

Nerve growth factor e sclerosi multipla: studi su modelli animali e nell'uomo

Luigi ALOE (a), Angela IANNITELLI (b) e Viviana TRIACA (a)

(a) Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma

(b) Dipartimento di Scienze Psichiatriche e Medicina Psicologica,
Università degli Studi "La Sapienza", Roma

Riassunto. - Studi pubblicati per la prima volta nel nostro laboratorio hanno dimostrato che il *nerve growth factor* (NGF), fattore pleiotropico coinvolto nella crescita, nel differenziamento e nel riparo dal danno, va incontro a significativi cambiamenti nel cervello di soggetti affetti da sclerosi multipla (SM) e del modello animale della patologia, l'encefalite allergica sperimentale (EAS). Durante gli ultimi anni, questi dati sono stati oggetto di studi più approfonditi ed i risultati ottenuti sembrano avvalorare l'ipotesi di un ruolo della molecola NGF nella patogenesi della SM. Ricerche condotte più recentemente su modelli animali hanno evidenziato un'azione anti-infiammatoria del NGF, mediata dai linfociti T e protettiva rispetto al danno neurologico in primati non-umani affetti da EAS. Nonostante questi dati, ulteriori studi saranno necessari per valutare il ruolo fisiopatologico del NGF nella SM al fine di contribuire alla identificazione di nuove strategie terapeutiche.

Parole chiave: *nerve growth factor*, neurotrofine, sclerosi multipla, encefalomyelite allergica sperimentale, demielinizzazione, infiammazione, cellule staminali.

Summary (Nerve growth factor and multiple sclerosis: studies on animal models and in humans). - We first reported that the level of nerve growth factor (NGF), a pleiotrophic factor produced in central nervous system (CNS) implicated in growth, differentiation and repair of brain neurones, undergoes through significant changes in brain of patients with multiple sclerosis (MS) and of its animal model experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Recently, much attention has been evolved around these studies, reinforcing the hypothesis about the role of NGF in this disorder. Indeed, current studies indicate that NGF stimulates growth and differentiation of stem cell in EAE, exerts anti-inflammatory action and reduces the severity of EAE in non-human primate, prospecting the clinical potentiality of NGF for MS. However, despite these findings, crucial evidences, such as, the identification and characterisation of the mechanism(s) implicated in tissue repair and in inflammatory responses, needs to be done to evaluate the role of NGF to identify potential therapeutic strategies for this demyelinating disorder.

Key words: nerve growth factor, neurotrophins, multiple sclerosis, experimental allergic encephalomyelitis, demyelination, inflammation, stem cells.

Introduzione

La sclerosi multipla (SM) è una malattia neurodegenerativa a carico del sistema nervoso centrale (SNC), dai molti aspetti ancora oscuri sul piano eziopatogenetico e, conseguentemente, dalle ricadute terapeutiche ancora poco convincenti. A tutt'oggi, di questa patologia si conosce, infatti, soltanto il meccanismo di progressione mentre ancora non è stato individuato l'elemento scatenante. Sul piano eziologico, sembrerebbero essere coinvolti fattori genetici e virali [1-3] mentre, da un punto di vista patogenetico, recenti evidenze sono a favore di un ruolo ricoperto dall'oligodendrocita (OL), la cellula che costituisce il rivestimento mielinico dell'assone.

Le alterazioni strutturali e funzionali a carico dell'OL sarebbero causate da differenti fattori genetici e/o virali o da alterazioni di sostanze presenti nel microambiente cellulare, sintetizzate da cellule vicine e/o utilizzate da queste. Studiare le sostanze del microambiente cellulare può, dunque, costituire una ulteriore chiave di comprensione dei meccanismi patogenetici della malattia [4-7]. Tra queste, le neurotrofine, e in particolare il *nerve growth factor* (NGF), vengono chiamate in causa in quanto sostanze riconosciute, tra l'altro, come *transcription factors*, cioè sostanze in grado di modificare il fenotipo cellulare attraverso la regolazione dell'espressione genica mediata da *signaling* via TrkA, via p75 e attraverso l'endosoma [8].

La SM è una patologia demielinizzante, caratterizzata, sul piano istopatologico, dal fenomeno della “demyelinizzazione periaassiale” che consiste nella perdita di mielina con conservazione dell’assone. Fu descritta per la prima volta, nel 1835, da Cruveilhier [9] e, nel 1868, Charcot, alla Salpêtrière, ne definì le caratteristiche cliniche e neuropatologiche, quali le numerose aree di demielinizzazione, le cosiddette “placche”, che insorgono preferenzialmente in alcune aree del SNC, quali le vie lunghe e la sostanza bianca periventricolare del midollo spinale, i nervi ottici, il tronco cerebrale ed il cervelletto [5, 10]. Tra le malattie demielinizzanti, la SM è quella che più frequentemente, dopo i traumi, provoca disabilità neurologica nella popolazione giovane-adulta.

Sul piano clinico, la perdita di rivestimento mielinico, in alcuni tratti delle fibre nervose, causa la comparsa di disturbi della conduzione dell’impulso nervoso con conseguenti *impairments* motori e/o sensitivi ingravescenti e, in alcune forme cliniche, permanenti [11].

Negli ultimi anni, la SM è stata considerata anche come una malattia infiammatoria a genesi autoimmune. Tale visione si fonda non solo sui dati neuropatologici ma anche sul riscontro di alterazioni immunitarie, quali la presenza di bande oligoclonali nel liquor ed il peggioramento clinico provocato dalla somministrazione di gamma interferon [12].

Le neurotrofine

Le neurotrofine (NT) sono un gruppo eterogeneo di polipeptidi in grado di regolare una serie di funzioni cellulari quali il differenziamento, la crescita ed il trofismo di specifici fenotipi cellulari. Presentano molte analogie di sequenza amminoacidica e, per questo, sono raggruppate a formare una famiglia di peptidi. I principali neuropeptidi che fanno parte di questa famiglia sono oltre al NGF, che è il fattore scoperto per primo e meglio conosciuto, il *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), la *neurotrophin-3* (NT-3), la *neurotrophin 4/5* (NT-4/5), la *neurotrophin-6* (NT-6) ed altri fattori di crescita scoperti più recentemente, quali il *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) [13, 14].

Le neurotrofine esercitano la loro azione legandosi a due classi di recettori localizzati sulla membrana cellulare: il recettore p75 e le Trk [15]. Il primo lega a bassa affinità tutte le neurotrofine; il significato biologico di questo legame non è ancora stato completamente chiarito. Le Trk sono una famiglia di recettori ad alta affinità implicati nelle funzioni di crescita e sopravvivenza dei neuroni. Il NGF ha un’alta affinità per il recettore TrkA, il BDNF e la NT-4/5 per la TrkB mentre la NT-3 lega la TrkA, la TrkB e la TrkC, mostrando per quest’ultima una maggiore affinità [16].

Il nerve growth factor

Il NGF è stato per la prima volta identificato nei sarcomi 180 e 37, tumori connettivali maligni del topo e, in seguito, nel veleno di serpente e nelle ghiandole salivari di topo maschio adulto. Oggi è noto che il NGF è prodotto da una grande varietà di cellule del tessuto periferico, del sistema nervoso centrale (SNC) e periferico (SNP) ma anche da cellule del sistema immunitario ed endocrino dei mammiferi, uomo incluso [17-20].

