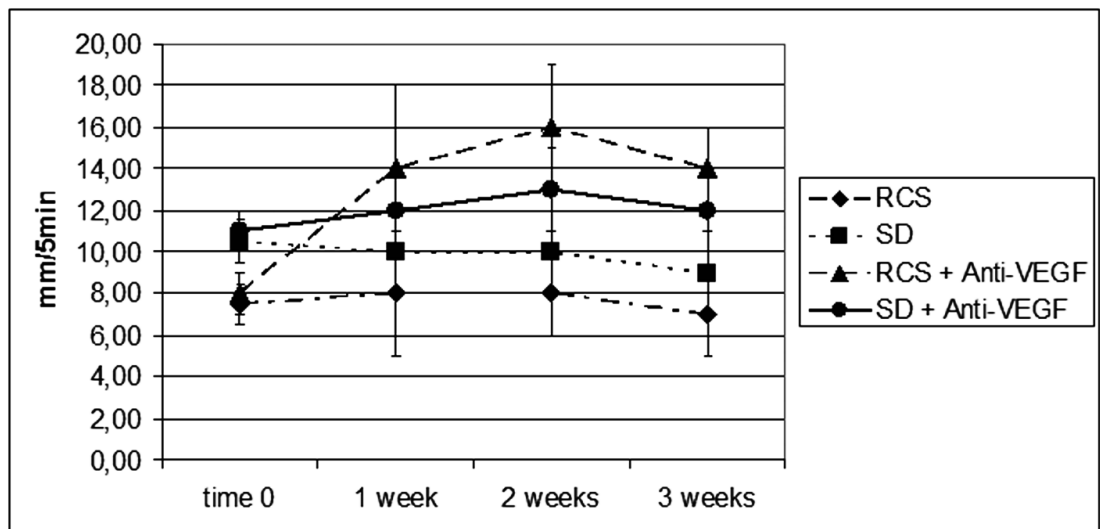
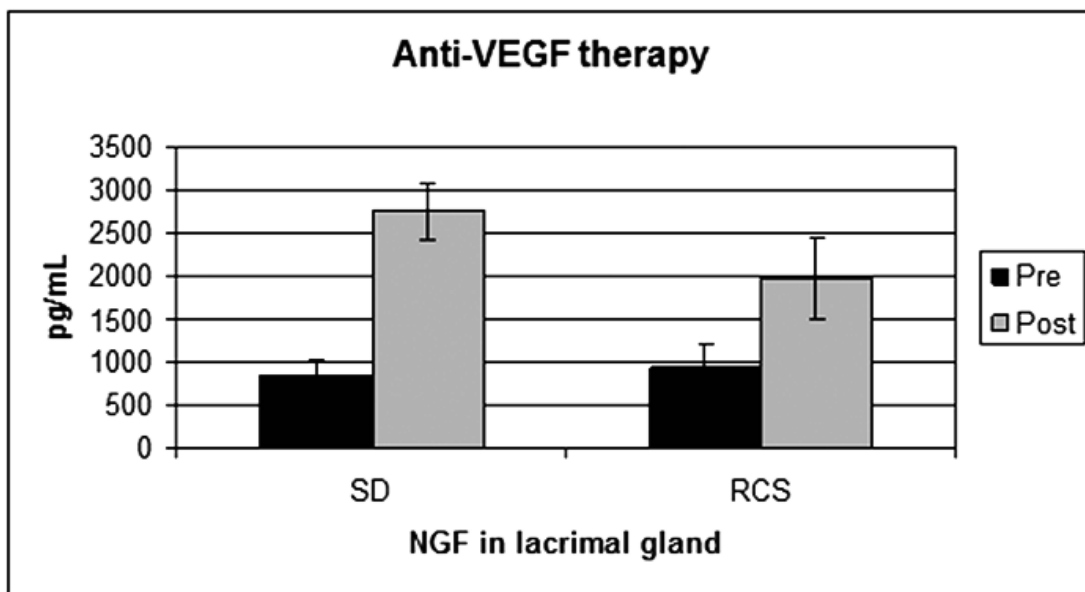
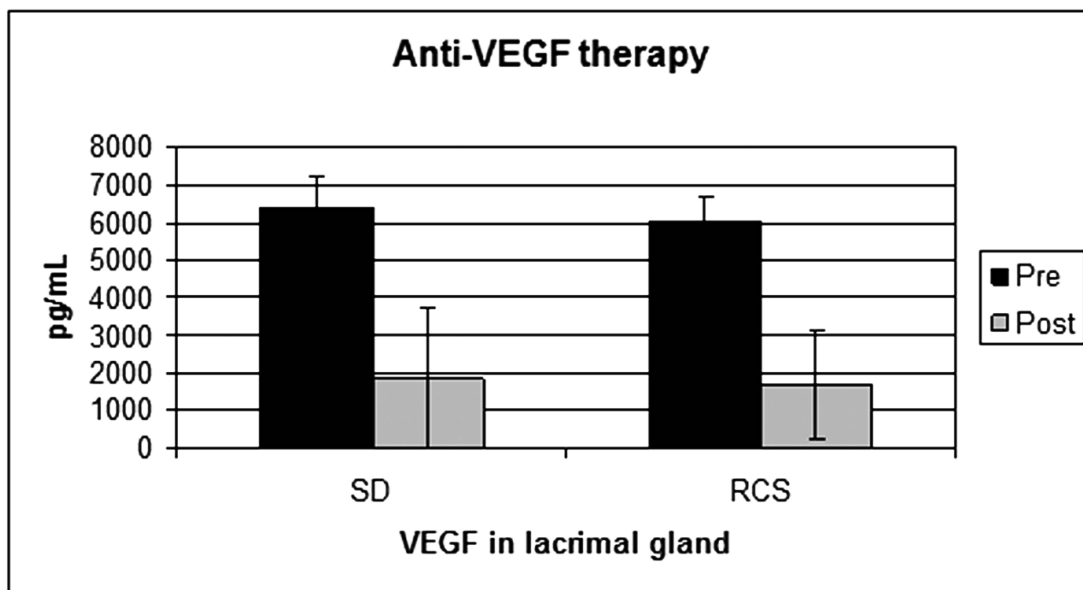


Fig. 1. - Lacrimal function tests in SD and RCS rats before and after anti-VEGF therapy.

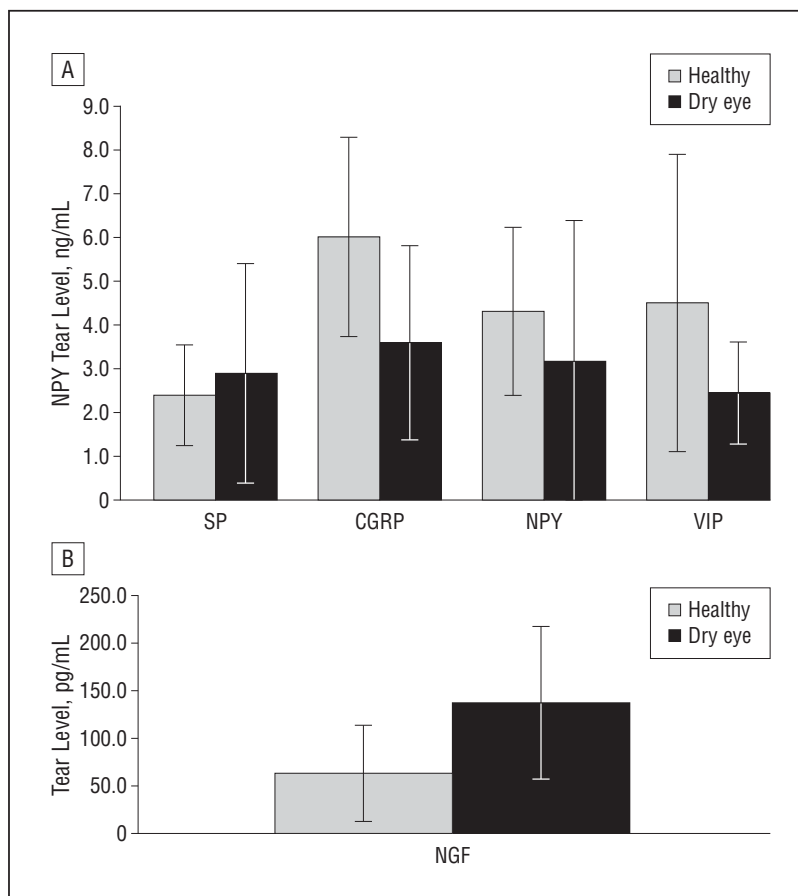
Per valutare se questi risultati fossero dovuti a un meccanismo di compenso indotto da una reazione locale ad una terapia medica topica (che potrebbe comportare fenomeni di tossicità locale con una iper-lacrimazione riflessa), o se fosse nuovamente coinvolto il NGF, abbiamo condotto un test ELISA per valutare i livelli di VEGF e di NGF nella ghiandola lacrimale dei ratti in esame.

I risultati hanno chiaramente dimostrato che la terapia con anti-VEGF non solo riduce il VEGF locale, ma aumenta in modo significativo i livelli di NGF come si può vedere nelle figure sottostanti.



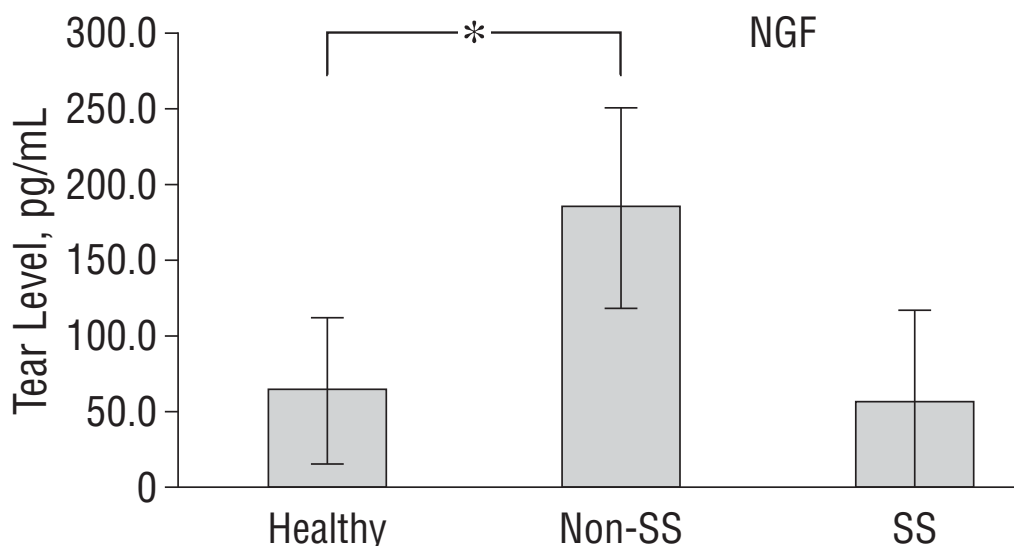
In conclusione, i risultati di questo studio hanno rafforzato la nostra ipotesi che il NGF esogeno in collirio potrebbe rappresentare una valida prospettiva terapeutica per migliorare la funzione e ritardare la degenerazione della ghiandola lacrimale in pazienti con occhio secco.

