

## Fattori neurotrofici e danno cerebrale nell'encefalopatia ipossico-ischemica: un ruolo del *nerve growth factor*?

Luigi ALOE (a) e Angela IANNITELLI (b)

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

(b) III Clinica Psichiatrica, Università degli Studi "La Sapienza", Roma

**Riassunto.** - Il danno ipossico-ischemico a carico del cervello pre- e perinatale rappresenta uno tra i maggiori fattori di rischio implicati nello sviluppo di disturbi neurologici. I meccanismi che sottendono il danno e la morte neuronale sono ancora poco conosciuti ma studi recenti, condotti su modelli animali, hanno dimostrato che l'apoptosi potrebbe essere uno dei meccanismi coinvolti nella morte neuronale. I fattori neurotrofici, molecole che ricoprono un importante ruolo nella crescita, differenziazione e funzione dei neuroni, interverrebbero anche nei meccanismi di morte neuronale. Esperimenti su modelli animali suggeriscono che le neurotrofine *nerve growth factor* (NGF) ed il *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) sono capaci di prevenire e/o ridurre la morte neuronale indotta da eventi di tipo ipossico-ischemico. In questa breve revisione vengono presentate e discusse le principali e più recenti evidenze a favore di questa ipotesi.

**Parole chiave:** danno ipossico-ischemico, fattori neurotrofici, *nerve growth factor* (NGF), *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF).

**Summary** (*Neurotrophic factors and brain damage in hypoxic-ischaemic encephalopathy: a role for nerve growth factor?*). - Hypoxic-ischaemic damage in perinatal brain is a major risk factor of a variety of serious human neurological disorders. The mechanisms leading to neuronal damage and death remain largely unknown, but animal models indicated that cell death via apoptotic mechanism (s) might be one important aspect of these events. Neurotrophic factors are protein molecules produced and released by several tissues which seem to play a crucial role not only in growth, differentiation and function of brain neurons, but also in the mechanisms of neuronal death. Indeed, experiments carried out on animal models support the hypothesis that the neurotrophins NGF and BDNF are able to prevent and/or reduce neuronal death induced by hypoxic-ischaemic events. In this brief review, the established and emerging evidences supporting this hypothesis are presented and discussed.

**Key words:** hypoxic-ischaemic injury, neurotrophic factors, nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF).

### L'encefalopatia ipossico-ischemica

L'encefalopatia ipossico-ischemica è una grave condizione che si presenta frequentemente nei neonati e nei bambini sopravvissuti ad asfissia pre- e peri-natale e costituisce uno dei principali fattori di rischio per morbilità e mortalità [1, 2].

La condizione di ipossia-ischemia perinatale è un evento ad eziologia multifattoriale che colpisce da 1 a 4 neonati per 1000 nati. Una grande quantità di questi pazienti soffre, in età adulta, di differenti disturbi neurologici, in particolare di disturbi cognitivi-comportamentali e sensitivo-motori. La ragione di questa sintomatologia trova riscontro nelle alterazioni a carico dei gangli basali così come di alcune regioni della neocortex che, più di altre aree cerebrali, sono più vulnerabili a danni che agiscono nel periodo neonatale [2, 3]. Se è vero che da un lato il danno a carico del sistema nervoso centrale (SNC) durante lo sviluppo neuronale provoca danni cerebrali e comportamentali minori di quelli che si osservano nell'adulto a causa di

una importante attività plastica da parte del cervello immaturo, è anche vero che proprio a causa della plasticità possono formarsi delle anomalie di connessione neuronale con conseguente esacerbazione dei danni neuronali anatomici e funzionali. L'encefalopatia ipossico-ischemica è una condizione che si associa a gravi quadri di ritardo nell'accrescimento intrauterino, prematurità, malformazioni maggiori ed altre patologie fetali, condizioni per le quali è richiesto un approfondimento di conoscenze scientifiche soprattutto per quanto concerne l'identificazione dei principali fattori di rischio del danno cerebrale.

I meccanismi fisiopatologici alla base della morte cellulare prodotta dal danno ipossico-ischemico sono molto complessi e non ancora completamente noti [2, 4]. Numerosi studi hanno dimostrato, utilizzando differenti modelli animali neonatali, che ipossia e/o ischemia (per es. anossia, ipossia, ischemia-ipossia) possono produrre gravi e prevedibili danni a carico del SNC [5-7] e che queste alterazioni sono simili a quelle che si osservano nei bambini colpiti dalla

malattia [1, 2]. Alla luce delle similitudini rinvenute nei tessuti cerebrali, animali ed umani, in seguito a danno ipossico-ischemico, numerosi sono stati gli studi eseguiti sui modelli animali per identificare ed approfondire i principali fattori di rischio del danno cerebrale. Molti studi hanno utilizzato il modello di ipossia-ischemia di Levine in cui la legatura unilaterale della carotide produce l'ipossia [8]. Questo modello consiste in uno schema riproducibile di danno emisferico ipsilaterale alla legatura della carotide [5, 6] e permette di studiare i meccanismi d'azione del danno cerebrale e di testare le sostanze e le strategie neuroprotettive [9]. A questo proposito si ricorda che osservazioni cliniche e studi condotti su modelli animali hanno messo in evidenza che la fase precoce del danno cerebrale è quasi sempre associata a meccanismi endogeni di neuroprotezione mirati a bloccare e/o limitare il danno neuronale. Riscontri sperimentali *in vivo* ed *in vitro* indicano che è il bilancio tra questi due eventi che spesso determina l'entità del danno neurologico.