Nel SNC, il NGF è particolarmente presente a livello della corteccia frontale, dell’ippocampo, dell’ipotalamo e nel midollo spinale; la sua sintesi è regolata da molecole endogene, quali gli ormoni tiroidei, i corticosteroidi, i neuropeptidi e le citochine [19, 21, 22]. Nel SNC, il NGF esercita un’azione trofica sui neuroni colinergici del prosencefalo basale, in particolare a livello del setto mediale, del nucleo basale di Meynert della banda diagonale di Broca e, in misura minore, anche su alcuni neuroni del midollo spinale [20].

Lo spettro di azione di questa molecola non è limitato a specifiche classi neuronali centrali e periferiche, ma è esteso anche a cellule appartenenti al sistema immuno-emopoietico e, in situazioni fisiologiche, è sostenuto da cambiamenti neuroendocrini [17, 23, 24]. Conferme circa l’importanza del NGF nella regolazione della risposta immune provengono da ricerche recenti che dimostrano come molte cellule immunitarie, quali mastociti, eosinofili e linfociti, utilizzino il NGF; questa neurotrofina è, inoltre, coinvolta nella memoria immunitaria e in processi fisiopatologici che sottendono molte malattie neuroimmunitarie e autoimmunitarie [18, 19]. Il fatto che i livelli basali di NGF vadano incontro a significative variazioni nel corso di alcune malattie autoimmuni avvalorano l’ipotesi di un coinvolgimento di questa molecola in tali patologie. Il NGF è prodotto ed utilizzato da cellule gliali, in particolare proprio dagli OL [25, 26], cellule che, ripetiamo, svolgono un ruolo cruciale nel rivestimento mielinico dei fasci nervosi e che, nella SM, vanno incontro a degenerazione e/o morte [5, 27].

Da qualche anno il NGF è entrato a far parte di *trials* multicentriche per un suo utilizzo clinico nelle neuropatie periferiche umane [28] e ne è stato individuato un ruolo terapeutico nell’ulcera corneale [29], da decubito [30] e nelle ulcere vasculitiche [31].

Alla luce di queste ultime funzioni scoperte per il NGF, è possibile ipotizzare per questa neurotrofina o un ruolo di citochina pro-infiammatoria o un suo coinvolgimento nei fenomeni degenerativi a carico della mielina oppure un ruolo trofico nei riguardi di quelle cellule che esprimono il recettore per il NGF. Per contro, la sintesi di NGF è stimolata da numerose

sostanze, tra cui le citochine pro-infiammatorie, anche in cellule che in condizioni normali non lo producono [19, 32, 33]. In aggiunta a quanto già detto, dato di grande interesse è la recente scoperta del ruolo fondamentale del NGF nel determinare il destino finale di sopravvivenza o morte della cellula differenziata [20].

NGF e sclerosi multipla

L'eziologia della SM è ancora in gran parte ignota, così come sconosciuti risultano essere i meccanismi patogenetici implicati. Tuttavia, sul piano eziologico, molti studi sono a favore di una genesi multifattoriale; è cioè possibile che diversi fattori ambientali (prevalentemente virali) possano attivare, in soggetti con una suscettibilità geneticamente determinata, una risposta autoimmunitaria diretta contro gli antigeni della mielina del SNC [1, 2, 34-37]. Da un punto di vista patogenetico, particolare attenzione viene oggi posta al danno subito dall'OL, la cellula responsabile del rivestimento mielinico dell'assone e principale bersaglio di ripetuti episodi infiammatori [27, 38, 39]. Il danno a carico della mielina potrebbe essere causato direttamente da fattori esterni o, in una visione più attuale, mediato da alterazioni a carico del microambiente extracellulare, che è costituito dalle cellule limitrofe e dalle sostanze da esse sintetizzate che intervengono nel trofismo e nel mantenimento di cellule nervose come anche nei processi di neurodegenerazione [5, 38].

L'ipotesi di una possibile implicazione del NGF nella SM diventa allora percorribile se si pensa all'ampia diffusione di questa NT nel SNC, all'ampia distribuzione dei recettori ad alta (TrkA) e bassa (p75) affinità nel SNC ed al ruolo ricoperto dal NGF in funzioni immunitarie e nei fenomeni infiammatori. A tale proposito, numerose evidenze sperimentali sono a favore di una alterazione dei livelli sierici e liquorali di NGF in pazienti con SM [40, 41] correlate alle manifestazioni acute della malattia. Nel SNC di pazienti affetti da SM e in quello di roditori con encefalite allergica sperimentale (EAS) sono state identificate cellule nervose e immunitarie in grado di produrre rilevanti quantità di NGF e BDNF e capaci di esprimere il recettore ad alta affinità per queste due molecole [26, 33, 42]. Il significato funzionale di queste cellule sarebbe quello di svolgere un'azione neuroimmuno-protettiva nei focolai di infiammazione cerebrale [43].

L'idea di studiare il ruolo del NGF nella SM, malattia autoimmunitaria con una importante componente infiammatoria, nasce dal dato, ampiamente confermato, di un coinvolgimento del NGF nei processi immunitari ed infiammatori [18, 23, 24, 44-47].

Ricerche condotte nel nostro laboratorio ci hanno permesso di dimostrare, infatti, una marcata alterazione nella sintesi e/o disponibilità del NGF in patologie di natura infiammatoria con accumulo e attivazione di cellule immunocompetenti nei tessuti delle aree colpite (Fig. 1).

Ricerche mirate alla comprensione dei meccanismi coinvolti in questi eventi hanno portato all'osservazione che molte cellule appartenenti al sistema immunitario, quali mastociti, linfociti e macrofagi acquistano una maggiore capacità di rispondere e/o produrre NGF [17, 23]. Altri studi hanno successivamente evidenziato che citochine coinvolte nei processi infiammatori regolano la sintesi di NGF [19, 32, 33]. I meccanismi cellulari e molecolari che intervengono nella sintesi e modulazione del NGF sono attualmente oggetto di numerosi studi nel nostro e in altri laboratori.

I primi risultati che suggerivano una possibile correlazione funzionale tra NGF e SM furono pubblicati circa 10 anni fa dopo una ricerca condotta dal Dipartimento di Scienze Neurologiche dell'Università "la Sapienza" di Roma in collaborazione con il Department of Physiology dell'Università di Basilea. Con questo studio controllato si dimostrò come i livelli basali di NGF del liquido cerebrospinale di pazienti affetti da SM aumentavano nella fase acuta della malattia per diminuire durante la fase di remissione. Questi primi risultati indicarono come l'aumento della sintesi di NGF nel liquor era una caratteristica risposta infiammatoria nella SM [40].

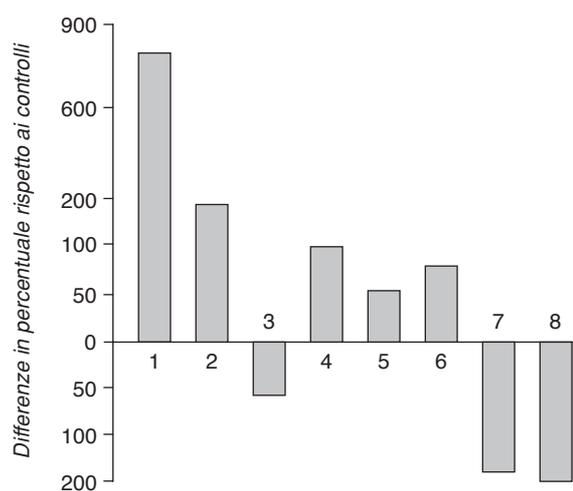


Fig. 1. - Livelli di NGF nel liquor di pazienti affetti da sclerosi multipla durante la fase acuta della malattia (1) e durante la fase di remissione (2). Livelli di NGF nel siero (3), nel talamo (4), nel midollo allungato (5) e nella regione lombare del midollo (6) di ratti affetti da encefalite allergica sperimentale (EAS). Le colonne 7 e 8 indicano i livelli di NGF di ratti affetti da EAS con livelli elevati circolanti di anti-NGF nel siero (7) e nel midollo allungato (8).

