

## ***Nerve growth factor e brain derived neurotrophic factor: un possibile ruolo eziopatogenico nell'ipoacusia neurosensoriale. Dati preliminari***

Fabrizio SALVINELLI (a), Alessia ANTONELLI (b), Barbara STAMPACHIACCHIERE (b),  
Federico BIANCHI DI CASTELBIANCO (c), Manuele CASALE (a), Luca D'ASCANIO (a),  
Fabio GRECO (a) e Luigi ALOE (b)

(a) Area di Otorinolaringoiatria, Università Campus Bio-Medico, Roma

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

(c) Istituto di Ortofonia, Roma

**Riassunto.** - Il *nerve growth factor* (NGF) e il *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) sono membri di una famiglia di proteine secrete, dette neurotrofine, che promuovono e regolano la vita di numerosi tipi cellulari appartenenti al sistema nervoso periferico. Scopo dello studio è di misurare i livelli sierici di NGF e BDNF in 8 pazienti affetti da ipoacusia neurosensoriale (IPNS). I risultati mostrano una riduzione significativa dei livelli di NGF circolante, ma non di quelli di BDNF, nei pazienti affetti da IPNS rispetto ai controlli di pari età. I dati preliminari di questo studio suggeriscono che il NGF possa avere un ruolo cruciale nel sistema uditivo, promuovendo la sopravvivenza e prevenendo la degenerazione delle cellule neurosensoriali.

**Parole chiave:** NGF, BDNF, neurotrofine, ipoacusia neurosensoriale, orecchio interno, udito.

**Summary** (*NGF and BDNF: a leading role in sensorineural hearing loss. Preliminary data*). - Nerve growth factor (NGF) and brain derived neurotrophic factor (BDNF) are members of a family of structurally related secreted proteins, termed neurotrophins, which promote and regulate the survival of many kinds of neurons in the peripheral nervous system. Aim of the study is to dose the serum level of NGF and BDNF in 8 patients affected by sensorineural hearing loss (SNHL). The results show that in these patients the amount of circulating NGF, but not of BDNF, is significantly lower in comparison to that found in age-matched controls. The preliminary data of the present study suggest that NGF might have a crucial role in the auditory pathway, promoting the survival and preventing the degeneration of sensorineural cells.

**Key words:** NGF, BDNF, neurotrophins, sensorineural hearing loss, inner ear, hearing.

### **Introduzione**

L'ipoacusia rappresenta il deficit sensoriale più frequente nella specie umana. È stato calcolato che circa 1 bambino su 800 nati vivi ne è affetto [1] e che più del 60% della popolazione con età maggiore di 70 anni presenta un'ipoacusia che interferisce a tal punto con la comprensione del linguaggio parlato da richiedere la protesizzazione [2-4]. Valutazioni effettuate da ricercatori americani hanno dimostrato che nel 2000 il costo sociale medio per un individuo affetto da profonda ipoacusia, calcolato per tutta la durata della vita, era di circa US \$ 297 000, e superava il milione di dollari per gli individui con ipoacusia pre-linguale. E' stato calcolato, inoltre, che nei soli Stati Uniti si spenderanno 4,6 miliardi di dollari solamente per i soggetti colpiti da ipoacusia nel 1998 [5].

Nella maggior parte dei casi l'ipoacusia è un disordine multifattoriale, causato da fattori sia genetici che ambientali, inclusi infezioni perinatali, traumi acustici o cerebrali e farmaci ototossici [1]. L'ipoacusia neurosensoriale (IPNS) solitamente è causata da un danno a livello dei recettori cocleari, si manifesta in età avanzata, ma non raramente è presente sin dalla nascita [6]. I meccanismi eziopatogenetici dell'IPNS sono ancora oggetto di studio. Durante gli ultimi anni, sono state effettuate numerose ricerche per identificare nuove molecole in grado di stimolare e/o promuovere la rigenerazione delle cellule uditive lese in caso di IPNS. E' noto che le molecole neurotrofiche - *nerve growth factor* (NGF), *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofine 4 e 5 (NT-4/5) - svolgono un ruolo cruciale nelle neuropatie periferiche e nello sviluppo del sistema nervoso

periferico, in particolare nel controllo della sopravvivenza neuronale, nell'innervazione organo-specifica e nella sinaptogenesi [7-9]. Studi effettuati presso il nostro laboratorio, come in altri centri, hanno mostrato che i fattori neurotrofici, compreso il NGF, hanno una potenziale azione terapeutica nelle neuropatie periferiche dell'uomo [7]. Fino ad alcuni anni fa, si riteneva che le neurotrofine, di cui la molecola pleiotrofica NGF è il capostipite [10], svolgessero un ruolo cruciale solo nell'embriogenesi; studi recenti hanno invece dimostrato che tali molecole sono essenziali anche per il mantenimento in vita dei neuroni differenziati, per la protezione delle cellule nervose uditive e per la rigenerazione di popolazioni neuronali danneggiate [11]. Ricerche condotte negli ultimi anni nel nostro e in altri laboratori hanno evidenziato un ruolo del NGF e del BDNF nella genesi delle patologie del sistema uditivo [12-14]. È noto come numerosi fattori neurotrofici svolgano un ruolo cruciale durante lo sviluppo dell'orecchio interno, dalla differenziazione e morfogenesi alla guida delle fibre neuronali uditive per l'innervazione dell'organo del Corti [15]. Valutazioni recenti suggeriscono un possibile ruolo del NGF nell'IPNS [16, 17]. In particolare, Shoji *et al.* hanno dimostrato il ruolo dell'NT-3 e del BDNF nella protezione delle cellule cocleari dal trauma acustico nell'animale da esperimento [18]. Nonostante ciò, il ruolo delle neurotrofine a livello del sistema uditivo rimane in gran parte sconosciuto. Recentemente Dugan *et al.* hanno evidenziato come il NGF riduca la formazione di radicali liberi tossici [19], mentre Gabaizadeh *et al.* hanno riscontrato un aumento dell'attività delle cellule *scavenger* dei radicali liberi, indotto dalla somministrazione esogena di BDNF [20]. Altri studiosi hanno ipotizzato che i fattori neurotrofici possano avere un ruolo nella cascata apoptotica [21]; Nakao *et al.* hanno evidenziato come il BDNF e l'NT-3 siano in grado di indurre l'espressione di proteine che legano il calcio, con conseguente regolazione dell'omeostasi intracellulare di tale ione ed inibizione dei meccanismi di morte cellulare [22]. Zheng *et al.*, utilizzando colture cellulari di neuroni di ganglio spirale di ratti, hanno dimostrato il ruolo otoprotettivo a livello del ganglio spirale sia del BDNF che dell'NT-4/5 nella ototossicità da cisplatino [20, 23]. Altri autori hanno riscontrato, sempre nell'ambito della chemiotossicità, un ruolo protettivo di alcune neurotrofine, come il *glial cell line neurotrophic factor* (GDNF), anche a livello delle cellule ciliate della coclea [23-25].