Sebbene i risultati di questi studi abbiano contribuito ad una maggiore conoscenza di alcuni dei meccanismi coinvolti nel danno cerebrale neonatale ipossico-ischemico, non sono stati ancora identificati specifici trattamenti clinici efficaci per prevenire e/o ridurre l'insorgenza del danno neurologico in questa frequente sindrome, per la quale è anche carente una strategia diagnostica in particolare per quei contesti clinici non immediatamente correlabili a specifici quadri lesivi. Per quanto riguarda gli interventi terapeutici, è noto che l'induzione dell'ipotermia, la somministrazione di FANS o di antiossidanti, svolgerebbero un effetto terapeutico efficace per un meccanismo di tipo neuroprotettivo. Tuttavia, i dati clinici presentano limiti dovuti probabilmente alla difficoltà nella conduzione dei *trials*. Da un punto di vista clinico, inoltre, se da un lato le conoscenze ed i protocolli sui neonati nati pretermine sono sufficienti per una osservazione ed un intervento terapeutico mirato, più difficile risulta l'osservazione dei nati a termine in cui il dato dell'insorgenza di una ipossia-ischemia perinatale sfugge in larga parte al controllo ed all'intervento terapeutico precoce, soprattutto in presenza di sfumate alterazioni a carico dello sviluppo cerebrale, cioè in assenza di disabilità maggiori. Spesso, in molti di questi bambini, in età più avanzata, all'incirca in epoca pre-scolare o nei primi anni di vita scolare, compaiono alterazioni a carico della sfera cognitivo-comportamentale, attentiva e linguistica, sulle quali sarà poi necessario intervenire con adeguate strategie riabilitative.

#### **Fattori neurotossici coinvolti nel danno ipossico-ischemico**

Esiste una grande quantità di dati che supporta l'idea che gli AA eccitatori, come il glutammato, partecipino al danno tessutale causato dall'ipossia e dall'ischemia

[10-13]. La più forte argomentazione a favore della tossicità svolta dal glutammato nel danno ipossico-ischemico è la scoperta che gli antagonisti del glutammato (specialmente gli NMDA antagonisti) svolgono un effetto neuroprotettivo in molte forme di encefalopatia ipossico-ischemica sia *in vitro* [12, 13] che *in vivo* [11, 14]. Sebbene il cervello neonatale differisca nella sua suscettibilità agli AA eccitatori ed è, in generale, meno vulnerabile al danno ipossico-ischemico, rispetto a quello dell'adulto [15], ci sono buone evidenze dell'importante ruolo svolto dalla tossicità degli AA eccitatori nel danno ipossico-ischemico nel neonato. Si è visto, ad esempio, che l'iniezione diretta di agonisti del glutammato nel cervello di ratto durante lo sviluppo induce danni simili a quelli presenti nell'ischemia-ipossia [7, 16, 17]. Inoltre, il blocco dei recettori dell'NMDA in un modello animale neonatale di danno ipossico-ischemico è risultato neuroprotettivo [18].

Recenti evidenze suggeriscono che il danno cerebrale neonatale di tipo ipossico-ischemico sia prevalentemente di tipo *caspase-dependent* e *apoptotic-like* [19-25] a differenza dell'adulto dove questo meccanismo si riscontra solo per alcune morti cellulari [26-28]. Le *caspases* sono una famiglia di proteasi cisteina aspartil-specifiche omologhe del gene *ced-3* del *Caenorhabditis elegans*. Sono presenti in molte cellule come zimogeni inattivi e sono attivate durante il processo apoptotico. La loro iniziale attivazione è richiesta per molte forme di morte cellulare di tipo apoptotico ed avviene attraverso il *cleavage* di una grande varietà di proteine nucleari e cellulari.

#### **Potenziali fattori neuroprotettivi**

Sebbene numerose altre sostanze, oltre agli AA eccitatori, interverrebbero nella tossicità riscontrabile nella ipossia-ischemia, vi sono agenti che proteggono i neuroni del SNC neonatale dalla tossicità prodotta dagli AA eccitatori e che svolgerebbero secondariamente un effetto neuroprotettivo. Inoltre, alla luce dei cambiamenti dinamici che avvengono durante lo sviluppo cerebrale, è possibile ipotizzare l'esistenza di sostanze con funzione protettiva sia verso la tossicità prodotta dagli AA eccitatori sia verso altri agenti in grado di produrre la morte cellulare a causa del danno ipossico-ischemico.

Nonostante il fatto che i meccanismi della neuroprotezione non siano ancora completamente chiari, numerose evidenze sperimentali suggeriscono un potenziale ruolo giocato dai fattori neurotrofici. Sono stati chiamati in causa il *fibroblast growth factor* (FGF) [29], l'*insulin-like growth factor-1* (IGF) [30], il *nerve growth factor* (NGF) [31], il *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) [32], il *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) [33], il *tumor necrosis factor alfa* (TNFalfa) [34], la *neurotrophin 4/5* (NT 4/5) [35] come agenti

potenziali nella neuroprotezione durante le prime fasi di sviluppo ontogenetico del SNC, nella rigenerazione di lesioni a carico del SNP in risposta ad un danno prodotto da diversi agenti [36]. Per esempio, il FGF, somministrato sistemicamente, migliora le lesioni dello striato prodotte in ratti neonati dall'azione del MPP+ (1-metilfenilpiridinio) [37]; il CNTF svolgerebbe un'azione protettiva mediante l'attivazione di microglia e l'aumento dei processi di astrogliosi nel cervello neonatale di ratto [38], mentre la NT 4/5 interverrebbe nella protezione di danni nervosi periferici [35].