Altri studi hanno misurato i livelli di NGF nel liquido cerebrospinale di pazienti affetti da differenti malattie neurologiche di natura infiammatoria, quali la meningite virale e batterica confrontandoli con quelli di alcuni pazienti affetti da SM.

Alcuni anni dopo è stato studiato il coinvolgimento di altre neurotrofine, come il CNTF, in malattie infiammatorie del SNC e del SNP, quali la SM, la sindrome di Guillain-Barre e la polineuropatia demielinizzante cronica infiammatoria [48, 49].

Le informazioni da noi acquisite in pazienti affetti da SM non ci permisero, tuttavia, di indicare quali cellule fossero responsabili delle variazioni dei livelli di NGF. Per approfondire questo aspetto e comprendere i possibili meccanismi coinvolti nella patologia, abbiamo utilizzato successivamente uno dei modelli animali di SM più studiati, quello dell'EAS, indotta in ratti adulti del ceppo Lewis.

NGF e EAS

L'EAS è uno dei modelli sperimentali più utilizzati per lo studio della SM, malattia con la quale condivide analogie cliniche e neuropatologiche [5, 50]. Si tratta di una malattia autoimmune del SNC, con una componente cellulo-mediata ed umorale, caratterizzata da infiltrati linfomonocitari, gliosi e, in alcune specie, demielinizzazione [5, 33, 51]. La malattia può essere indotta mediante un'immunizzazione con la proteina basica della mielina o per trasferimento passivo di cellule T autoreattive verso la mielina ed è mediata dai linfociti T CD4+ attivati e dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II [1, 5].

Sono gli studi condotti sul modello animale di demielinizzazione che ci hanno permesso di evidenziare le variazioni significative di sintesi e rilascio di NGF in varie aree del SNC, quali il talamo, il midollo allungato ed il midollo spinale. I livelli di NGF variano con le aree cerebrali e le fasi della malattia. Durante una stessa fase della patologia, inoltre, sono state osservate aree a maggiore e a minore contenuto di NGF in stretta vicinanza [52, 53, 44-46]. Questo fatto suggerisce una diversa responsività al NGF da parte delle cellule colpite, siano esse neuronali o gliali, e/o una differente capacità di produrre il NGF stesso.

Studi condotti in collaborazione con Laura Calzà, Università di Bologna, hanno evidenziato che nell'EAS esistono ampie fluttuazioni nelle concentrazioni cerebrali di NGF, correlate sia allo stadio isto-patologico (presenza o meno di infiltrati infiammatori) che ai livelli fisiologici di NGF in specifiche aree del SNC [22, 52-56]. Nelle aree cerebrali dove esistono cellule capaci di produrre NGF (neuroni della corteccia cerebrale e mastociti del talamo) o si accumulano a seguito dell'infiammazione,

i livelli di NGF sono alterati durante il decorso dell'EAS rispetto ai basali. Invece, nel midollo spinale e nel tronco dell'encefalo, dove i livelli basali di NGF sono circa 10 volte più bassi rispetto a talamo e corteccia, il NGF si riduce drasticamente durante la fase acuta della malattia. Sembra, quindi, che in questa condizione patologica esista un'elevata richiesta tissutale di NGF, testimoniata anche da una drammatica *up-regulation* dei recettori per il NGF sia a bassa (p75) che ad alta (TrkA) affinità. Questi recettori compaiono su neuroni e anche su altri tipi cellulari (gliali) che normalmente non li esprimono. Sono spesso presenti in sede perivascolare, come se anche sui vasi arrivassero segnali biumorali capaci di favorire la loro espressione, in altre aree si osservano piccoli *clusters* non necessariamente associati a focolai infiammatori [22, 52-58].

I risultati di questi studi hanno permesso di avanzare l'ipotesi che il NGF, prodotto durante la fase acuta e/o cronica della malattia, possa essere coinvolto nella proliferazione e differenziamento degli OL. Un primo sostegno a questa ipotesi è venuto dagli studi in cui è stato somministrato NGF radiomarcato nei ventricoli cerebrali di ratti con EAS. Il NGF, iniettato nei ventricoli, viene captato da cellule della regione periventricolare e trasportato nel parenchima cerebrale [55, 59]. Alcune evidenze istopatologiche dimostrerebbero che la molecola sarebbe coinvolta nella canalizzazione di cellule staminali in OL allo scopo di rimpiazzare quelle irreversibilmente danneggiate dall'infiammazione. È stato ipotizzato che gli alterati livelli di NGF possano influenzare la potenziale "riserva" di cellule staminali del cervello adulto, regolando sia i fenomeni migratori che quelli differenziativi [17, 22, 37].

Un ulteriore sostegno all'ipotesi di un ruolo del NGF nell'EAS e nella SM viene anche da studi condotti sui nervi ottici, che sono tra i primi tessuti ad essere colpiti da questa patologia demielinizzante. Il nervo ottico nella prima fase della malattia presenta una significativa alterazione dei livelli di NGF e della distribuzione del suo recettore [54]. Un riscontro sperimentale a sostegno dell'ipotesi di un ruolo protettivo del NGF viene dall'osservazione che la presenza endogena di anticorpi anti-NGF, in ratti con EAS, aggrava la sintomatologia [58] e che la produzione *in loco* di NGF da parte di linfociti T in ratti con neurite ottica, induce una ridotta manifestazione clinica e neuropatologica rispetto a ratti di controllo [60]. Studi pubblicati recentemente da Villoslada [61] dimostrano che la somministrazione endoventricolare di NGF migliora i segni clinici e riduce il danno neuropatologico in primati affetti da EAS, avvalorando ulteriormente tale ipotesi. Anche se, al momento, appare difficile definire l'azione del NGF in patologie infiammatorie su base autoimmune, i

risultati riportati recentemente nel nostro ed in altri centri di ricerca, fanno ritenere che tra i possibili ruoli del NGF vi sia quello di contribuire alla prevenzione e/o alla riduzione del danno dell'OL e neuronale.

NGF e meccanismi di neuroimmunoprotezione

Negli ultimi venti anni, un gran numero di dati sperimentali ha dimostrato come il NGF agisca non solo su cellule del sistema nervoso, ma anche su cellule del sistema immunitario svolgendo un'azione nei processi differenziativi, nella sopravvivenza di specifiche popolazioni cellulari e nella risposta infiammatoria [24]. Riscontri sperimentali hanno evidenziato, infatti, come questa sia quasi sempre associata ad un aumento nella sintesi e nel rilascio di NGF e di altre neurotrofine [18, 23]. Il ruolo del NGF nei processi infiammatori, tutt'ora oggetto di studio, ed i risultati fin qui ottenuti, hanno portato a conclusioni discordanti, dall'ipotesi che il NGF contribuirebbe a scatenare l'evento infiammatorio a quella secondo cui ridurrebbe il danno citotossico sulla mielina agendo da molecola anti-infiammatoria [62]. Dopo aver riscontrato l'aumento di NGF nel liquor e nei tessuti cerebrali di pazienti con SM o in ratti affetti da EAS [17, 19, 40, 52, 53, 58], ci si è chiesti quale potesse essere il ruolo del NGF nella SM. I risultati di studi effettuati su roditori e primati non umani hanno dimostrato, in maniera convincente, come i linfociti T attivati, presenti nel SNC di soggetti con EAS, siano in grado di sintetizzare quantità fisiologicamente rilevanti di NGF, con un meccanismo di *down-regulation* sulla risposta infiammatoria nel SNC [32, 33, 47, 62, 63]. Questi studi sarebbero a favore del dato che il NGF rilasciato dai linfociti T agirebbe su cellule cerebrali, molto probabilmente su cellule gliali, per indurle a produrre e rilasciare l'interleuchina anti-infiammatoria, IL-10, proteggendo così le cellule cerebrali danneggiate [61]. Dati ottenuti su modelli animali di neurite ottica sperimentale sottoposti a inoculazione di linfociti T modificati geneticamente al fine di produrre NGF, sembrano avvalorare tale ipotesi [8, 60]. Prove ulteriori del ruolo anti-infiammatorio del NGF sono state evidenziate da altri dati sperimentali ottenuti anche nel nostro laboratorio [23, 42, 64].