In seguito ai promettenti risultati dei due studi suddetti, abbiamo quindi voluto indagare se nei pazienti con occhio secco esista o meno una alterazione del NGF e/o di altri neuropeptidi, neurotrofine o neuromediatori. In questo studio (Alterations of tear neuromediators in dry eye disease. Lambiase A, Micera A, Sacchetti M, Cortes M, **Mantelli F**, Bonini S. Arch Ophthalmol. 2011 Aug;129(8):981-6.), effettuato su campioni di lacrime prelevati a 19 pazienti con occhio secco sia in corso di sindrome di Sjogren sia di tipo non-Sjogren, abbiamo dimostrato che non solo i livelli di NGF sono alterati, ma potrebbero anche essere utilizzati come marker di severità della patologia. Nello specifico, come si può vedere nelle figure sottostanti, mentre i livelli di tutti gli altri neuropeptidi presi in esame (NPY, VIP, CGRP, SP) diminuiscono precocemente nel dry eye, i livelli di NGF lacrimale aumentano e sono correlati alla severità del danno epiteliale, andando ad indicare chiaramente un tentativo di meccanismo di compenso della superficie oculare volto a stimolare la lacrimazione e la riparazione tissutale.



Characteristic	Spearman ρ Correlation				
	SP	CGRP	NPY	VIP	NGF
Conjunctival hyperemia	$P = .29$	$P = .07$	$P = .54$	$P = .90$	$P = .01; R = 0.489$
Schirmer test	$P = .97$	$P = .003; R = 0.574$	$P = .19$	$P = .61$	$P = .34$
BUT	$P = .45$	$P = .20$	$P = .006; R = -0.741$	$P = .73$	$P = .58$
Oxford score	$P = .87$	$P < .001; R = -0.629$	$P = .005; R = -0.526$	$P = .24$	$P = .006; R = 0.513$
Dry eye severity grade	$P = .59$	$P < .001; R = -0.674$	$P = .049; R = -0.515$	$P = .80$	$P = .009; R = 0.495$

A ulteriore conferma del fondamentale ruolo del NGF nel dry eye e del suo potenziale impegno terapeutico, abbiamo anche dimostrato come questo suo precoce incremento nelle lacrime vada svanendo in seguito a cronicizzazione della patologia, tanto da trovare addirittura una diminuzione del NGF lacrimale in forme di occhio secco cronico in corso di sindrome di Sjogren (SS) come si vede nella figura sottostante.

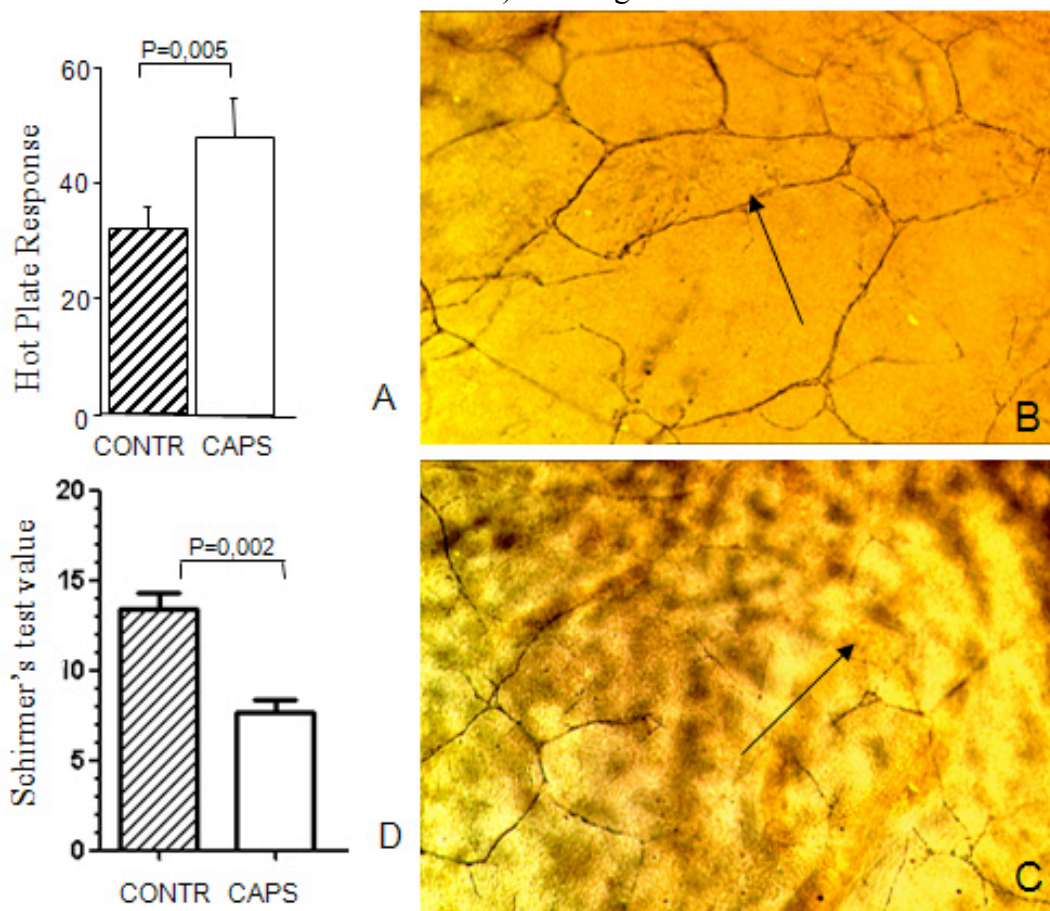


In conclusione, i risultati ottenuti su modelli animali di alterazione della pathway del NGF che sviluppano disfunzione lacrimale, nonché i risultati della quantificazione del NGF nelle lacrime di pazienti con occhio secco, suggeriscono la riduzione del NGF svolge un ruolo nella patogenesi della disfunzione lacrimale causata da degenerazione ghiandolare legata all'età, aprendo interessanti prospettive per futuri studi clinici e/o sperimentali volti a valutare un possibile impiego di NGF esogeno in collirio in pazienti con occhio secco cronico.

2.2 – Ruolo del NGF nella cheratite neurotrofica

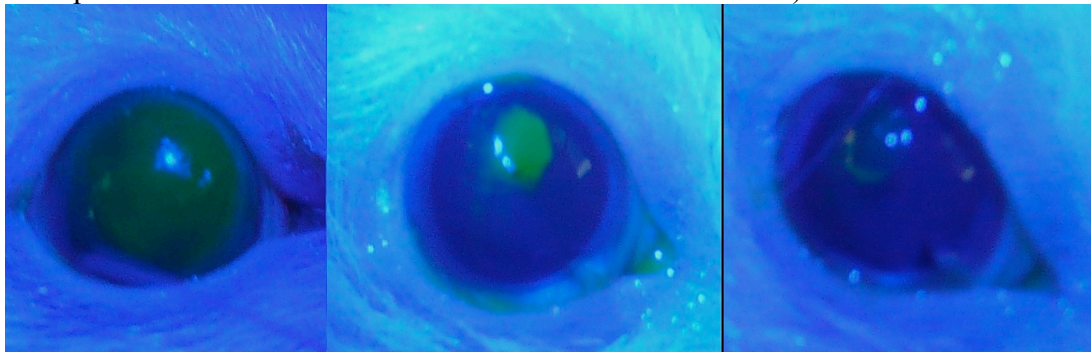
Come precedentemente detto, l'NGF svolge un ruolo cardine nel mantenimento del trofismo corneale e nei meccanismi riparativi del suo epitelio (Lambiase et al., 1998; Lambiase et al., 2000; You et al., 2000) e sia l'epitelio corneale, sia i cheratociti, sia l'endotelio corneale producono ed esprimono l'NGF, e i suoi recettori trkA e p75 (Lambiase et al., 1998; You et al., 2000). E' stato inoltre ampiamente dimostrato in seguito al primo lavoro del Dr. Lambiase del 1998 pubblicato sul prestigioso New England Journal of Medicine, che il trattamento topico con NGF induce la guarigione delle ulcere corneali in pazienti affetti da cheratite neurotrofica, associato ad un ripristino della sensibilità corneale (Lambiase et al., 1998), tanto che al momento un NGF ricombinante umano è in via di sviluppo da parte di una nota casa farmaceutica per uso clinico nell'uomo per la cheratite neurotrofica. Tuttavia, alcuni aspetti del ruolo del NGF nella cheratite neurotrofica rimanevano ancora inesplorati ed abbiamo deciso di studiarli nell'ambito di questo dottorato di ricerca. Nello specifico, è ben noto che una perdita di sensibilità corneale può essere causata non solo da alterazioni locali del plesso nervoso corneale, ma anche da patologie sistemiche quali ad esempio il diabete. Tuttavia, ad oggi è sempre stato utilizzato esclusivamente un modello animale di cheratite neurotrofica indotta da lesione al nervo trigemino, mentre non esistono modelli animali di cheratite neurotrofica indotta da denervazione sensitiva sistemica. Quindi, abbiamo sviluppato un nuovo modello animale di cheratite neurotrofica in cui la denervazione sensitiva viene indotta da un trattamento sistemico con capsaicina in ratti neonati, e abbiamo valutato gli effetti della somministrazione esogena di NGF in collirio in questo modello animale di cheratite neurotrofica. In questo studio (Capsaicin-induced corneal sensory denervation and healing impairment are reversed by NGF treatment. Lambiase A, Aloe L, **Mantelli F**, Sacchetti M, Perrella E, Bianchi P, Rocco ML, Bonini S. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Dec 17;53(13):8280-7.) abbiamo

dimostrato che l'iniezione intraperitoneale di capsaicina in ratti neonati è in grado di indurre una denervazione sensitiva come evidenziato da una riduzione della sensibilità tattile dolorifica allo stimolo con piastra calda (hot-plate test) e da una riduzione della sensibilità corneale come dimostrato da un ridotto numero di nervi corneali (colorati in immunocitochimica col cloruro d'oro) e da una riduzione della lacrimazione riflessa (valutata con test di Schirmer modificato) -vedi figura sottostante-