Altre sostanze sono state viste ricoprire un ipotetico ruolo nella neuroprotezione. Una di queste sostanze è la *midkine* (MK), una proteina legante l'eparina, con funzione neurotrofica. In seguito ad ischemia, infatti, si osserverebbe una *up-regulation* dell'mRNA per la MK ed un aumento della sintesi di questa proteina nell'ippocampo con una conseguente partecipazione di questa molecola nei processi riparativi che seguono il danno neuronale [39]. A questo proposito va ricordata la scoperta del 13-Mer peptide, *brain injury-derived neurotrophic peptide* (BINP), un frammento di un fattore neurotrofico che svolge una funzione di mantenimento e sopravvivenza a carico dei neuroni colinergici del setto e dei neuroni dopaminergici mesencefalici ed una funzione di neuroprotezione, da danno glutamatergico, a carico dei neuroni ippocampali [40]. Non solo questi fattori ma anche numerose citochine del SNC sono up-regolate da danno cerebrale.

Tutte queste osservazioni suggeriscono l'esistenza di sistemi che mantengono attivi i neuroni in seguito a danno cerebrale fino a quando il sistema nervoso non è completamente sviluppato. Alla luce di questi dati, risulta evidente che lo studio dei fattori neuroprotettivi sarebbe di estrema utilità non solo per un approfondimento delle conoscenze sui meccanismi fisiopatologici del danno cerebrale ma anche per la individuazione di potenziali markers per la diagnosi precoce ed il monitoraggio del danno neuronale, con una potenziale trasferibilità nella clinica. E' infatti noto un dato di grande interesse terapeutico e cioè che nella sequenza di eventi che portano alla morte neuronale, la vera e propria morte cellulare è preceduta da una "finestra temporale", di 8-48 h dopo la perfusione, in cui intervenire terapeutamente, per esempio con la somministrazione di fattori neurotrofici coinvolti nei processi di neuroprotezione e di neuroriparazione endogeni. Numerose evidenze sperimentali indicano come nel SNC le neurotrofine non solo stimolano la crescita, il differenziamento e la funzione della cellula nervosa, ma sono implicate e/o regolano la morte cellulare intrinseca programmata, più comunemente definita apoptosi. Poiché esistono delle analogie tra i meccanismi di morte programmata e necrosi, è verosimile ipotizzare che le neurotrofine svolgano un ruolo essenziale nei confronti dell'apoptosi e della necrosi associate a ipossia-ischemia, danno

ossidativo, ipoglicemia ed eccitotossine. E' bene sottolineare, tuttavia, che i meccanismi di morte cellulare a seguito di ischemia cerebrale sembrano essere correlati alla gravità dell'insulto. Per esempio, l'ischemia transitoria sembra esitare prevalentemente in apoptosi, mentre la necrosi si manifesta principalmente a seguito di ischemia. Le neurotrofine, e in particolare il NGF, sembrano svolgere un ruolo importante nei processi protettivi della morte cellulare indotta da ischemia cerebrale. Nelle pagine successive verranno discussi i risultati ottenuti e le ipotesi prospettate sul possibile coinvolgimento del NGF e del BDNF, le due principali neurotrofine, durante o a seguito di ipossia cerebrale.

### Neurotrofine e neuroprotezione del danno cerebrale

Le neurotrofine (NT) sono polipeptidi facenti parte della famiglia dei fattori neurotrofici [41] che a basse dosi intervengono nella sopravvivenza e nel mantenimento di specifiche linee cellulari neuronali sia nel SNC che nel SNP [42]. Il NGF, il BDNF, NT-3 e NT4/5 fanno parte di questa famiglia. Oltre a numerose funzioni, le NT svolgono quella di controllo della morte neuronale programmata durante lo sviluppo [43-45], morte che presenta tutte le caratteristiche dell'apoptosi. Le funzioni di mediatori di vita e di morte delle NT vengono svolte grazie all'attivazione dei recettori Trk espressi dai neuroni responsivi [42]. I recettori Trk e le stesse NT sono espresse in varie parti del cervello fin dalle fasi più precoci dello sviluppo cerebrale [42]. Per esempio, l'espressione dell'mRNA per il NGF ed il BDNF è regolata dall'attività neuronale per mezzo di meccanismi che coinvolgono differenti sistemi neurotrasmettitoriali inclusi i recettori per il glutammato [31, 46]. E' inoltre noto che il mRNA per il NGF e per il BDNF aumenta nel cervello dei roditori in numerose condizioni fisiopatologiche e dopo danno neuronale.

*Nerve growth factor* (NGF). - Tra i vari fattori di crescita isolati e caratterizzati, il NGF viene considerato un fattore di crescita con un elevato potenziale di utilizzo clinico sia in patologie di natura nervosa quali il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson ed alcune neuropatie periferiche [47], sia in patologie umane cutanee quali le ulcere corneali [48]. Negli ultimi anni, studi condotti nel nostro ed in altri laboratori sul ruolo del NGF durante il periodo perinatale in condizioni normali ed in seguito ad insulti neurotossici e ipossico-ischemici, avvalorano tale ipotesi. Sulla base delle conoscenze attuali è perciò verosimile ipotizzare un potenziale interesse terapeutico del NGF e/o di altre NT nella riduzione del danno ipossico perinatale e/o nel ristabilire le connessioni neuritiche alterate.