NGF e cellule immature

Come è noto, le patologie demielinizzanti sono caratterizzate dalla distruzione selettiva delle guaine mieliniche degli OL. L'evento iniziale del processo di demielinizzazione sembra essere associato ad un aumento della permeabilità della barriera ematoence-

falica e dall'infiltrazione di cellule infiammatorie, quali linfociti, macrofagi, mastociti nelle aree del tessuto perivascolare del SNC. Questa fase precoce è seguita dalla distruzione della mielina e degli OL e da astrocitosi [5, 65, 66]. Inoltre, vi sono particolari evidenze che durante la fase acuta - ma non solo - il SNC attui un tentativo di ricostruzione delle guaine mieliniche, un processo definito riemielinizzazione [67]. Lo studio delle interazioni tra cellule presenti nei focolai infiammatori può rivelarsi utile per una maggiore comprensione dei meccanismi di demielinizzazione e riemielinizzazione [68]. È stato osservato che gli OL, in condizioni basali, non rispondono all'azione del NGF mentre durante l'EAS esprimono il recettore del NGF divenendo così capaci di rispondere a questa neurotrofina [52, 53, 55, 56]. La capacità da parte degli OL di rispondere all'azione del NGF è stata dimostrata recentemente *in vitro* [25, 26]. È utile sottolineare che aree nervose che presentano livelli bassi di NGF, come il midollo, sono quelle più marcatamente colpite dalla malattia, mentre in altre aree dove si osserva una maggiore concentrazione di questa neurotrofina, il danno mielinico sembra essere minore. Inoltre, il fatto che siano proprio gli OL maggiormente danneggiati ad acquisire espressione del recettore per il NGF, avvalorare l'ipotesi di un coinvolgimento funzionale di questa molecola nella patofisiologia della malattia. Le aree nervose che esprimono e/o utilizzano maggiormente NGF sarebbero, quindi, favorite nei processi riparativi della malattia, a differenza di altre dove la minore concentrazione di neurotrofina ridurrebbe fortemente questa capacità.

Tra i tanti aspetti cruciali per la comprensione dei meccanismi biologici che regolano e limitano il processo di riemielinizzazione, vi è quella importante che riguarda la conoscenza dei processi di crescita, migrazione e differenziamento degli OL.

Da studi condotti *in vitro* e *in vivo* è noto che durante lo sviluppo del SNC, i precursori degli OL manifestano una notevole potenzialità proliferativa e sviluppano una capacità di migrare per lunghe distanze dalle zone germinative subventricolari verso altre aree cerebrali [55, 56]. Queste osservazioni hanno recentemente attirato l'interesse scientifico verso la caratterizzazione delle molecole implicate nei processi di migrazione, differenziamento e di riconoscimento degli assoni nudi.

Questi ed altri riscontri sperimentali hanno mostrato che molti fattori di crescita, e tra questi lo stesso NGF, prodotti da cellule del SNC sono in grado di concorrere ai meccanismi di sopravvivenza e di proliferazione dei progenitori degli OL [65, 69-73]. Studi recenti hanno dimostrato la capacità degli OL di esprimere il recettore NGF, assente in condizioni normali, e di rispondere all'azione del NGF. Per approfondire le conoscenze sul ruolo della molecola NGF nei processi protettivi e/o

riparativi degli OL abbiamo utilizzato modelli animali di SM e studiato il comportamento delle cellule staminali localizzate nella zona subventricolare (SVZ), durante lo sviluppo della EAS, esposte a ridotte o elevate quantità di NGF. I risultati di questi studi hanno ulteriormente avvalorato l'ipotesi di un coinvolgimento della molecola NGF nell'attivazione e nel differenziamento dei precursori degli OL [22, 37]. Questi studi hanno, infatti, dimostrato che cellule della SVZ di ratti con EAS esprimono il recettore NGF, l'antigene proliferativo Ki67 e suggerito che cellule staminali localizzate nella SVZ possano essere influenzate nelle loro capacità migratorie e differenziate dalla presenza di NGF [22, 37, 55, 56]. L'evidenza che le cellule ventricolari, una volta captato il NGF, migrino dallo strato ependimale verso le aree cerebrali più interne, non solo rafforza l'ipotesi di un ruolo funzionale del NGF, ma suggerisce anche che questa neurotrofina, presente in elevate quantità nei ventricoli e nei tessuti cerebrali durante l'EAS, potrebbe svolgere un ruolo di stimolo nel differenziamento delle cellule staminali ventricolari per sostituire cellule danneggiate.

Per la loro capacità di proliferare e differenziarsi in diverse linee cellulari, le cellule localizzate nella SVZ possono, quindi, rappresentare una fonte di elementi maturi in patologie degenerative caratterizzate da perdita irreversibile di cellule, quali infarto del miocardio, miopatie, demenza di Alzheimer e anche SM.

Questa possibilità è stata negli ultimi anni rivalutata da un numero crescente di dati sperimentali ottenuti *in vitro* e *in vivo* non solo sui precursori embrionali, ma anche nei tessuti cerebrali di soggetti adulti. L'impiego di cellule immature e/o cellule staminali per la cura di malattie degenerative neurologiche, a tutt'oggi aggredibili solo con terapie sintomatiche, ha aperto uno scenario importante per la moderna neurobiologia (Fig. 2).

NGF e cellule gliali radiali

La SVZ dei ventricoli laterali del telencefalo è un importante strato germinativo che si forma durante lo sviluppo. Nel neonato, questo strato dà vita agli astrociti, agli OL e ai neuroni del bulbo olfattorio. Durante la gliogenesi, i precursori gliali, che originano nella SVZ, migrano radialmente verso il corpo calloso e la corteccia cerebrale dove si differenziano in OL e in astrociti. Nel cervello giovanile la SVZ, che progressivamente si atrofizza dopo la nascita, è ancora capace di divisione mitotica dei propri componenti e mantiene la capacità di generare, dunque, astrociti e OL.

Nel cervello adulto normale le cellule radiali sono fortemente ridotte, se non quasi assenti, e ricompaiono a seguito di insulti cerebrali. L'osservazione che nell'EAS ricompaiono queste cellule, che esprimono recettori per il

NGF, suggerisce ulteriormente un ruolo della neurotrofina nella fisiopatologia della malattia e, molto verosimilmente, anche nei processi di recupero del danno cerebrale [37].

Le cellule localizzate nel *subventricular layer* mantengono caratteristiche di cellula staminale anche nel cervello adulto di mammifero e sono capaci quindi di proliferare, migrare e differenziarsi come neurone e come cellula gliale, OL compreso [74, 75]. Questi fenomeni avvengono spontaneamente nel SNC di animale adulto, particolarmente nel bulbo olfattorio, nel giro dentato dell'ippocampo e, verosimilmente, anche nel midollo spinale. È evidente il potenziale significato dell'esistenza di cellule precursori nel cervello adulto, stante le scarsissime capacità riparative del SNC da sempre attribuite all'impossibilità di rimpiazzare le cellule andate incontro a morte nell'età adulta. Questa popolazione cellulare o, almeno, una consistente percentuale di essa, esprime il recettore per il NGF durante il corso di EAS, aumentando la propria capacità proliferativa e/o differenziativa [55, 56].