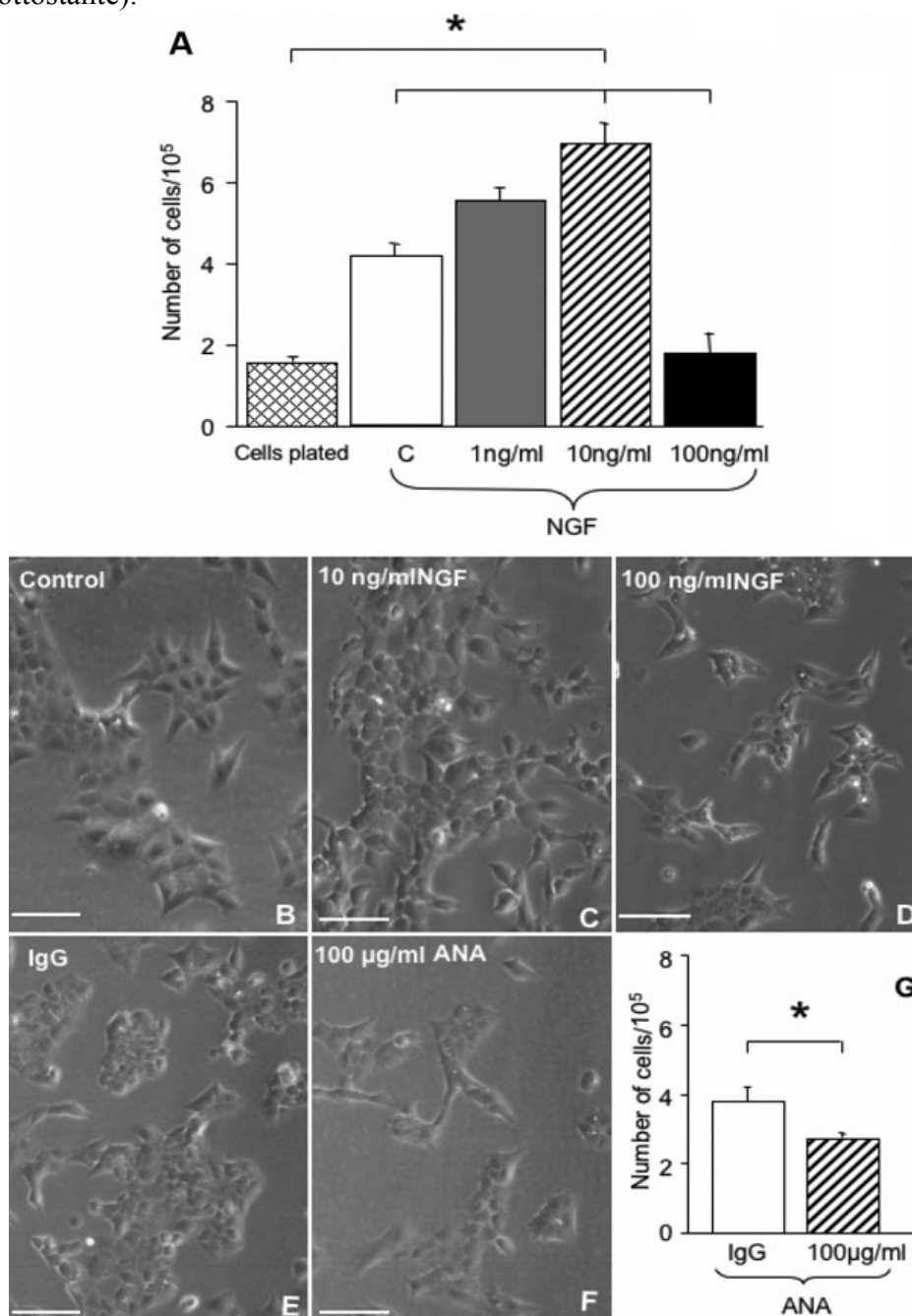
Inoltre, in questo studio abbiamo confermato in questo modello animale di denervazione sensitiva sistemica, quanto già noto per la denervazione locale della cornea, e cioè che il trattamento topico con NGF in collirio è in grado di migliorare la sensibilità corneale e facilitare la guarigione dell'epitelio corneale. Nello specifico, abbiamo osservato che la somministrazione esogena di NGF in collirio è in grado di aumentare l'espressione dei recettori del NGF e di un marker delle cellule staminali

corneali, il p63, suggerendo un'efficacia ad ampio spettro del NGF sui meccanismi riparativi corneali. Inoltre, in seguito a rimozione meccanica dell'epitelio corneale nei ratti trattati con capsaicina, abbiamo osservato una riepitelizzazione più rapida in seguito a trattamento con NGF (vedi figura sottostante in cui si vede come il difetto epiteliale, colorato con fluoresceina, si riduce rapidamente di dimensioni fino a scomparire in meno di 48h in ratti trattati con NGF in collirio).



In seguito ai risultati ottenuti nello studio suddetto, che hanno ampliato quanto già noto sugli effetti del NGF esogeno sull'innervazione e healing corneale, abbiamo deciso di valutare un altro aspetto ancora non chiaro del ruolo del NGF nella cheratite neurotrofica disegnando uno studio in vitro sull'endotelio corneale. Infatti, l'endotelio corneale esprime i recettori del NGF e alcune evidenze scientifiche preliminari hanno dimostrato che pazienti affetti da cheratite neurotrofica sviluppano alterazioni a lungo termine dell'endotelio corneale, che sembrano essere causate dalle alterazioni della sensibilità corneale e innescate da un cross-talk epitelio-endotelio, tuttavia il ruolo del NGF sulle cellule endoteliali non era ancora chiaro. Nel nostro studio (NGF and NGF-receptor expression of cultured immortalized human corneal endothelial cells. Sornelli F, Lambiase A, **Mantelli F**, Aloe L. Mol Vis. 2010 Jul 29;16:1439-47.) abbiamo dimostrato in una linea cellulare di cellule corneali endoteliali umane (B4G12) che anche le cellule endoteliali sono fortemente responsive al NGF esogeno. Nello specifico, abbiamo osservato che aggiungendo NGF in coltura, aumentava l'espressione del recettore ad alta affinità del NGF TrkA e migliorava sensibilmente la

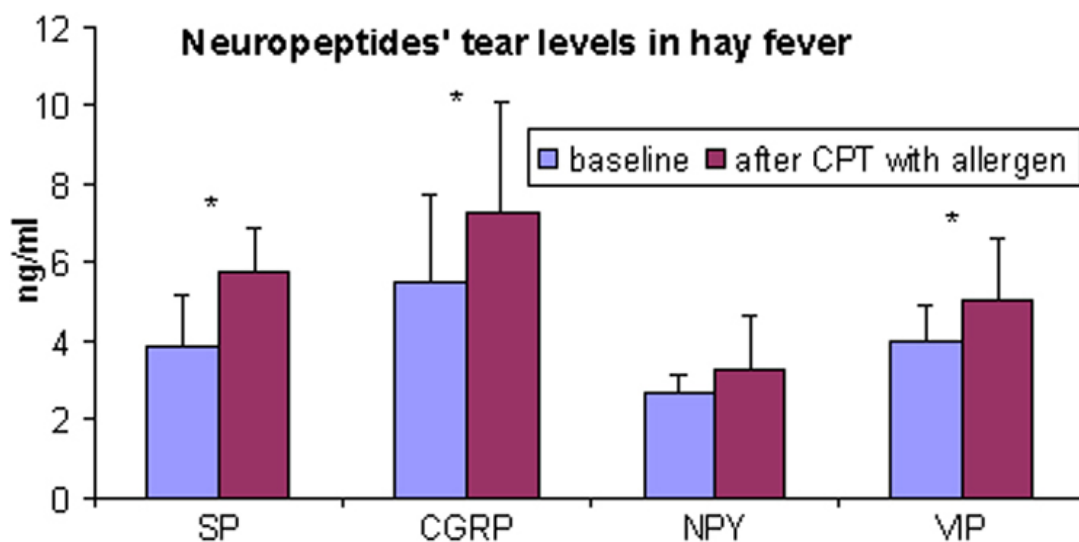
sopravvivenza cellulare, mentre l'anticorpo anti NGf (ANA) ha effetti opposti (vedi figura sottostante).



In conclusione, i risultati di questi studi ci hanno portato ad aggiungere ulteriori informazioni utili a comprendere ancora più a fondo i meccanismi di azione del NGF e a supportare ulteriormente la letteratura a favore di un suo futuro impiego nella pratica clinica come terapia topica per pazienti affetti da cheratite neurotrofica.

2.3 – Ruolo del NGF nella congiuntivite allergica

Come detto precedentemente, negli ultimi anni svariate evidenze scientifiche hanno provato che le reazioni allergiche sono influenzate dal sistema nervoso periferico. In seguito ai dati che abbiamo ottenuto con somministrazione di NGF in collirio in un modello animale di alterazione di disfunzione nervosa sensitiva periferica (discusso nel par. 2.2), abbiamo voluto valutare anche se il NGF e/o altri neuropeptidi sono implicati nelle patologie allergiche oculari. A questo fine, abbiamo misurato con test ELISA i livelli dei neuropeptidi nelle lacrime di pazienti sottoposti a test di provocazione congiuntivale con allergeni. In questo studio, condotto su 15 pazienti affetti da congiuntivite allergica stagionale in fase non attiva, abbiamo dimostrato che la provocazione congiuntivale con allergeni specifici innesca una risposta infiammatoria, come evidenziato dal rilascio nelle lacrime di Sostanza P (SP), peptide correlato al gene della Calcitonina (CGRP), Neuropeptide Y (NPY) e Peptide Intestinale Vasoattivo (VIP) -vedi figura sottostante-.