Il NGF è la NT meglio conosciuta nell'ambito delle NT di cui fanno parte anche il BDNF, l'NT-3 e l'NT 4/5 [41]. Nel SNC, il NGF agisce su numerose linee cellulari neuronali [49] di cui la meglio definita è rappresentata dai neuroni colinergici dello striato e del *forebrain* basale [50-53]. L'inizio dell'azione più incisiva del NGF sui neuroni responsivi si manifesta subito dopo la nascita nel cervello dei ratti, epoca questa che corrisponde pressappoco al periodo prenatale dello sviluppo del cervello nell'uomo. Si è, inoltre, visto che l'azione del NGF è correlata all'espressione del recettore trkA da parte delle cellule target [49, 53, 54].

Nel SNC, il NGF esercita un'azione protettiva sui neuroni che esprimono trkA in numerosi modelli di danno neuronale [55]. Sebbene i meccanismi non siano ancora del tutto chiari, recenti dati suggeriscono che in alcune situazioni il NGF sembrerebbe essere in grado di ridurre il danno indotto da insulto ischemico su specifiche popolazioni neuronali. Molti studi hanno infatti evidenziato che neuroni dell'ippocampo, della corteccia e dello striato presentano un ridotto danno neuronale se esposti ad una maggiore disponibilità di NGF endogeno ed, inoltre, che questa NT svolgerebbe un ruolo protettivo globale nei riguardi di numerose e differenti linee cellulari neuronali, incluse quelle che non esprimono gli specifici recettori trkA. Per esempio, abbiamo dimostrato, nel cervello di ratti neonati, che il grave danno dello striato e delle strutture vicine indotto dalla iniezione diretta intracerebrale di acido ibotenico (un AA eccitatore) può essere abolito dalla iniezione contemporanea di NGF [56]. L'effetto neuroprotettivo del NGF è visibile non solo in circa il 3% delle cellule dello striato che esprimono trkA ma anche nell'intera regione striatale. Simili, sebbene meno evidenti, risultati sono stati ottenuti nello striato di ratto adulto [57, 58]. Si è, inoltre, visto che il NGF svolge una azione protettiva nei riguardi dell'azione tossica svolta dall'acido quinolinico, un antagonista recettoriale NMDA [58], svolge un'azione protettiva contro la neurotossicità indotta dal glutammato in colture di neuroni corticali [59] e nella morte neuronale ippocampale, quando viene somministrato nel ventricolo laterale destro, in seguito a ischemia cerebrale globale nel ratto adulto [60].

Una delle prime dimostrazioni dell'effetto neuroprotettivo di una neurotrofina, e nello specifico del NGF, in un modello animale di danno cerebrale ipossico-ischemico, si deve a Holtzman *et al.* [61] i quali utilizzarono l'iniezione diretta intracerebrale di NGF per valutare il possibile effetto neuroprotettivo di questa NT sul danno ipossico-ischemico cerebrale prodotto dalla legatura unilaterale della carotide. Nello stesso anno altri autori dimostrarono che la somministrazione sistemica di NGF, BDNF e FGF attenuava il danno indotto in vivo dalla ipossia chimica da MPP+, con meccanismo mediato dalla attenuazione dello stress ossidativo [62].

Studi più recenti suggeriscono che la somministrazione endocerebrale di NGF riduce, in maniera significativa, la morte di neuroni cerebrali indotta, in modelli animali, da ischemia acuta della corteccia. E' stato inoltre evidenziato che il NGF riduce il danno ischemico su neuroni cerebrali indotto da occlusione dell'arteria cerebrale in topi *knockout* per il NGF. Proprio per queste proprietà neuroprotettive svolte sullo sviluppo dei neuroni cerebrali e sulla morte neuronale postnatale ed adulta, il NGF potrebbe essere preso in considerazione come potenziale molecola coinvolta nella riduzione del danno ipossico cerebrale e/o di altre forme di insulti neuronali che si osservano durante il periodo perinatale.

*Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF). - Tra le NT, il BDNF, per alcune sue caratteristiche, ricopre un ruolo di grande interesse nello sviluppo del SNC, sia in condizioni fisiologiche che in condizioni di danno [63]. In primo luogo, il recettore per il BDNF, trkB, il suo mRNA e la proteina stessa sono espresse da un ampio *range* di fenotipi neuronali differenti [64-73] a differenza di quanto si osserva per il NGF il cui recettore trkA è espresso da un limitato numero di cellule del SNC [49, 53, 74]. E' stato anche dimostrato che i livelli di trkB e di mRNA per il BDNF presentano una *up-regulation* intorno alle aree lesionate da un danno ischemico o da coma [75-80]; è, inoltre, noto che il BDNF interviene nel riparare le lesioni neonatali del midollo spinale [81]. Si è visto, inoltre, che il pretrattamento con iniezione intracerebroventricolare di BDNF svolge un efficace effetto neuroprotettivo nei riguardi di tessuti neonatali che hanno subito un danno ipossico-ischemico, migliora il deficit mnemonico e l'apprendimento spaziale [82], che questo effetto correla con l'abilità del BDNF nello stimolare la fosforilazione del trkB e che varia con l'età dell'animale essendo più efficace durante le prime fasi del periodo perinatale [83]. Un recente studio ha dimostrato, utilizzando uno specifico *marker* molecolare di apoptosi, che il danno ipossico-ischemico durante lo sviluppo cerebrale può essere considerato alla stregua di un forte stimolo apoptotico collegato alla attivazione della caspase-3 e che il BDNF può bloccare questo processo *in vivo*; inoltre, l'abilità del BDNF ad inibire l'attivazione della caspase-3 e la conseguente apoptosi avviene, in gran parte, grazie alla sua capacità di svolgere una funzione neuroprotettiva [84]. Numerosi studi confermano questo dato; si è visto, infatti, che oltre a fenomeni di necrosi, numerose cellule presentano, in seguito a danno ipossico-ischemico, fenomeni di apoptosi [19, 21-25]. Un altro studio ha confermato ed ampliato questi dati scoprendo che l'azione neuroprotettiva del BDNF, in seguito a danno ipossico-ischemico neonatale, avviene attraverso l'attivazione della via extracellulare delle protein-chinasi (ERK) e non di quella del fosfatidilinositolo 3-kinasi (PI3-Kinase) [85].