Un'altra marcata caratteristica dell'EAS riscontrata nei nostri studi è la comparsa di cellule gliali dalla conformazione radiale che acquista la capacità di esprimere TrkA, il recettore del NGF [45, 46]. Le cellule gliali radiali, a differenza dei normali astrociti, si differenziano dai precursori embrionali localizzati lungo i ventricoli cerebrali prima della neurogenesi e regolano la migrazione neuronale. Una volta terminato il processo di neurogenesi del SNC, gli astrociti radiali acquistano le caratteristiche strutturali di normali astrociti [76-80]. Questi studi condotti in collaborazione con Oderfeld-Norwak, del Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences di Varsavia, hanno evidenziato che nell'EAS non solo ricompaiono gli astrociti radiali caratterizzati da una marcata presenza di recettori NGF ma anche che questo fenomeno è molto probabilmente associato alla migrazione di cellule staminali NGF-dipendenti e mirato alla canalizzazione delle cellule immature verso il fenotipo gliale e/o nervoso [45, 46].

Potenzialità di impiego terapeutico del NGF nella SM

Numerose sono le malattie caratterizzate da danno cerebrale e, da sempre, la sfida è stata quella di tentare di riparare un tessuto che era noto per non essere in grado di rigenerarsi [81].

Negli ultimi anni sono stati pubblicati molti studi di base, preclinici e clinici, mirati ad un utilizzo terapeutico del NGF in patologie neurologiche. Alcuni studi recenti hanno evidenziato la potenziale importanza clinica di questa neurotrofina [28, 82, 83], altri sono tutt'ora in via di sperimentazione [22, 37, 46].

Nel caso della SM, è noto che processi di rimielinizzazione vengono messi in atto, in risposta al danno mielinico, da parte degli OL attivati o dei precursori di queste cellule uniformemente distribuiti nel SNC. La nostra ipotesi, supportata da altri riscontri sperimentali, suggerisce che i fattori di crescita possano stimolare la proliferazione e la migrazione dei precursori degli OL o funzionare come fattori di sopravvivenza per gli OL maturi [55, 56, 74]. Questi mediatori biologici presenti nel SNC in quantità sufficiente in condizioni normali, ma insufficienti a seguito di un danno neuro-immunitario, si prospettano utili per lo sviluppo di nuovi approcci sperimentali e per il loro uso terapeutico nella SM. Recenti studi condotti in primati affetti da EAS hanno dimostrato come la somministrazione endocerebrale di NGF riduca in maniera significativa il danno cerebrale e migliori il quadro clinico della malattia [61]. Anche se episodi di rimielinizzazione si osservano in numerose aree di lesione, le alterazioni istologiche osservate ed il quadro clinico della malattia provano senza dubbio che il processo di demielinizzazione prevale su tali tentativi di rigenerazione [84-87]. Inoltre, le esperienze cliniche nei pazienti con disabilità neurologiche testimoniano che in molti casi la riparazione ultima della mielina non ha successo. Queste osservazioni fanno ritenere che stimoli esogeni

appropriati, come la presenza del NGF, agendo a livello neuronale e immunitario, potrebbero facilitare un recupero più veloce del quadro clinico del paziente [32, 86, 88, 89]. Un interessante studio, pubblicato recentemente da Stefano Pluchino *et al.* del San Raffaele di Milano, ha dimostrato il ruolo svolto dalle cellule staminali iniettate in roditori affetti da EAS nel promuovere la rimielinizzazione e nel recupero delle attività funzionali dell'animale [90].

Sulla base dei riscontri sperimentali fin qui disponibili, è possibile prospettare un ruolo delle neurotrofine, in particolare del NGF, su cellule staminali della SVZ, nei processi di rimielinizzazione su modelli animali di SM [8, 89]. Inoltre, studi pubblicati recentemente sembrano indicare una correlazione tra la ridotta capacità di sintesi e rilascio di BDNF da parte di monociti del sangue periferico di pazienti affetti da SM e la progressione dei processi di demielinizzazione e conseguente neurodegenerazione del SNC del paziente [89]. È stato, inoltre, evidenziato un ruolo importante del p75, recettore comune a tutte le neurotrofine nella modulazione del processo di mielinizzazione periferica (91). Infine, risultati ottenuti di recente in modelli animali di SM dimostrerebbero la capacità di cellule staminali di differenziarsi in OL e di stimolare la produzione di mielina in seguito al trattamento con l'ormone

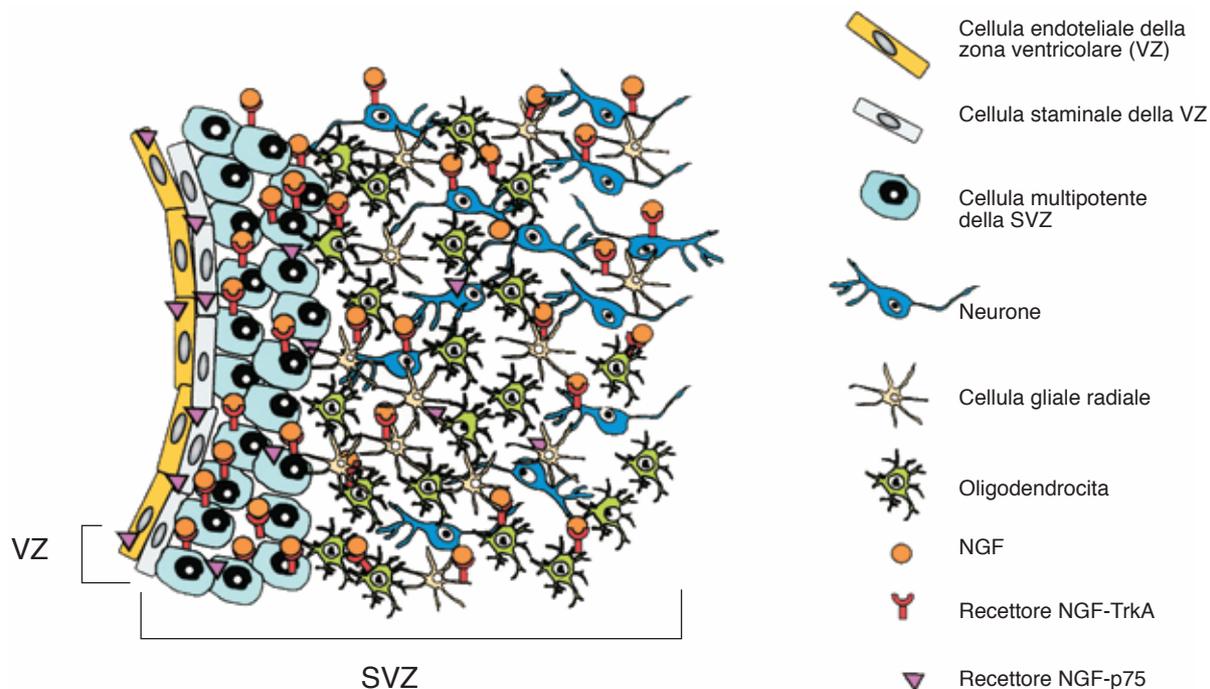


Fig. 2. - Rappresentazione schematica basata su dati ottenuti presso l'Istituto Superiore di Sanità ed in altri istituti e relativa alla probabile distribuzione dinamica delle cellule della zona ventricolare (VZ) e subventricolare (SVZ) recettive al *nerve growth factor* (NGF) in ratti affetti da encefalite allergica sperimentale (EAS).