In uno studio successivo, abbiamo dimostrato anche che una terapia antiallergica topica porta a una riduzione dei livelli di questi neuropeptidi nelle lacrime (vedi fig. sottostante).

Table 1 Treatment with preservative-free cromolyn sodium 4%-chlorpheniramine maleate 0.2% eye drops inhibited the local release of substance P, calcitonine gene-related peptide, neuropeptide Y, and vasoactive intestinal peptide after conjunctival provocation test

Neuropeptides	Baseline (visit 1)			After treatment with cromolyn sodium (visit 2)		
	Before CPT	After CPT	<i>P</i> value	Before CPT	After CPT	<i>P</i> value
Substance P (ng/ml)	3.2±2	5.1±2.3	0.03	3.2±2.3	3.7±1.4	NSS
CGRP (ng/ml)	3.9±1.5	6.2±2.4	0.04	5±1.5	4.9±2.5	NSS
NPY (ng/ml)	2.8±0.4	3.7±1.5	NSS	3.2±1.2	4±1	NSS
VIP (ng/ml)	3.6±0.6	5.2±1.7	0.03	3.7±0.6	4.2±0.8	NSS

I risultati di questi studi suggeriscono che alla base della risposta allergica a livello oculare esista un meccanismo di infiammazione neurogenica. Questi dati aprono interessanti prospettive di ricerca e/o terapeutiche sull'uso del NGF in corso di patologie allergiche oculari. Infatti, già è stato proposto che l'NGF possa essere in grado di modulare la cascata citochinica e infiammatoria in corso di cheratocongiuntivite primaverile (VKC, una grave patologia allergica oculare). Tuttavia, si riteneva che ciò potesse avvenire esclusivamente tramite la modulazione da parte del NGF dell'espressione di recettori toll-like (quali TLR4 e 9). Sarà interessante valutare in studi futuri se, invece, gli effetti del NGF non vadano anche a toccare la suddetta infiammazione neurogenica della superficie oculare.

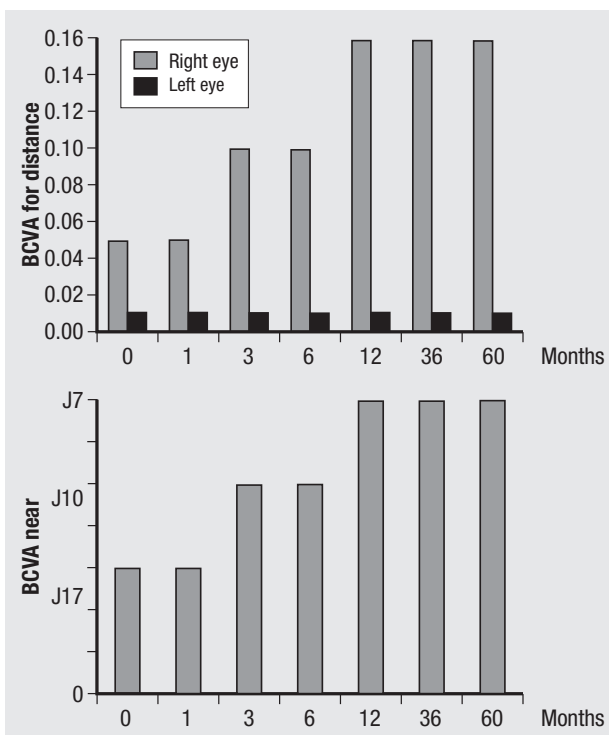
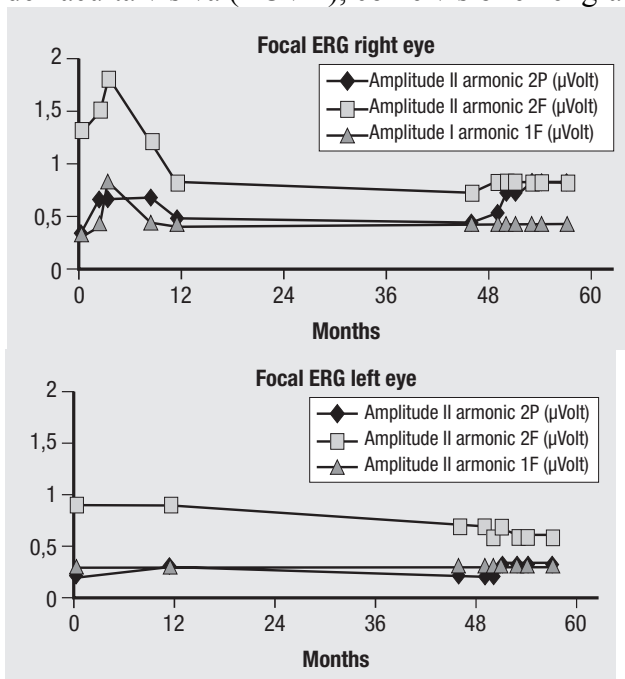
2.4 – Ruolo del NGF nelle degenerazioni retiniche

Come accennato precedentemente, sono numerosi gli studi pubblicati negli ultimi anni che hanno dimostrato come le cellule retiniche siano sensibili all'azione dell'NGF. Recentemente è anche stato dimostrato che la somministrazione di NGF induce il recupero funzionale delle cellule ganglionari retiniche in un modello animale di ischemia acuta della retina (Siliprandi et al., 1993). Per questo motivo, nell'ambito di questo dottorato di ricerca, abbiamo voluto valutare quali siano i meccanismi di azione del NGF a livello retinico, in particolare se possa interferire con i meccanismi che regolano l'apoptosi e/o la sopravvivenza cellulare in corso di patologie degenerative di natura e patogenesi diversa quali: la retinite pigmentosa, una patologia genetica che porta a cecità; la degenerazione maculare legata all'età, una patologia degenerativa cronica attualmente incurabile; la retinopatia diabetica, una patologia degenerativa retinica innescata da alterazioni glicidiche e metaboliche con conseguenze vascolari.

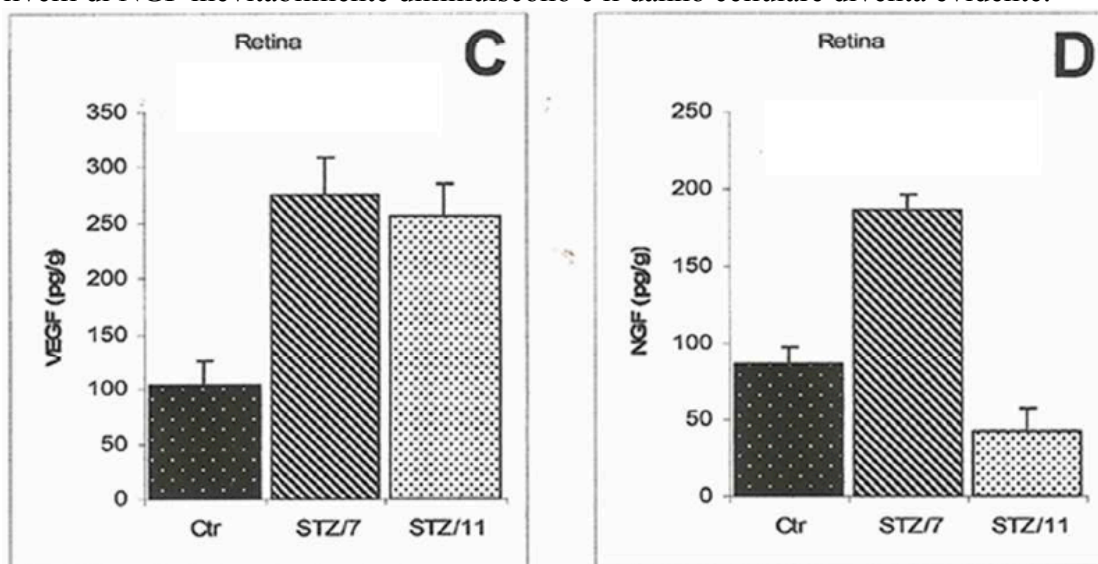
Come detto, il ruolo del NGF nella patogenesi della retinite pigmentosa è stato ampiamente studiato e descritto, tanto che esiste un modello animale di retinite pigmentosa in cui l'alterazione retinica è data da una disfunzione genetica della pathway del NGF: il ratto IRP/RCS. Non abbiamo effettuato ulteriori valutazioni sulla degenerazione retinica di questi ratti, già ampiamente descritta, mentre rimandiamo al Par. 2.1 per la descrizione degli studi che abbiamo pubblicato sugli effetti della compromissione della pathway del NGF sulla funzione lacrimale e sulla superficie oculare in questo modello animale.

Per valutare il ruolo del NGF nella degenerazione maculare legata all'età (DMLE), poiché non esistono modelli animali di questa patologia, riportiamo in questa sede i dati preliminari ottenuti in una paziente centenaria affetta da DMLE (Nerve growth factor eye drops improve visual acuity and electrofunctional activity in age-related macular degeneration: a case report. Lambiase A, Coassin M, Tirassa P,