**Tabella 1.** - Danno cerebrale ipossico-ischemico e ruolo protettivo di NGF e BDNF

Autore	Materiali e metodi	Risultati	Conclusioni
Aloe, 1987 [56]	Iniezione diretta intracerebrale di acido ibotenic e di NGF in ratti neonati	In ratti neonati non trattati contemporaneamente con NGF si osserva un grave danno a carico dello striato e delle strutture vicine	Effetto neuroprotettivo del NGF non solo sul 3% delle cellule dello striato che esprimono trkA ma anche sull'intera regione striatale
Holtzman <i>et al.</i> 1996 [61]	Iniezione diretta cerebrale di NGF in ratti di 7 giorni sottoposti a danno ipossico-ischemico in seguito a legatura unilaterale della carotide	I controlli non trattati con NGF mostrano una riduzione del 30-40% del volume dello striato e della corteccia ipsilaterale alla legatura, contro il 10% osservato nei ratti trattati con NGF	Effetto neuroprotettivo del NGF nel danno cerebrale ipossico-ischemico probabilmente mediato dalla fosforilazione della tirosina del trkA in differenti regioni cerebrali
Korhonen <i>et al.</i> 1998 [86]	Campione: 7 pz neonati colpiti da asfissia grave vs 8 pz senza asfissia o infezioni (intervallo di età: 1 giorno-6 mesi) Diagnosi: classificazione di Sarnat e Sarnat (1976); indice di Apgar; pH del sangue arterioso da arteria ombelicare Dosaggio di NGF e BDNF nel liquor (ELISA)	I neonati con asfissia presentano alti livelli di BDNF e bassi livelli di NGF liquorali	Il BDNF protegge dal danno asfittico prolungato
Almli <i>et al.</i> 2000 [82]	Pretrattamento con iniezione intracerebroventricolare di BDNF in ratti di 7 giorni sottoposti a danno ipossico-ischemico mediante legatura unilaterale della carotide. Morris water maze a 20-30 giorni e analisi istologica del cervello (corteccia, striato, ippocampo)	Riduzione della densità neuronale dello strato CA1 in ratti non pretrattati con BDNF, correlato con deficit cognitivo	Il BDNF è protettivo verso il danno tessutale ed il deficit cognitivo

NGF: *nerve growth factor*; BDNF: *brain-derived neurotrophic factor*.

Il problema resta la difficoltà ad estendere i modelli di apoptosi a patologie umane neurologiche. A questo proposito vale la pena di ricordare un recente studio in cui si è visto un aumento di BDNF nel liquido cerebrospinale di neonati colpiti da asfissia perinatale che, per contro, presentavano bassi livelli di NGF liquorale [86]. L'aumento di BDNF liquorale era riconducibile anche ad un aumento della sintesi del BDNF e ad un meccanismo di *up-regulation* recettoriale per il BDNF. E' possibile che l'aumento di BDNF nei neonati che hanno subito un processo di asfissia abbia il significato di un meccanismo di difesa cerebrale per proteggere i neuroni dal danno prolungato. Rimane da chiarire se BDNF esogeno somministrato ai neonati possa alleviare i sintomi neurologici e offrire una migliore prognosi ai piccoli pazienti che hanno subito il danno ipossico-ischemico.

## Conclusioni

L'insulto ischemico-ipossico cerebrale pre- e perinatale può indurre danno o morte neuronale, con conseguenze che spesso persistono per tutta la vita. Negli anni recenti si è constatato che con il miglioramento dell'assistenza neonatale, la comprensione dei meccanismi coinvolti nella morte cellulare e l'identificazione di nuovi farmaci potrebbero facilitare ulteriormente la possibilità di ridurre il danno cerebrale e migliorare le condizioni di vita del paziente. Molti studi pubblicati negli ultimi anni hanno evidenziato la capacità di fattori di crescita prodotti dal tessuto cerebrale di promuovere la protezione, ritardare e/o indurre riparo dal danno neuronale post-ischemico. Anche se la sopravvivenza dei neuroni cerebrali è regolata dalla sintesi e utilizzo di uno o più mediatori biologici, si

ritiene che fattori neurotrofici, e specificatamente il NGF e il BDNF, rilasciati durante o a seguito dell'insulto ischemico, svolgerebbero un ruolo importante nei processi che concorrono a determinare la sopravvivenza o la morte cellulare programmata (apoptosi). Infatti i dati fin qui ottenuti sembrano avvalorare l'ipotesi che il NGF rilasciato localmente durante e/o in seguito all'insulto ischemico sia in grado di sopprimere i meccanismi intrinseci di morte cellulare per apoptosi.