Tabella 1. - Evidenze e ipotesi sul ruolo del NGF nella sclerosi multipla (SM)

Evidenze	Ipotesi
Alterati livelli di NGF nel liquor di pazienti con SM e in modelli animali di EAS	Il NGF è implicato nella patogenesi della SM e nel modello animale di EAS
NGF radiomarcato somministrato nei ventricoli cerebrali di ratti EAS è captato da cellule della SVZ e trasportato nel parenchima cerebrale	Il NGF è coinvolto direttamente o indirettamente nei procedimenti di migrazione delle cellule staminali
L'EAS è caratterizzata dalla riattivazione delle cellule radiali gliali che svolgono un importante ruolo nella migrazione cellulare e nella neurogenesi ed esprimono il recettore ad alta affinità per il NGF	Il NGF, attraverso la riattivazione delle cellule radiali, facilita la riparazione del danno cellulare, agendo sul differenziamento di cellule staminali durante una specifica finestra di sviluppo
Studi <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> dimostrano la capacità degli OL e delle cellule nervose immature di esprimere il recettore per il NGF e di differenziarsi se esposte all'azione del NGF	Il NGF agisce in dose- e stadio-dipendente e concorre a proteggere e/o sostituire OL e neuroni danneggiati
La somministrazione endocerebrale di NGF in ratti e primati non umani con EAS riduce in maniera significativa i segni clinici e le lesioni neuropatologiche	Il NGF in concentrazioni adeguate potrebbe, da solo o in combinazione con altri farmaci, ridurre i segni clinici e le lesioni cerebrali
Gli studi sulla somministrazione di NGF nell'EAS hanno contribuito alla comprensione del ruolo della molecola nella risposta infiammatoria	Il NGF è un fattore implicato nei processi di neuroimmunomodulazione della malattia

Sono sintetizzate le principali evidenze e le ipotesi più suggestive sul ruolo ricoperto dal NGF nella sclerosi multipla. NGF: *nerve growth factor*; EAS: encefalite allergica sperimentale; OL: oligodendrocita.

tiroideo, la cui azione potrebbe essere diretta o mediata dallo stesso NGF, neosintetizzato e rilasciato nel tessuto [22].

Conclusioni

La SM ed il suo modello sperimentale animale, EAS, sono patologie che colpiscono cellule appartenenti al sistema nervoso e al sistema immunitario [1, 5]. Il NGF fa parte di un gruppo di mediatori biologici coinvolti nella regolazione della risposta neuronale e immunitaria, svolge un ruolo importante nella neurogenesi e nel differenziamento neuronale, promuove il riparo del danno neuronale ed esercita una azione anti-infiammatoria [33, 42, 64]. Il NGF è prodotto e rilasciato da numerose cellule, è presente nel torrente circolatorio e nel liquido cerebrospinale. L'ipotesi di un ruolo funzionale del NGF nella SM risale al 1992 quando fu dimostrato che la concentrazione del NGF nel liquor aumentava nella fase acuta e diminuiva nella fase di remissione della SM [40]. Tale ipotesi, oggetto di numerosi studi in questi ultimi anni, suggerisce che l'aumentato livello di NGF nel liquor sia da attribuire alla capacità del NGF di rendere le cellule cerebrali più resistenti all'insulto infiammatorio e/o di stimolare cellule immature localizzate nella SVZ a sostituire quelle danneggiate [37, 55]. A distanza di oltre dieci anni, anche se molti aspetti restano ancora da chiarire, riscontri sperimentali

sia *in vivo* che *in vitro*, in numerosi laboratori, compreso il nostro, rendono verosimile l'ipotesi di un ruolo funzionale della molecola NGF nella patologia descritta. Dati qualificanti a sostegno di tali ipotesi includono l'osservazione che: (a) la molecola NGF aumenta nel liquor [40]; (b) le cellule localizzate nella SVZ diventano recettive all'azione del NGF [55]; (c) il NGF viene trasportato da precursori degli OL nel parenchima cerebrale [55]; (d) le cellule gliali radiali che svolgono un ruolo importante nella neurogenesi e nella migrazione cellulare, vengono attivate durante l'EAS e acquistano la capacità di esprimere il recettore TrkA [45, 46]; (e) il trattamento endocerebrale con NGF di primati non umani affetti da EAS [61] o di roditori con neurite ottica con linfociti T ingegnerizzati a produrre NGF nel SNC [60] riduce l'infiammazione acuta (Tab. 1).

La dimostrazione sperimentale che l'utilizzo del NGF da parte di differenti fenotipi cellulari si realizza in specifiche finestre temporali e non in altre dove sarebbero, per contro, attive altre NT, giustifica la necessità di un approfondimento della ricerca in questa area. Inoltre, si sottolinea il fatto che acquisire ulteriori conoscenze sul ruolo del NGF nella sclerosi multipla, esaminando sia i siti di sintesi che quelli di utilizzo del NGF e chiarendo le differenze rispetto al modello animale di EAS potrebbe rivelarsi utile al fine di una maggiore comprensione della fisiopatologia della malattia e, verosimilmente, nella comprensione del potenziale ruolo clinico della molecola [61].

Queste ricerche non solo sembrano rafforzare l'ipotesi del ruolo protettivo del NGF in questa malattia, ma suggeriscono che il NGF possa partecipare in processi determinanti ai fini del recupero del danno, quali la mobilitazione di cellule progenitrici della SVZ, la riattivazione dell'astroglia radiale e il differenziamento delle cellule staminali in OL e/o neuroni. Questa ipotesi è oggetto tutt'ora di verifica e approfondimento.

Ringraziamenti

Questi studi sono stati condotti in parte con il contributo del Progetto Cellule Staminali dell'Istituto Superiore di Sanità e del Progetto FIRB-2001 prot. n. RBAU01PCRL a Luigi Aloe. Viviana Triaca è borsista dell'Associazione Italiana Sclerosi Multipla.

Ricevuto il 7 ottobre 2003.

Accettato il 27 gennaio 2004.