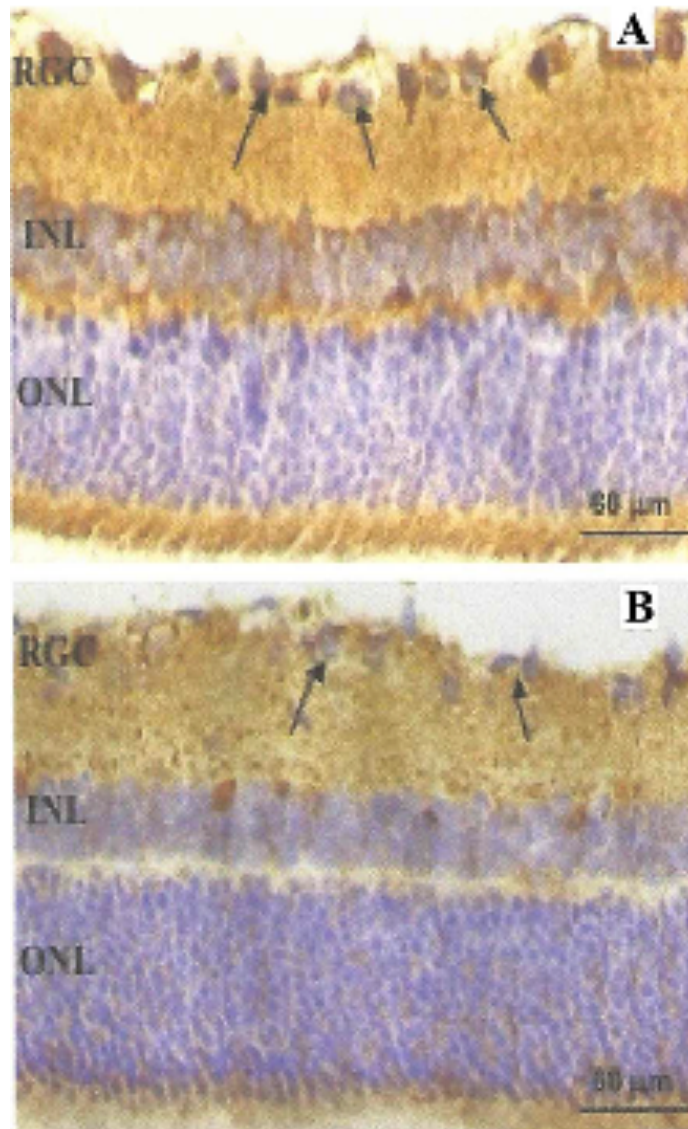
Mantelli F, Aloe L. Ann Ist Super Sanita. 2009;45(4):439-42.): la terapia con NGF in collirio ha indotto un miglioramento dei parametri elettrofunzionali (ERG) e dell'acuità visiva (BCVA), come visibile nei grafici sottostanti.



Infine, per valutare il ruolo del NGF nella retinopatia diabetica, abbiamo sviluppato un modello animale di diabete tramite iniezione intraperitoneale di streptozotocina nel ratto e siamo andati a valutare se il danno indotto dal diabete alle cellule ganglionari retiniche fosse correlato a un'alterazione della pathway del VEGF o del NGF (NGF and VEGF effects on retinal ganglion cell fate: new evidence from an animal model of diabetes. **Mantelli F**, Lambiase A, Colafrancesco V, Rocco ML, Macchi I, Aloe L. *Curr Eye Res.* 2013, *submitted*). In questo studio abbiamo evidenziato che subito dopo l'induzione del diabete si assiste ad un tentativo di compenso locale retinico con incremento dell'espressione del NGF. Tuttavia, a questo incremento iniziale di NGF corrisponde un'aumentata sopravvivenza delle cellule ganglionari retiniche. Tuttavia, come si vede nella figura sottostante, col tempo i livelli di NGF inevitabilmente diminuiscono e il danno cellulare diventa evidente.



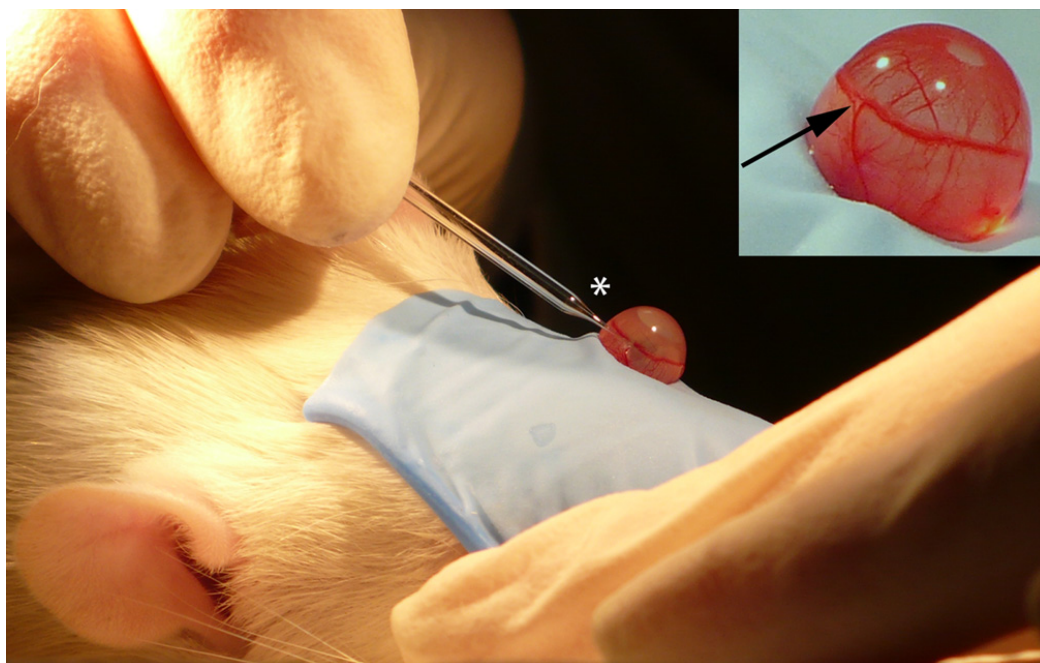
E' altresì interessante notare che lo stesso non avviene con il VEGF, che appare sempre elevato dopo l'induzione del diabete. A ulteriore dimostrazione che i ruoli di VEGF e NGF nella retinopatia diabetica sono indipendenti, abbiamo in seguito iniettato nel vitreo dei ratti anticorpo anti NGF, inducendo un sensibile peggioramento del danno alle cellule ganglionari retiniche (vedi Fig. sottostante), senza alcuna modificazione significativa dei livelli di VEGF.



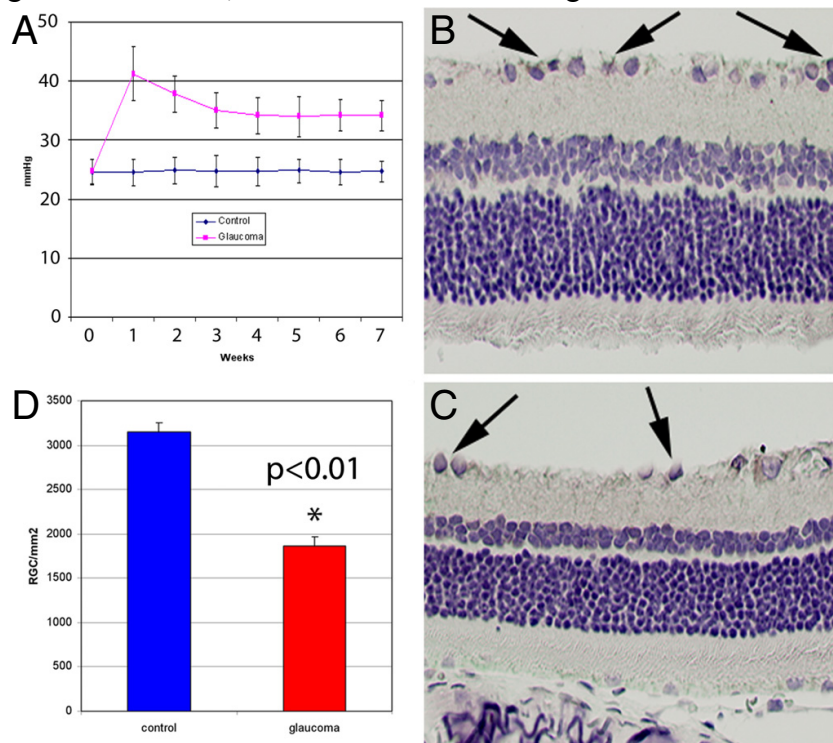
In conclusione, i nostri risultati forniscono una chiara evidenza che l'NGF svolge un importante ruolo protettivo sulle cellule ganglionari retiniche e potrebbe essere utilizzato in futuro come terapia per diverse patologie degenerative della retina. A supporto di questa ipotesi, va ricordato che è stato recentemente dimostrato che il NGF somministrato in collirio è in grado di raggiungere retina e nervo ottico nel ratto, aprendo interessanti prospettive terapeutiche.

2.5 – Ruolo del NGF nel glaucoma

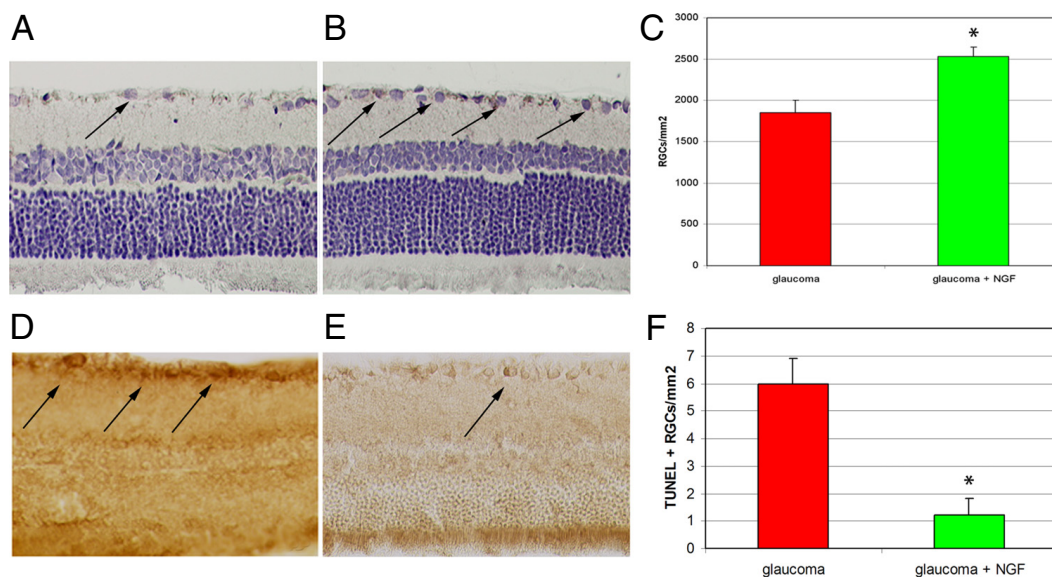
Il glaucoma è un otticopatia caratterizzata da una perdita di cellule ganglionali retiniche e fibre nervose (Quigley H.A.,1989) causata principalmente da un danno ipertensivo. Viste le premesse fatte nel paragrafo precedente sui ruoli protettivi del NGF sulle cellule ganglionali retiniche, è evidente che è stato nostro interesse andare a valutare il suo ruolo in modelli animali di glaucoma e in pazienti con glaucoma (Experimental and clinical evidence of neuroprotection by nerve growth factor eye drops: Implications for glaucoma. Lambiase A, Aloe L, Centofanti M, Parisi V, **Mantelli F**, Colafrancesco V, Manni GL, Bucci MG, Bonini S, Levi-Montalcini R. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug 3.). Nello specifico, per valutare gli effetti dell'NGF endogeno ed esogeno su le cellule ganglionali sottoposte all'insulto ipertensivo abbiamo utilizzato un modello animale di ipertono oculare indotto da iniezione di soluzione salina iperosmolare nelle vene episclerali del ratto (vedi fig. sottostante).