I risultati discussi in questo breve articolo relativo al ruolo del NGF e BDNF nei processi di apoptosi neuronale a seguito di insulto ipossico-ischemico rappresentano un utile contributo alla comprensione dei meccanismi di morte cellulare associata a danno ischemico cerebrale, che potrebbero rivelarsi utili per aumentare le nostre conoscenze sui meccanismi patogenetici dell'ischemia cerebrale perinatale e per identificare nuove potenziali strategie terapeutiche.

#### Ringraziamenti

Questo studio è stato finanziato dal progetto di ricerca finalizzato dell'Istituto Superiore di Sanità: "Danno cerebrale ipossico-ischemico nel neonato: studi epidemiologici e sperimentali su diagnosi, terapie e recupero".

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 19 luglio 2001.

#### BIBLIOGRAFIA

- Vannucci RC. Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res* 1990;27:317-26.
- Volpe JJ. *Neurology of the newborn*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1995.
- Kyllerman M, Bager B, Bensch J, Bille B, Olow I, Voss H. Dyskinetic cerebral palsy: clinical categories, associated neurological abnormalities, and incidences. *Acta Paediatr Scand* 1982;71:543-50.
- Fellman V, Raivio KO. Reperfusion injury as the mechanism of brain damage after perinatal asphyxia. *Pediatr Res* 1997;41:599-606.
- Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 1981;9:131-41.
- Johnston MV. Neurotransmitter alterations in a model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Ann Neurol* 1983;13:511-8.
- Ferriero DM, Arcavi LJ, Sagar SM, McIntosh TK, Simon RP. Selective sparing of NADPH-diaphorase neurons in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol* 1988;24:670-6.
- Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 1960;36:1-17.
- Palmer C, Vannucci RC. Potential new therapies for perinatal cerebral hypoxia-ischemia. *Clin Perinatol* 1993;20:411-32.
- Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 1986;19:105-11.
- Simon RP, Swan JH, Griffiths T, Meldrum BS. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischaemic damage in the brain. *Science* 1984;226:850-2.
- Choi D. Glutamate neurotoxicity and diseases of nervous system. *Neuron* 1988;1:623-34.
- Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 1992;23:1261-76.
- Meldrum B. Protection against ischemic brain damage by excitatory amino acids antagonists. In: Bazan NG, Praquet P, Ginsberg MD (Ed.). *Neurochemical correlates of cerebral ischemia*. New York: Plenum Press; 1992. p. 245-58.
- Ferriero DM, Arcavi LJ, Simon RP. Ontogeny of excitotoxic injury to nicotianamide adenine dinucleotide phosphatase reactive neurons in the neonatal rat striatum. *Neuroscience* 1990;36:417-24.
- Silverstein FS, Chen R, Johnston MV. The glutamate analogue quisqualic acid is neurotoxic in striatum and hippocampus of immature rat brain. *Neurosci Lett* 1986;71:13-8.
- Silverstein FS, Torke L, Barks J, Johnston MV. Hypoxia-ischemia produces focal disruption of glutamate receptors in developing brain. *Dev Brain Res* 1987;34:33-9.
- Hattori H, Morin AM, Schwartz PH, Fujikawa DG, Wasterlain CG. Post-hypoxic treatment with MK-801 reduces hypoxic-ischemic damage in the neonatal rat. *Ann Neurol* 1989;39:713-8.
- Ferrer I, Tortosa A, Macaya A, Sierra A, Moreno D, Munell F *et al*. Evidence of nuclear DNA fragmentation following hypoxia-ischemia in the infant rat brain, and transient forebrain ischemia in the adult gerbill. *Brain Pathol* 1994;4:115-22.
- Mehmet H, Yue X, Squier MV, Lorek A, Cady E, Penrice J *et al*. Increased apoptosis in the cingulate sulcus of newborn piglets following transient hypoxia-ischemia is related to the degree of high energy phosphate depletion during the insult. *Neurosci Lett* 1994;181:121-5.
- Hill I, MacManus JP, Rasquinha I, Tuor UI. DNA fragmentation indicative of apoptosis following unilateral cerebral hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Brain Res* 1995;676:398-403.
- Sidhu S, Tuor UI, Del Bigio MR. Nuclear condensation and fragmentation following cerebral hypoxia-ischemia occurs more frequently in immature than older rats. *Neurosci Lett* 1997;223:129-32.
- Silverstein FS, Barks JD, Hagan P, Liu XH, Ivacko J, Szaflarski J. Cytokines and perinatal brain injury. *Neurochem Int* 1997;30:375-83.
- Cheng Y, Deshmukh M, D'Costa A, Demaro JA, Giddy J, Shah A *et al*. Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Clin Invest* 1998;101:1992-9.
- Pulera MR, Adams LM, Liu HT, Santos DG, Nishimura RN, Yang FS *et al*. Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Stroke* 1998;29:2622-9.
- Loddick SA, MacKenzie A, Rothwell NJ. An ICE inhibitor, z-VAD-DCB attenuates ischaemic brain damage in the rat. *Neuroreport* 1996;7:1465-8.