BIBLIOGRAFIA

- Sawcer S, Goodfellow P, Compston A. The genetic analysis of multiple sclerosis. *Trends Genet* 1997;13:234-9.
- Sadovnick A, Dymont D, Ebers G. Genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Epidemiol Rev* 1997;19:99-106.
- Sibley WA, Bamford CR, Clark K. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* 1985;1:1313-5.
- Marchionni MA, Cannella B, Hoban C, Gao YL, Garcia-Arenas R, Lawson D, Happel L, Noel F, Tofilon P, Gwynne D, Raine CS. Neuroregulin in neuron/glia interactions in the central nervous system. GGF2 diminishes autoimmune demyelination, promotes oligodendrocyte progenitor expansion, and enhances remyelination. *Adv Exp Med Biol* 1999;468:283-95.
- Raine CS. In: Koeteier JC (Ed.). *Handbook of Clinical Neurology*. Amsterdam: Elsevier; 1985. p. 429-66.
- Viehover A, Miller RH, Park SK, Fischbach G, Vartanian T. Neuregulin: an oligodendrocyte growth factor absent in active multiple sclerosis lesions. *Dev Neurosci* 2001;23:377-86.
- Webster HD. Growth factors and myelin regeneration in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1997;3:113-20.
- Sofroniew MV, Howe CL, Mpbly WC. Nerve growth factor signalling, neuroprotection, and neural repair *Annu Rev Neurosci* 2001;24:1217-81.
- Cruvellhier J. *Anatomie pathologique du corps humain*. Paris: Bailliere. 1842.
- Charcot JM. *Lectures on diseases of the nervous system*. London: The New Sydenham Society; 1877.
- Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1997;120:393-9.
- Hohlfeld R, Londei M, Massacesi L, Salvetti M. T-cell autoimmunity in multiple sclerosis. *Immunol Today* 1995;16:259-61.
- Connor B, Dragunow M. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Research Reviews* 1998;27:1-39.
- Lorigados L, Pavon N, Serrano T, Robinson MA. Nerve growth factor and neurological diseases. *Rev Neurol* 1998;26:744-8.
- Meakin SO, Shooter EM. The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci* 1992;15:323-31.
- Ebendal T. Function and evolution in the NGF family and its receptors. *J Neurosci Res* 1992;32:461-70.
- Aloe L, Micera A. A role of nerve growth factor in oligodendrocyte growth and differentiation of EAE affected rats. *Arch Ital Biol* 1998;136:247-56.
- Aloe L, Tirassa P, Bracci-Laudiero L. Nerve growth factor in neurological and non neurological diseases: basic findings and emerging pharmacological prospectives. *Current Pharmaceutical Design* 2001;7:113-23.
- Aloe L, Skaper SD, Leon A, Levi-Montalcini R. Nerve Growth Factor and autoimmune diseases. *Autoimmunity* 1994;19:141-50.
- Levi-Montalcini R. The Nerve Growth Factor 35 years later. *Science* 1987;237:1154-62.
- Aloe L. Adrenalectomy decreases nerve growth factor in young adult rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1989;86:5636-40.
- Calzà L, Fernandez M, Giuliani A, Aloe L, Giardino L. Thyroid hormone activates oligodendrocyte precursors and increases a myelin-forming protein and NGF content in the spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci, USA* 2002;99:3258-63.
- Aloe L, Bracci-Laudiero L, Bonini L, Manni L. The expanding role of Nerve Growth Factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases. *Allergy* 1997;52:883-94.
- Levi-Montalcini R, Aloe L, Alleva E. A role for nerve growth factor in nervous, endocrine and immune systems. *Progr NeuroEndocrinImmunol* 1990;3:1-10.
- Althaus HH, Kloppner S, Schmidt-Schultz T, Schwartz P. Nerve growth factor induces proliferation and enhances fibre regeneration in oligodendrocytes isolated from adult pig brain. *Neurosci Lett* 1992;135:219-23.
- Althaus HH, Mursch K, Kloppner S. Differential response of mature TrkA/p75(NTR) expressing human and pig oligodendrocytes: aging, does it matter? *Microsc Res Tech* 2001;52:689-99.
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA. Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 1998;280:1610-3.
- Apfel SC, Kessler JA, Adornato BT, Litchy WJ, Sanders C, Rask CA. Recombinant human nerve growth factor in the treatment of diabetic polyneuropathy. NGF Study Group. *Neurology* 1998;51:695-702.
- Lambiase A, Rama P, Bonini S, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *New Engl J Med* 1998;338:1174-80.
- Bernabei R, Landi F, Bonini S, Onder G, Lambiase A, Pola R, Aloe L. Topical application of nerve growth factor accelerates healing of pressure ulcer in humans. *The Lancet* 1999;354:307.

31. Tuveri M, Generini S, Matucci-Cerinic M, Aloe L. NGF, a useful tool in the treatment of chronic vasculitic ulcers in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2000;356:1739-40.
32. Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H. The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000;107:161-6.
33. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor *in vitro* and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* 1999;189:865-70.
34. Kurtzke JF. Epidemiologic evidence from multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol* 1993;6:382-427.
35. Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* 1996;6:259-74.
36. Fisher E, Rudick RA, Simon JH, Cutter G, Baier M, Lee JC, Miller D, Weinstock-Guttman B, Mass MK, Dougherty DS, Simonian NA. Eight-year follow-up study of brain atrophy in patients with MS. *Neurology* 2002;59:1412-20.
37. Triaca V, Tirassa P. Circulating NGF-antibody alters the distribution of NG2 and CD-56 positive cells in the brain of an animal model of inflammatory disorder. *Arch Ital Biol* 2003;141:127-39.
38. Petzold A, Eikelenboom MJ, Gveric D, Keir G, Chapman M, Lazeron RH, Cuzner ML, Polman CH, Uitdehaag BM, Thompson EJ, Giovannoni G. Markers for different glial cell responses in multiple sclerosis: clinical and pathological correlations. *Brain* 2002;125:1462-73.
39. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *New Engl J Med* 1998;338:278-85.
40. Bracci-Laudiero L, Aloe L, Levi-Montalcini R, Buttinelli C, Schilter D, Gillessen S, Otten U. Multiple sclerosis patients express increased levels of b-nerve growth factor in cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett* 1992;147:9-12.
41. Suzaki I, Hara T, Maegaki Y, Narai S, Takeshita K. Nerve growth factor levels in cerebrospinal fluid from patients neurologic disorders. *J Child Neurol* 1997;12:205-7.
42. Hammarberg H, Lidman O, Lundberg C, Eltayeb SY, Gielen AW, Muhallab S, Svenningsson A, Linda H, van Der Meide PH, Cullheim S, Olsson T, Piehl F. Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. *J Neurosci* 2000;20:5283-91.
43. Valdo P, Stegagno C, Mazzucco S, Zuliani E, Zanusso G, Moretto G, Raine CS, Sonetti B. Enhanced expression of NGF receptors in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:91-8.
44. Nataf S, Naveilhan P, Sindji L, Darcy F, Brachet P, Montero-Menei CN. Low affinity NGF receptor expression in the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 1998;52:83-92.
45. Oderfeld-Nowak B, Zaremba M, Micera A, Aloe L, 2001. Nerve growth factor receptors in reactive astrocytes of rat spinal cord during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosci Lett* 2001;308:165-8.
46. Oderfeld-Nowak B, Zaremba M, Kwiatkowska-Patzer B, Triaca V, Aloe L. High-affinity NGF receptor in the rat spinal cord during acute and chronic phases of experimental autoimmune encephalomyelitis: a possible functional significance. *Arch Ital Biol*, 2003;141:103-16.
47. Ransohoff RM, Trebst C. Surprising pleiotropy of nerve growth factor in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2000;191:1625-30.
48. Hoffman V, Pohlau D, Przuntek H, Epplen JT, Hardt C. A null mutation within the ciliary neurotrophic factor (CNTF)-gene: implications for susceptibility and disease severity in patients with multiple sclerosis. *Genes Immun* 2002;3:53-5.
49. Linker RA, Maurer M, Gaupp S, Martini R, Holtmann B, Giess R, Rieckmann P, Lassmann H, Toyka KV, Sendtner M, Gold R. CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as a modulator in neuroinflammation. *Nat Med* 2002;8:620-4.
50. Schmidt S, Linington C, Zipp F, Sotgiu S, de Waal Malefyt R, Wekerle H, Hohlfeld R. Multiple sclerosis: comparison of the human T-cell response to S100 beta and myelin basic protein reveals parallels to rat experimental autoimmune panencephalitis. *Brain* 1997;120:1437-45.
51. Columba-Cabezas S, Serafini B, Ambrosini E, Sanchez M, Penna G, Adorini L, Aloisi F. Induction of macrophage-derived chemokine/CCL22 expression in experimental autoimmune encephalomyelitis and cultured microglia: implications for disease regulation. *J Neuroimmunol* 2002;130:10-2.
52. Micera A, Vigneti E, Aloe L. Changes of NGF presence in nonneuronal cells in response to experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *Exp Neurol* 1998;154:41-6.
53. Micera A, De Simone R, Aloe L. Elevated levels of nerve growth factor in the thalamus and spinal cord of rats affected by experimental allergic encephalomyelitis. *Arch Ital Biol* 1995;133:131-42.
54. Micera A, Lambiasi A, Rama P, Aloe L. Altered nerve growth factor level in the optic nerve of patients affected by multiple sclerosis. *Mult Scler* 1999;5:389-94.
55. Calzà L, Giardino L, Pozza M, Bettelli C, Micera A, Aloe L. Proliferation and phenotype regulation in the subventricular zone during experimental allergic encephalomyelitis: *in vivo* evidence of a role for nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1998;95:3209-14.
56. Calzà L, Giardino L, Pozza M, Micera A, Aloe L. Time-course changes of nerve growth factor, corticotropin-releasing hormone, and nitric oxide synthase isoforms and their possible role in the development of inflammatory response in experimental allergic encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1997;94:3368-73.
57. De Simone R, Micera A, Tirassa P, Aloe L. mRNA for NGF and p75 in the central nervous system of rats affected by experimental allergic encephalomyelitis. *Exp Neurol Appl Neurobiol* 1996;22:54-9.
58. Micera A, Properzi F, Triaca V, Aloe L. Nerve growth factor antibody exacerbates neuropathological signs of experimental allergic encephalomyelitis in adult lewis rats. *J Neuroimmunol* 2000;104:116-23.
59. Levi-Montalcini R, Aloe L. Differentiating effects of murine nerve growth factor in the peripheral and central nervous systems of *Xenopus Laevis* tadpoles. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1985;82:7111-5.