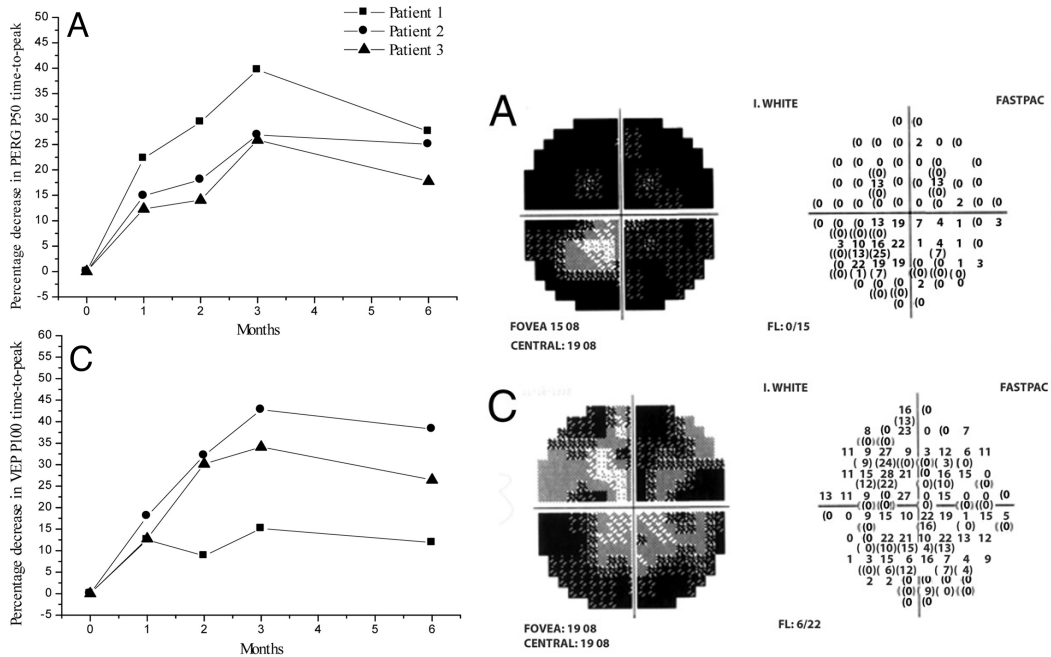
L'induzione del glaucoma con questo metodo ha portato a una significativa perdita di cellule ganglionari retiniche, come evidenziato dalla figura sottostante.



Per valutare gli effetti del NGF in questo modello animale di glaucoma, abbiamo trattato gli animali con NGF in collirio e abbiamo evidenziato una riduzione della perdita di cellule ganglionari retiniche e del numero di cellule in apoptosi (positive alla colorazione immunoistochimica con TUNEL, vedi fig. sottostante).



Infine, visti i promettenti risultati ottenuti in questo modello animale di glaucoma, abbiamo trattato compassionevolmente con NGF in collirio 4 pazienti con glaucoma che stavano inevitabilmente diventando ciechi nonostante terapia antiipertensiva massimale. In questi pazienti abbiamo dimostrato un ampliamento del campo visivo e un miglioramento dei parametri elettrofunzionali della retina (ERG e VEP), come visibile nelle figg. sottostanti.



In conclusione, in questo lavoro abbiamo dimostrato la possibilità di proteggere le cellule ganglionari dal danno ipertensivo mediante la somministrazione di NGF in collirio, che agisce da vero e proprio farmaco neuroprotettore per il nervo ottico, aprendo interessanti prospettive terapeutiche per questa patologia molto comune e attualmente incurabile.

Infine, è interessante ricordare che questi risultati sul glaucoma aprono anche interessanti prospettive di ricerca e terapeutiche per altre patologie neurodegenerative quali l'Alzheimer e il Parkinson: infatti, dati preliminari sul topo hanno dimostrato che il NGF somministrato in collirio è in grado di raggiungere anche il sistema nervoso centrale.

ELENCO PUBBLICAZIONI ALLEGATE

1. Capsaicin-induced corneal sensory denervation and healing impairment are reversed by NGF treatment. Lambiase A, Aloe L, **Mantelli F**, Sacchetti M, Perrella E, Bianchi P, Rocco ML, Bonini S. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Dec 17;53(13):8280-7.
2. Bevacizumab eye drop treatment stimulates tear secretion in rats through changes in VEGF and NGF lacrimal gland levels. Rossi S, **Mantelli F**, Lambiase A, Aloe L. Arch Ital Biol. 2012 Mar;150(1):15-21.
3. Alterations of tear neuromediators in dry eye disease. Lambiase A, Micera A, Sacchetti M, Cortes M, **Mantelli F**, Bonini S. Arch Ophthalmol. 2011 Aug;129(8):981-6.
4. Neurogenic inflammation of the ocular surface. **Mantelli F**, Micera A, Sacchetti M, Bonini S. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2010 Oct;10(5):498-504.
5. Clinical applications of NGF in ocular diseases. Lambiase A, **Mantelli F**, Sacchetti M, Rossi S, Aloe L, Bonini S. Arch Ital Biol. 2011 Jun;149(2):283-92.
6. Tear levels of neuropeptides increase after specific allergen challenge in allergic conjunctivitis. Sacchetti M, Micera A, Lambiase A, Speranza S, **Mantelli F**, Petrachi G, Bonini S, Bonini S. Mol Vis. 2011 Jan 7;17:47-52.
7. Nerve growth factor eye drops to treat glaucoma. Lambiase A, **Mantelli F**, Bonini S. Drug News Perspect. 2010 Jul-Aug;23(6):361-7.

8. NGF and NGF-receptor expression of cultured immortalized human corneal endothelial cells. Sornelli F, Lambiase A, **Mantelli F**, Aloe L. Mol Vis. 2010 Jul 29;16:1439-47.
9. Nerve growth factor in the developing and adult lacrimal glands of rat with and without inherited retinitis pigmentosa. Muzi S, Colafrancesco V, Sornelli F, **Mantelli F**, Lambiase A, Aloe L. Cornea. 2010 Oct;29(10):1163-8.
10. Nerve growth factor eye drops improve visual acuity and electrofunctional activity in age-related macular degeneration: a case report. Lambiase A, Coassin M, Tirassa P, **Mantelli F**, Aloe L. Ann Ist Super Sanita. 2009;45(4):439-42.
11. Experimental and clinical evidence of neuroprotection by nerve growth factor eye drops: Implications for glaucoma. Lambiase A, Aloe L, Centofanti M, Parisi V, **Mantelli F**, Colafrancesco V, Manni GL, Bucci MG, Bonini S, Levi-Montalcini R. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug 3.

Submitted / In press:

1. The Cellular Mechanisms of Dry Eye: from Pathogenesis to Treatment. **Mantelli F**, Macchi I, Lambiase L, Massaro-Giordano M, Bonini S. J Cell Physiol. 2013
2. NGF and VEGF effects on retinal ganglion cell fate: new evidence from an animal model of diabetes. **Mantelli F**, Lambiase A, Colafrancesco V, Rocco ML, Macchi I, Aloe L. Curr Eye Res. 2013.

BIBLIOGRAFIA

- Aloe, L. and Levi-Montalcini, R. (1977) Mast cells increase in tissue of neonatal rats injected with the Nerve Growth Factor. *Brain Res.* 133: 358-366.
- Aloe, L., Micera, A. and Bonini, Se. (2000). Nerve growth factor, mast cells, and allergic inflammation. Academic Press Harcourt Publishers.
- Anderson DR. (1971). Experimental alpha-chymotrypsin glaucoma studied by scanning electromicroscopy. *Am J Ophthalmol* 71: 470-6.
- Angeletti, P.U. and Levi-Montalcini, R. (1969). Sympathetic nerve cell destruction in newborn mammals by 6-Hydroxydopamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 65: 114-121.
- Angeletti, R.H. and Bradshaw, R.A. (1971). Nerve growth Factor from submaxillary gland: amino acid sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 2417-2420.
- Armaly MF. (1963). Effects of corticosteroids on intraocular pressure and fluid dynamics. *Arch Ophthalmol* 70: 482.
- Atkins, E. (1960). The pathogenesis of fever. *Physiol. Rev.* 40: 580-646.
- Ayer-Lelievre CS, Ebendal T, Olson L, Seiger A. Localization of nerve growth factor-like immunoreactivity in rat nervous tissue. *Med Biol.* (1983);61:296-304.
- Bandtlow, C.E.; Meyer, M.; Lindholm, D.; Spranger, M.; Heumann, R. and Thoenen, H. (1990) Regional and cellular codistribution of Interleukin-1 beta and nerve Growth factor mRNA in the adult rat brain: possible relationship to the regulation of Nerve Growth Factor synthesis. *J Cell Biol.* 111: 1701-1711.
- Barkan O. (1938) Glaucoma: classification, causes and surgical control. *Am J Ophthalmol* 21:1099.
- Barron BA, Busin M, Pge C, Bergsma DR, Kaufman HE. Comparison of the effects of Viscoat and Healon on postoperative intraocular pressure. *Am J Ophthalmol* (1985); 100: 377-84.