27. Hara H, Fiedlander RM, Gagliardini V, Ayata C, Fink K, Huang Z *et al.* Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2007-12.
28. Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli KJ *et al.* Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci* 1998;18:3659-68.
29. Nozaki K, Finklestein SP, Beal MF. Basic fibroblast growth factor protects against hypoxia-ischemia and NMDA neurotoxicity in neonatal rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993;13:221-8.
30. Gluckman P, Klempt N, Guan J, Mallard C, Sirimanne E, Dragunow M *et al.* A role for IGF-1 in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182:593-9.
31. Gall C, Isacson PJ. Limbic seizures increase neuronal production of messenger RNA for nerve growth factor. *Science* 1989;24:758-61.
32. Isacson PJ, Huntsman MM, Murray KD, Gall CM. BDNF mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from NGF. *Neuron* 1991; 6:937-48.
33. Ip NY, Wiegand SJ, Morse J, Rudge JS. Injury-induced regulation of ciliary neurotrophic factor mRNA in the adult rat brain. *Eur J Neurosci* 1993;5:25-33.
34. Tchelingirian JL, Quinonero J, Booss J, Jacque C. Localization of TNF alpha and IL-1 alpha immunoreactivities in striatal neurons after surgical injury to hippocampus. *Neuron* 1993;10:213-24.
35. Koliatsos VE, Cayouette MH, Berkemeier LR, Clatterbuck RE, Price DL, Rosenthal A. Neurotrophin 4/5 is a trophic factor for mammalian facial motor neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:3304-8.
36. Baldi A, Calia E, Ciampini A, Riccio M, Vetuschia A, Persico AM, Keller F. Deafferentation-induced apoptosis of neurons in thalamic somatosensory nuclei of the newborn rat: critical period and rescue from cell death by peripherally applied neurotrophins. *Eur J Neurosci* 2000;12:2281-90.
37. Kirschener PB, Henshaw R, Weise J, Trubetskoy V, Finklestein S *et al.* Basic fibroblast growth factor protects against excitotoxicity and chemical hypoxia in both neonatal and adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995;15:619-23.
38. Kahn MA, Ellison JA, Speight GJ, de Vellis J. CNTF regulation of astrogliosis and the activation of microglia in the developing rat central nervous system. *Brain Res* 1995;685:55-67.
39. Mochizuki R, Takeda A, Sato N, Kimpara T, Onodera H, Itoyama Y *et al.* Induction of midkine expression in reactive astrocytes following rat transient forebrain ischemia. *Exp Neurol* 1998;149: 73-8.
40. Hama T, Ogura A, Omori A, Murayama M, Kubota M, Sekiguchi M *et al.* A 13-mer peptide of a brain injury-derived protein supports neuronal survival and rescues neurons from injury caused by glutamate. *J Biol Chem* 1995;270:29067-70.
41. Thoenen H. The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci* 1991;14:165-70.
42. Lewin G, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 1996;19:289-317.
43. Oppenheim RW. Cell death during the development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1991;14:453-501.
44. Chao MV. Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation. *Neuron* 1992;9:583-93.
45. Snider WD. Functions of the neurotrophins during development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 1994;77:627-38.
46. Lindholm D, Castrèn E, Berzaghi M, Blöchl A, Thoenen H. Activity-dependent and hormonal regulation of neurotrophin mRNA levels in the brain-implications for neuronal plasticity. *J Neurobiol* 1994;25:1362-72.
47. Siegel GJ, Chauhan NB. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;33:199-227.
48. Lambiase A, Rama P, Bonini S, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N Eng J Med* 1988;338:1174-80.
49. Holtzman DM, Kilbridge J, Li Y, Cunningham ET Jr, Lenn NJ, Clary DO *et al.* TrkA expression in CNS: evidence for the existence of several novel NGF-responsive CNS neurons. *J Neurosci* 1995; 15:1567-76.
50. Mobley WC, Rutkowski JL, Tennekoon GI, Gemski J, Buchanan K, Johnston MV. Choline acetyltransferase in striatum of neonatal rats increased by nerve growth factor. *Science* 1985;229:284-7.
51. Mobley WC, Rutkowski JL, Tennekoon GI, Buchanan K, Johnston MV. Nerve growth factor increases choline acetyltransferase activity in developing basal forebrain neurons. *Mol Brain Res* 1986; 387: 53-62.
52. Johnston MV, Rutkowski JL, Wainer BH, Long JB, Mobley WC. NGF effects on developing forebrain cholinergic neurons are regionally specific. *Neurochem Res* 1987;12:985-94.
53. Holtzman DM, Li Y, Parada LF, Kinsman S, Chen CK, Valletta JS *et al.* p140trk mRNA marks NGF-responsive forebrain neurons: evidence that trk gene expression is induced by NGF. *Neuron* 1992; 9:465-78.
54. Li Y, Holtzman DM, Kromer LF, Kaplan DR, Chua-Couzens J, Clary DO *et al.* Coordinate regulation of trkA and ChAT expression in developing rat basal forebrain: evidence that NGF regulates cholinergic differentiation through p140trk. *J Neurosci* 1995;15: 2888-905.
55. Longo FM, Holtzman DM, Grimes ML, Mobley WC. Nerve growth factor: actions in the peripheral and central nervous systems. In: Fallon J, Loughlin S (Ed.). *Neurotrophic factors*. New York: Academic Press; 1992. p. 209-56.
56. Aloe L. Intracerebral pretreatment with nerve growth factor prevents irreversible brain lesions in neonatal rats injected with ibotenic acid. *Biotechnology* 1987;5:1085-6.
57. Schumacher JM, Short MP, Hyman BT, Breakefield XO, Isacson O. Intracerebral implantation of nerve growth factor-producing fibroblasts protects striatum against neurotoxic levels of excitatory amino acids. *Neuroscience* 1991;45:561-70.
58. Frim DM, Short MP, Rosenberg WS, Simpson J, Breakefield XO, Isacson O. Local protective effects of nerve growth factor-secreting fibroblasts against excitotoxic lesions in the rat striatum. *J Neurosurg* 1993;78:267-73.