60. Kramer R, Zhang Y, Gehrman J, Gold R, Thoenen H, Wekerle H. Gene transfer through the blood-nerve barrier: NGF: engineered neuritogenic T lymphocytes attenuate experimental autoimmune neuritis. *Nat Med* 1995;1:1162-6.
61. Villoslada P, Hauser SL, Bartke I, Unger J, Heald N, Rosenberg D, Cheung SW, Mobley WC, Fisher S, Genain CP. Human nerve growth factor protects common marmosets against autoimmune encephalomyelitis by switching the balance of T helper cell type 1 and 2 cytokines within the central nervous system. *J Exp Med* 2000;191:1799-806.
62. Flugel A, Matsumuro K, Neumann H, Klinkert WE, Birnbacher R, Lassmann H, Otten U, Wekerle H. Anti-inflammatory activity of nerve growth factor in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of monocyte transendothelial migration. *Eur J Immunol* 2001;31:11-22.
63. Moalem G, Gdalyahu A, Shani Y, Otten U, Lazarovici P, Cohen IR, Schwartz M. Production of neurotrophins by activated T-cells: implications for neuroprotective autoimmunity. *J Autoimmunity* 2000;15:331-45.
64. Lambiase A, Bonini St, Rama P, Bonini Se, Aloe L. Anti-inflammatory and healing properties of nerve growth factor in immune corneal with stromal melting. *Arch Ophthalmol* 2000;118:1446-9.
65. Basu A, Krady JK, O'Malley M, Styren SD, DeKosky ST, Levison SW. The type 1 interleukin-1 receptor is essential for the efficient activation of microglia and the induction of multiple proinflammatory mediators in response to brain injury. *J Neurosci* 2002;22:6071-82.
66. Schluesener HJ, Seid K, Kretschmar J, Meyermann R. Leukocyte chemotactic factor, a natural ligand to CD4, is expressed by lymphocytes and microglial cells of the MS plaque. *J Neurosci Res* 1996;44:606-11.
67. Massaro AR. Are there indicators of remyelination in blood or CSF of multiple sclerosis patients? *Mult Scler* 1998;4:228-31.
68. Lubetzki C. Multiple sclerosis: a role of growth factors and remyelination. *Presse Med* 1994;23:1577-81.
69. Arredondo LR, Deng C, Ratts RB, Lovett-Racke AE, Holtzman DM, Racke MK. Role of nerve growth factor in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 2001;31:625-33.
70. Bowling P, Ming X, Raval S, Husar W, Casaccia-Bonnet P, Chao M, Cook S, Blumberg B. Up-regulated p75NTR neurotrophin receptor on glial cells in MS plaques. *Neurology* 1999;53:1676-82.
71. Cannella B, Hoban CJ, Gao YL, Garcia-Arenas R, Lawson D, Marchionni M, Gwynne D, Raine CS. The neuregulin, glial growth factor 2, diminishes autoimmune demyelination and enhances remyelination in a chronic relapsing model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1998;95:10100-5.
72. Dubois-DalcqM, Murray K. Why are growth factors important in oligodendrocyte physiology?. *Pathol Biol* 2000;48:80-6.
73. Muhallab S, Lundberg C, Gielen AW, Lidman O, Svenningsson A, Piehl F, Olsson T. Differential expression of neurotrophic factors and inflammatory cytokines by myelin basic protein-specific and other recruited T cells infiltrating the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol* 2002;55:264-73.
74. Picard-Riera N, Decker L, Delarasse C, Goude K, Nait-Oumesmar B, Liblau R, Pham-Dinh D, Evercooren BV. Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrocytes in adult mice. *PNAS, USA* 2002;99:13211-6.
75. Temple S, Alvarez-Buylla A. Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9:135-41.
76. Boulder C. Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. *Anat Rec* 1970;166:257-61.
77. Chanas-Sacre G, Rogister B, Moonen G, LePrince P. Radial glia phenotype: origin, regulation and transdifferentiation. *J Neurosci Res* 2000;61:357-63.
78. Misson JP, Takahashi T, Caviness VS. Ontogeny of radial and other astroglial cells in murine cerebral cortex. *Glia* 1991;4:138-48.
79. Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 2001;409:714-20.
80. Rakic P. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* 1972;145:61-83.
81. Compston A. Brain repair. *J R Coll Physicians Lond* 1994;28:107-20.
82. Yan Q, Elliot J, Snider WD. Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neuron from axotomy-induced cell death. *Nature* 1992;360:753-5.
83. Yuen EC, Mobley WC. Therapeutic potential of neurotrophic factors for neurological disorders. *Ann Neurol* 1996;40:347-54.
84. Prineas JW, Bamard RO, Kwon EE, Sharer LR, Cho ES. Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol* 1993;33:137-51.
85. Raine Cs, Wu E. Multiple sclerosis: remyelination in acute lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993;52:199-204.
86. Rodriguez M, Lennon VA. Immunoglobulins promote remyelination in the central nervous system. *Ann Neurol* 1990;27:12-27.
87. Scolding NJ, Franklin RJ. Remyelination in demyelinating disease. *Baillieres Clin Neurol* 1997;6:525-48.
88. Saez-Torres I, Brieva L, Espejo C, Barrau MA, Montalban X, Martinez-Caceres EM. Specific proliferation towards myelin antigens in patients with multiple sclerosis during a relapse. *Autoimmunity* 2002;35:45-50.
89. Sarchielli P, Greco L, Stipa A, Floridi A, Gallai V. Brain-derived neurotrophic factor in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2002;132:180-8.
90. Pluchino S, Quattrini A, Brambilla E, Gritti A, Salani G, Dina G, Galli R, Del Carro U, Amadio S, Bergami A, Furlan R, Comi G, Vescovi AL, Martino G. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* 2003;422:688-94.
91. Cosgaya JM, Chan JR, Shooter EM. The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination. *Science* 2002;298:1245-8.