- Ben Rhouma, K. and Sakly, M. (1994). Involution of rat thymus: characterization of cytoplasmic glucocorticoid receptors, evidence of glucocorticoid resistant dexamethazone receptor-positive cells. *Archives Internationales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique*. 102:97-102.
- Bepler, G.M.D. (1994). Thymosin alpha-1 as adjunct for conventional therapy of malignant tumors: a review. *Cancer Investigation* 12 (5): 491-496.
- Blalock, J.E. (1992). *Chem. Immunol.* 52: 1-24.
- Bocchini V, Angeletti PU. The nerve growth factor: purification as a 30000 molecular weight protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1968);64:787-794.
- Bocchini, V. and Angeletti, P.U. (1969) The nerve growth factor: Purification as a 30.000-molecular-weight protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64: 7787-7794.
- Bonfanti L, Candeo P, Piccinini M, et al. Distribution of protein gene product 9.5 (PGP 9.5) in the vertebrate retina: evidence that immunoreactivity is restricted to mammalian horizontal and ganglion cells. *J Comp Neurol*. 1992;322:35-44.
- Bothwell, M. (1991) Keeping track of neurotrophin receptors. *Cell* 65: 915-918.
- Boyd, E. (1932). The weight of the thymus gland in health and in disease. *Am. J. Dis. Child*. 43:1162-1214.
- Bracci Laudiero L, Vigneti E, Iannicola C, Aloe L. NGF retards apoptosis in chick embryo bursal cell in vitro. *Differentiation*. 1993;53:61-66.
- Caldarella, J., Goodall, G.J., Felix, A.M., Heimer, E.P., Salvin, S.B. and Horecker, B.L. (1983). Thymosin a11: a peptide related to thymosin a1 isolated from calf thymosin fraction 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80: 7424.
- Calissano, P.; Monaco, G.; Castellani, L.; Mercanti, D. and Levi, A. (1978) Nerve growth factor potentiates actomyosin adenosinetriphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2210-2214.

- Calvo, J.R., Guerrero, J.M., Goberne, R. (1989): Interaction of thymic peptide thymosin alpha 1 with VIP receptors in rat intestinal epithelial cells: comparison with PHI and secretin. *Gen. Pharmacol.* 20: 503-505.
- Carmignoto G, Comelli MC, Candeo P, et al. Expression of NGF receptor mRNA in the developing and adult rat retina. *Exp Neurobiol.* (1991);111:302-311.
- Carmignoto G, Maffei L, Candeo P, Canella R, Comelli C. Effect of NGF on the survival of rat retinal ganglion cells following optic nerve section. *J Neurosci.* (1989);9:1263-1272.
- Chakrabarti S, Sima AA, Lee J, Brachet P, Dcou E. Nerve growth factor (NGF), proNGF and NGF receptor-like immunoreactivity in BB rat retina. *Brain Res.* 1990;523:11-15.
- Clark, I.A.; Cowden, W.B.; Butcher, G.A. and Hunt, N.H. (1987) Possible roles of tumor necrosis factor in the pathology of malaria. *Am. J. Pathol.* 129: 192-199.
- Cohen, J.J., and Duke, R.C. (1984). "Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death.
- Cohen, S (1960) Purification of a nerve growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46: 302-311.
- Cohen, S. (1959) Purification and metabolic effects of a nerve growth-promoting protein from snake venom. *J. Biol. Chem.* 234: 1129-1137.
- Cohen, S.; Levi-Montalcini, R. and Hamburger, V. (1954) A nerve-growth-stimulating factor isolated from sarcoma 37 and 180. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 40: 1014-1018.
- Comsa , J. and HooK, J.R.R. (1973). Thymectomy in T.D. Lockey eds . Thymic Hormones University Park Press Baltimore.
- Cremins, J.; Wagner, J.A. and Haleboua, S. (1986) Nerve growth factor action is mediated by cyclic AMP and Ca⁺⁺/phospholipid-dependent protein kinases. *J. Cell Biol.* 103: 887-893.

- Dandona L, Hendrickson A, Quigley HA. Selective effects of experimental glaucoma on axonal transport by retinal ganglion cells to the dorsal lateral geniculate nucleus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (1991); 32: 1593-99.
- Dascombe, M.J.; Rothwell, N.J.; Sagay, B.O. and Stock, M.J. (1989) Pyrogenic and thermogenic affects of Interleukin 1 β in rat. *Am. J. Physiol.* 256: E7-E11.
- De Carvalho CA. Histopathology of the retina and optic nerve with experimental glaucoma. *Arch Ophthalmol* (1962); 67: 483.
- De Monasterio FM, Gouras P, Tolhurst DJ. Spatial summation, response pattern and conduction velocity of ganglion cells of the rhesus monkey retina. *Vision Res* (1976); 16: 674.
- De Monasterio FM, Gouras P. Functional properties of ganglion cells of the rhesus monkey retina. *J Physiol (Lond)* (1975); 251: 167.
- Dicou E, Nerriere V, Naud MC, de Kozak Y. NGF involvement in ocular inflammation: secretion by rat resident retinal cells. *NeuroReport.* (1994);6:26-28.
- Dicou, E.; Lee, J. and Brachet, P. (1986) Synthesis of nerve growth factor mRNA and precursor protein in the thyroid and parathyroid glands of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7084-7088.
- Domenici L., Berardi N., Maffei L. 1991 Nato Advanced Study Institute
- Duke-Elder S. (1969) System of Ophthalmology. Mosby. St. Louis.
- Ebendal T, Persson H. Detection of nerve growth factor mRNA in the developing chicken embryo. *Development.* 1988;102:101-106.
- Ebendal, T. (1992) Function and evolution in the NGF family and its receptor. *J. Neurosci. Res.* 32: 461-470.
- Edwards, R.H.; Selby, M.J. and Rutter, W.J. (1986) Differential RNA splicing predicts two distinct nerve growth factor precursors. *Nature* 319: 784-787.
- Emery JM, Landis D, PAton D, et al. The lamina cribrosa in normal and glaucomatous human eyes. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* (1974); 78: 290.

- Frade, JM., Barde, YA. (1998). Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *Byoessays* 20:137–145.
- Gaasterland D, Kupfer C. Experimental glaucoma in the rhesus monkey. *Invest Ophthalmol* (1974); 13: 455-7.
- Garaci, R.C. (1983). *Science*. 222, 1163-1165.
- Glovinsky Y, Quigley HA, Dunkelberger GR. Retinal ganglion cell loss is size dependent in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (1991); 32: 484-91.
- Gnahn, H.; Hefti, F.; Heumann, R.; Schwab, M.E. and Thoenen, H. (1983) NGF-mediated increase of Choline Acetyltransferase (ChAT) in the neonatal rat forebrain: evidence for a physiological role of NGF in the brain? *Dev. Brain Res.* 9: 45-52.
- Goldstein, L.A.; Reynolds, C.P. and Perez-Polo, J.R. (1978) Isolation of human nerve growth factor from placental tissue. *Neurochem. Res.* 3: 175-183.
- Green, S.H.; Ridel, R.E.; Connolly, J.L. and Greene, L.A. (1986) PC12 cell mutants that possess low- but not high-affinity nerve growth factor receptors neither respond to nor internalize nerve growth factor. *J. Cell Biol.* 102: 830-843.
- Greene, L.A. and Shooter, E.M. (1980) The nerve growth factor: Biochemistry, synthesis, and mechanism of action. *Ann. Rev. Neurosci.* 3: 353-402.
- Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D.R., Parada, L.F., and Chao, M.V. (1991) High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350: 678-682.
- Johansson JO. Inhibition of retrograde axoplasmic transport in rat optic nerve by increased IOP in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (1983); 24: 1552.
- Johnson JE, Barde YA, Schwab M, and Thonen H (1986b) Brain derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 6:3031-8,
- Johnson, D.; Lanahan, A.; Buck, C.R.; Sehgal, A.; Morgan, C.; Mercer, E.; Bothwell, M. and Chao, M. (1986) Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47: 545-554.

- Kalvin NH, Hamasaki DI, Gass JDM. Experimental glaucoma in monkeys. I. Relationship between intraocular pressure and cupping of the optic disk and cavernous atrophy of optic nerve. *Arch Ophthalmol* (1966); 76: 82-93.
- Kaplan D.R.; Martin-zanca, D.; Chao, M.V. and Parada, L.F. (1991) The Trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for NGF. *Science* 252: 554.
- Kirsch RE. Glaucoma following cataract extraction associated with use of alpha-chymotrypsin. *Arch Ophthalmol* 1(964); 72: 612-20.
- Klein, R.; Jin, S.; Nanduri, V.; O'Rourke, E. and Barbacid, M. (1991) The trk proto-oncogene encodes a receptor for the Nerve Growth Factor. *Cell* 65: 189.
- Kuriyama S., Teruyo O. Yoshimura N, Yoshihito H. Growth factor-induced cytosolic calcium ion transients in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Inv Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32:2882-2890.
- La Vail MM, Unoki K, Yasumura D, Matthes MT, Yancopoulos GD, Steinberg RH. Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:11249-11253.
- Lad SP, Peterson DA, Bradshaw RA, Neet KE. (2003). Individual and combined effects of trkA and p75NTR nerve growth factor receptors. A role for the high affinity receptor site. *J Biol Chem* 278:24808– 24817.
- Lambiase A, Aloe L. Nerve Growth Factor Delays Retinal Degeneration in C3H Mice. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*, 234: S96-S100, 1996.
- Landmesser, L. and Pilar, G. (1976) Fate of ganglionic synapses and ganglion cell axons during normal and induced cell death. *J. Cell Biol.* 68: 357.
- Landreth, G.E. and Shooter, E. (1980) Nerve growth factor receptors from low-to high-affinity states. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4751_4755.
- Lehwalder D, Jeffrey PL, Unsicker K. Survival of purified embryonic chick retinal ganglion cells in the presence of neurotrophic factors. *J Neurosci Res.* 1989;24:329-337.

- Lessell S, Kuwabara T. Experimental alpha-chymotrypsin glaucoma. *Arch Ophthalmol* (1969); 81: 853-64.
- Leventhal AG, Rodieck RW, Dreher B. Retinal ganglion cell classes in the old world monkey: Morphology and central projections. *Science* (1981); 213: 1139.
- Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science*. (1987);237:1154-1162.
- Levi-Montalcini, R. (1966) *Harvey Lect* 60: 217.
- Levi-Montalcini, R. (1976) The nerve growth factor: its role in growth, differentiation and function of the sympathetic adrenergic neuron. *Prog. Brain Res.* 45: 235-256.
- Levi-Montalcini, R. and Angeletti, P.U.(1968) Nerve Growth Factor. *Physiological Reviews* 48 : 534-567.
- Levi-Montalcini, R. and Hamburger, V. (1951) Selective growth-stimulation effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 116: 321-362.
- Levi-Montalcini, R.; Aloe, L. and Alleva, E.(1990) A role for nerve growth factor in nervous , endocrine and immune system. *Progress in NeuroEndocrinImmunology* 3: 1-10.
- Levi-Montalcini, R.; Meyer, H. and Hamburger, V. (1954). In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo. *Cancer res.* 14: 49-57.
- Li, A.K.C.; Koroly, M.J.; Schattenkerk, M.E.; Malt, R.A. and Young, M. (1980) Nerve Growth Factor acceleration of the rate of wound healing in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4379-4381.
- Loeb, D.M.; Maragos, J.; Martin-Zanca, D.; Chao, M.V.; Parada, L.F. and Greene, L.A. (1991) The Trk proto-oncogene rescues NGF responsiveness in mutant NGF-nonresponsive PC12 cell lines. *Cell* 66: 961-966.