59. Shimohama S, Ogawa N, Tamura Y, Akaike A, Tsukahara T, Iwata H *et al.* Protective effect of nerve growth factor against glutamate-induced neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res* 1993; 632:296-7.
60. Shigeno T, Mima T, Takakura K, Graham D, Kato G, Hashimoto Y *et al.* Amelioration of delayed neuronal death in the hippocampus by nerve growth factor. *J Neurosci* 1991;11:2914-9.
61. Holtzman DM, Sheldon RA, Jaffe W, Cheng Y, Ferriero DM. Nerve growth factor protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Ann Neurol* 1996;39:114-22.
62. Kirschner PB, Jenkins BG, Schulz JB, Finkelstein SP, Matthews RT, Rosen BR *et al.* NGF, BDNF and NT-5, but not NT-3 protect against MPP<sup>+</sup> toxicity and oxidative stress in neonatal animals. *Brain Res* 1996;713:178-85.
63. Clatterbuck RE, Price DL, Koliatsos VE. Further characterization of the effects of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Ciliary Neurotrophic Factor on axotomized neonatal and adult mammalian motor neurons. *J Comp Neurol* 1994;342:45-56.
64. Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J* 1990;9:2459-64.
65. Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson R, Wiegand SJ, Furth ME *et al.* NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 1990;5:501-9.
66. Klein R, Nanduri V, Jing SA, Lamballe F, Tapley P, Bryant S *et al.* The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 1991;66:395-403.
67. Middlemas DS, Lindberg RA, Hunter T. trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol* 1991;11:143-53.
68. Yan Q, Rosenfield RD, Matheson CR, Hawkins N, Lopez OT, Bennett L *et al.* Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 1997; 78:431-48.
69. Katoh-Semba R, Takeuchi IK, Semba R, Kato K. Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. *J Neurochem* 1997;69:34-42.
70. Masana Y, Wanaka A, Kato H, Asai T, Toyama M. Localization of trkB mRNA in postnatal development. *J Neurosci Res* 1993;35: 468-79.
71. Soppet D, Escandon E, Maragos J, Middlemas DS, Reid SW, Blair J *et al.* The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell* 1991;65:895-903.
72. Squinto SP, Stitt TN, Aldrich TH, Davis S, Bianco SM, Radziejewski C *et al.* TrkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell* 1991;6:885-93.
73. Zhou XF, Parada LF, Soppet D, Rush RA. Distribution of trkB tyrosine kinase immunoreactivity in the rat central nervous system. *Brain Res* 1993;622:63-70.
74. Sobreviela T, Clary DO, Reichardt LF, Brandabur MM, Kordower JH, Mufson EJ. TrkA-immunoreactive profiles in the central nervous system: colocalization with neurons containing p75 nerve growth factor receptor, choline acetyltransferase, and serotonin. *J Comp Neurol* 1994;350:587-11.
75. Merlio J-P, Ernfors P, Kokaia Z, Middlemas DS, Bengzon J, Kokaia M *et al.* Increased production of the trkB protein tyrosine kinase receptor after brain insults. *Neuron* 1993;10:151-64.
76. Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmer E, Kokaia M. Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci* 1994;17:490-6.
77. Tsukahara T, Yonekawa Y, Tanaka K, Ohara O, Watanabe S, Kimura T *et al.* The role of BDNF in transient forebrain ischemia in the rat brain. *Neurosurgery* 1994;34:323-31.
78. Narumiya S, Ohno M, Tanaka N, Yamano T, Shimada M. Enhanced expression of full-length trkB receptor in young rat brain with hypoxic/ischemic injury. *Brain Res* 1998;797:278-86.
79. Kokaia Z, Nawa H, Uchino H, Elmèr E, Kokaia M, Carnahan J *et al.* Regional brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein levels correlate with vulnerability to cerebral ischemia. *Mol Brain Res* 1995;38:139-44.
80. Lindvall O, Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Smith ML, Siesjö BK *et al.* Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:648-52.
81. Vischer HA. BDNF is expressed at the crush site after spinal cord lesion in newborn opossum (*Monodelphis domestica*). *Eur J Neurosci* 1997;9:1993-7.
82. Almlí CR, Levy TJ, Han BH, Shah AR, Gidday JM, Holtzman DM. BDNF protects against spatial memory deficits following neonatal hypoxia-ischemia. *Exp Neurol* 2000;166:99-114.
83. Cheng Y, Gidday JM, Yan Q, Shah AR, Holtzman DM. Marked age-dependent neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor against neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Ann Neurol* 1997;41:521-9.
84. Han BH, D'Costa A, Back SA, Parsadanian M, Patel S, Shah AR *et al.* BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol Dis* 2000;7:38-53.
85. Han BH, Holtzman DM. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury *in vivo* via the ERK pathway. *J Neurosci* 2000;20:5775-81.
86. Korhonen L, Riikonen R, Nawa H, Lindholm D. Brain derived neurotrophic factor is increased in cerebrospinal fluid of children suffering from asphyxia. *Neurosci Lett* 1998;240:151-4.