Low, T.L.K., Thurman, G.B., Mc Adoo, M., Mc Clure, J., Rossio, L., Naylor, P.H. and Goldstein, A.L. (1979) *J.Biol. Chem.* 254: 981.

Luntz MH. Experimental glaucoma in rabbits. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1962; 82: 271-82.

Lutz M, Krieglstein K, Schmit S, Ten Dijke P, Sebald W, Wizenmann A, et al. (2004). Nerve growth factor mediates activation of the smad pathway in PC12 cells. *Eur J Biochem* 271:920–931.

MacDonald, N.Q.; Lapatto, R.; Murray-Rust; J., Gunning, J.; Wlodawer, A. and Blundell, T.L. (1991) New protein fold revealed by 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature* 354: 411-414.

MacGuire, J.C.; Greene, L.A. and Furano, A.V. (1978) NGF stimulates incorporation of fucose or glucosamine into an external glycoprotein in cultured rat PC12 pheochromocytoma cells. *Cell* 15: 357.

MacRae Sm, Edelhauser HF, Hyndiuk RA, Burd EM, Schultz RO. The effects of sodium Hyaluronate, chondroitin sulfate, and methylcellulose on the corneal endothelium and intraocular pressure. *Am J Ophthalmol* (1983); 95: 332-41.

Maher, P.A. (1988) Nerve growth factor induces protein-tyrosine phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6788-6791

Manni GL, Lambiase A, Centofanti M, et al. Histopathological evaluation of retinal damage during intraocular hypertension in rabbit: involvement of ganglion cells and nerve fiber layer. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*, 234: S126-S134, (1996).

McKenzie W. (1830) A practical treatise on diseases of the eye. Longman, Rees. Orm, Brown and Green, London.

Meakin, S.O. and Shooter, E.M. (1991) Molecular investigation on the high-affinity nerve growth factor receptor. *Neuron* 6: 153-163.

Micera A, Vigneti E, Pickholtz D, Reich R, Pappo O, Bonini Se., et al. (2001). Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts,

demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6162–6167.

Micera, A., Puxeddu, I., Aloe, L., Levi-Schaffer, F. (2003). New Insight on the involvement of nerve growth factor in allergic inflammation and fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:369–374.

Mobley, W.C.; Server, A.C.; Ishii, D.N.; Riopelle, R.J. and Shooter, E.M. (1977) Nerve Growth Factor. *N. Engl. J. Med.* 297: 1096-1104.

Oyster CW, Takahashi ES, Hurst DC. Density, soma size and regional distribution of rabbit retina ganglion cells. *J Neurosci.* (1981);1:1331-1346.

Pandiella-Alonso, A.; Malgaroli, A.; Vincentini, L.M. and Mendolesi, J. (1986) Early rise of cytosolic Ca⁺⁺ induced by Nerve Growth Factor in PC12 and cromaffin cell. *Febs Lett.* 208: 48-51.

Pederson JE, DE Gaasterland. Laser-induced primate glaucoma. *Arch Ophthalmol* (1984); 102: 1689.

Pernow, B. (1985) Role of tachykinins in neurogenic inflammation. *J. Immunol.* 135: 812-815.

Quigley HA, Addicks EM. Chronic experimental glaucoma in primates: II. Effect of extended intraocular pressure elevation on optic nerve head and axonal transport. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (1980); 19: 137.

Quigley HA, Addicks EM. Regional differences in the structure of the lamina cribrosa and their relation to glaucomatous optic nerve damage. *Arch Ophthalmol* (1981); 99: 137.

Quigley HA, Dunkelberger GR, Green WR. Chronic human glaucoma causing selectively greater loss of large optic nerve fibers. *Ophthalmology* (1988); 95: 357.

Quigley HA, Dunkelberger GR, Green WR. Retinal ganglion cell atrophy correlated with automated perimetry in human eyes with glaucoma. *Am J Ophthalmol* (1989); 107:453.

Quigley HA, Dunkelberger GR, Green WR. Study of retinal ganglion cell atrophy correlated with automated perimetry in human eyes with glaucoma. *Am J Ophthalmol.* (1989);107:453-464.

Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA, Pease ME, Thibault DJ, Zack DJ. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Inv Ophthalmol Vis Sci.* (1995);36:774-786.

Quigley HA, Sanchez RM, Dunkelberger GR, L'Hernault NL, Baginski TA. Chronic glaucoma selectively damages large optic nerve fibers. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (1987);28:913-920.

Quigley HA, Sanchez RM, Dunkelberger GR, L'Hernault NL, Baginski TA. Chronic glaucoma selectively damages large optic nerve fibers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (1987); 28: 913.

Radius RL. Distribution of pressure-induced fast axonal transport abnormalities in primate optic nerve: An autoradiographic study. *Arch Ophthalmol* (1981); 99: 1253.

Radius RL, Anderson DR. Rapid Axonal transport in primate optic nerve: Distribution of pressure- induced interruption. *Arch Ophthalmol* (1981); 99: 650.

Radius RL, Anderson DR. Morphology of axonal transport abnormalities in primate eyes. *Br J Ophthalmol* (1981b); 65: 767.

Radius RL, Gonzales M. Anatomy of the lamina cribrosa in human eyes. *Arch Ophthalmol* (1981); 99: 2159.

Rebar, R.W., Miyake, A., Low, T.L.K., and Goldstein, A.L.1981. Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor. *Science* 214:669.

Sanchez RM, Dunkelberger GR, Quigley HA. The number and diameter distribution of axons in the monkey optic nerve. *Invest Ophthalmol* (1986); 27: 1342.

Schiller PH, Malpeli JG. Functional specificity of lateral geniculate nucleus laminae of the rhesus monkey. *J Neurophysiol* (1978); 41: 788.

- Schiller PH, Malpeli JG. Properties and tectal projections of monkey retinal ganglion cells. *J Neurophysiol* (1977); 40: 428.
- Sears D, Sears M. Blood-aqueous barrier and alpha-chymotrypsin glaucoma in rabbits. *Am J Ophthalmol* (1974); 77: 378-83.
- Seiler, M. and Schwab, M. (1984) Specific retrograde transport of Nerve Growth Factor (NGF) from neocortex to nucleus basalis in the rat. *Brain Res.* 300: 33-39.
- Selby, M.J.; Edwards, R.; Sharp, F. and Rutter, W.J. (1987) Mouse nerve growth factor gene: structure and expression. *Mol. Cell Biol.* 7: 3057-3064.
- Shirakashi M, Nanba K, Iwata K. Changes in reversal of cupping in experimental glaucoma. *Ophthalmology* (1992); 99: 1104-10.
- Shirakawa H, Yoshimura N, Nobuchika O. Growth factors induce actin disruption in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmic Res.* 1986; 18:338-342.
- Siliprandi R, Canella R, Carmignoto G. Nerve growth factor promotes functional recovery of retinal ganglion cells after ischemia. *Inv Ophthalmol Vis Sci.* (1993);34:3232-3245.
- SofroniewMV, Howe CL, Mobley WC. (2001). Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 24:1217– 1281.
- Sutter, A.; Riopelle, R.J.; Harris-Warrick; MR.M. and Shooter, E. (1979) Nerve Growth Factor Receptor. *J. Biol. Chem.* 254: 5972-5982.
- Thoenen, H. and Barde, Y.A. (1980) Physiology of Nerve Growth Factor. *Physiol. Rev.* 60: 1284-1323.
- Thoenen, H.; Bandtlow, C. and Heumann, R. (1987) The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: comparison with the periphery. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 109: 145-178.
- Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with Tyrosine Kinase activity. *Cell* 61: 203-212.

Ullrich, A.; Gray, A.; Berman, C. and Dull, T.J. (1983) Human β -nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature* 303: 821-825.

Vahouny, G.V., Kyeyune-Nyombi, E., Mc Gillis, J.P., Tare, N.S., Huang, K.Y., Tombes, R., Goldstein, A.L., Varon, S.; Nomura, J. and Shooter, E.M. (1967) The isolation of the mouse Nerve Growth Factor in a high molecular weight form. *Biochemistry* 6: 2202.

Van de Wijngaert, F.P., Kendall, M.D., Schurman, H.J., Rademarkers, L.H.M.P. and Kater, L. (1985). *Cell. Tiss. Res.* 237: 227.

Vareilles P, Durand G, Siou G, Le Douarec JC. Le modèle de glaucome expérimental à l'alpha-chymotrypsine chez le lapin: étude histologique. *J Fr Ophthalmol* (1979); 2: 561-68.

von Graefe A. (1861) Three memories on iridectomy. In: Selected monographs. The new Sydenham Society. London

Vrabec F. Glaucomatous cupping of the human optic disk: a neuro-histologic study. *Albrecht von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* (1976); 198: 223.

Wade, A.W., Szewczuk, M.R. (1984). Aging, idiotype repertoire shifts, and compartmentalization of the mucosal -associated lymphoid system. *Adv. Immunol.* 36: 143-188.

Weskamp G, Otten U. An enzyme-linked immunoassay for nerve growth factor (NGF): a tool for studying regulatory mechanisms involved in NGF production in brain and in peripheral tissues. *J Neurochem.* (1987);48:1779-1786.

Zhu MD, Cai FY. Development of experimental chronic intraocular hypertension in the rabbit. *Austl NwZ J Ophthalmol* (1992); 20 (3): 225-34.

Zhu MD, Cai FY. Development of experimental chronic intraocular hypertension in the rabbit. *Austl NwZ J Ophthalmol.* (1992);20:225-234.