Poiché l'IPNS è associata ad un danneggiamento dei recettori cocleari e/o dei neuroni della via uditiva, e le neurotrofine sembrano essere una componente essenziale nel torrente circolatorio, è ragionevole ipotizzare che modificazioni della concentrazione ematica di una o più neurotrofine possano influenzare

l'attività della componente nervosa periferica del sistema acustico. Per verificare la validità di questa ipotesi, abbiamo misurato i livelli sierici di NGF e BDNF in pazienti affetti da IPNS e in soggetti normoacusici.

## Materiali e metodi

Abbiamo selezionato, presso l'area di Otorinolaringoiatria dell'Università Campus Bio-Medico, otto pazienti affetti da IPNS. Il gruppo era costituito da quattro uomini e quattro donne, con età media di 20 anni (range 7-56 anni). Sono stati esclusi i soggetti con anomalie della membrana timpanica o dell'orecchio medio, coloro che avevano assunto farmaci ototossici o che riferivano anamnesi positiva per meningite, traumi o altre cause di ipoacusia. I valori sierici di NGF e di BDNF dei pazienti affetti da IPNS sono stati confrontati con quelli ottenuti in 8 controlli normoacusici, di pari sesso ed età.

È stato ottenuto il consenso informato da tutti i pazienti o dai genitori dei minori arruolati nello studio. Tutti i campioni sono stati congelati immediatamente e conservati a -70 °C fino al loro uso.

### Diagnosi di ipoacusia

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad audiometria tonale liminare in camera silente tramite audiometro clinico secondo le norme ISO 389/75, ANSI S.3.13/72, con tecnica standardizzata (ANSI S3-211978, individuando la soglia audiometrica ascendente per via ossea tre volte a 250, 500, 1000, 2000 e 4000 Hz). La timpanometria ha mostrato l'assenza, in tutti i pazienti, di componente trasmissiva nell'ambito dell'ipoacusia. I risultati sono stati calcolati in termini di mediana e intervallo interquartile.

### Dosaggio delle neurotrofine

*Nerve growth factor.* - I livelli di NGF sono stati misurati attraverso un dosaggio immunoenzimatico a due siti ad alta sensibilità per l'individuazione di NGF umano e murino e non cross-reagente con il BDNF [11, 13]. In breve, piastre immunologiche in polistirene a 96 pozzetti (Nunc) sono state rivestite con anticorpi policlonali purificati da capra ad alta affinità per il NGF, diluiti in tampone carbonato 0,05 M (pH 9,6). Pozzetti paralleli sono stati rivestiti con IgG purificate da capra (Zymed, San Francisco, CA, USA), per valutare le risposte non specifiche. Le piastre vengono lasciate *overnight* a 4 °C. Il giorno seguente le piastre sono state lavate tre volte con Tris-HCl, pH 7,4, 50 mM, NaCl 200 mM, gelatina allo 0,5%, Triton X-100 allo 0,1%. Dopo esteso lavaggio delle piastre, i

campioni e le soluzioni standard di NGF sono stati diluiti con un tampone di estrazione (Triton X-100 allo 0,1%, Tris-HCl 100 mM, pH 7,2, NaCl 400 mM, EDTA 4 mM, PMSF 0,2 mM, benzetonio cloride 0,2 mM, benzamidina 2 mM, aprotinina 40 U/ml, azide di sodio allo 0,05%, BSA al 2% e gelatina allo 0,5%), distribuito tra i pozzetti e lasciato a temperatura ambiente overnight. Il terzo giorno le piastre sono state lavate 3 volte e incubate con l'anticorpo anti-NGF legato alla galattosidasi a 4 mU/pozzetto (Boehringer Mannheim, Germany) per 2 ore a 37 °C e, dopo ulteriore lavaggio, sono stati aggiunti a ciascun pozzetto 100 µl di soluzione di cromogeno (4 mg/ml di rosso-clorofenolo, Boehringer Mannheim, Germany, tampone di substrato: HEPES 100 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, azide di sodio allo 0,1% e BSA all'1%). Dopo un'incubazione di 2 ore a 37 °C, viene misurato la densità ottica a 575 nm, usando un lettore ELISA (Dynatech) e i valori vengono corretti dagli standard e dai campioni, prendendo in considerazione il legame non specifico. In queste condizioni la sensibilità è 3 pg/ml, la specificità del NGF in questo test varia dal 80 al 90% e la cross-reattività con altre molecole della famiglia del NGF, come NT-3, NT-4/5, è inferiore al 3%. I dati sono stati rappresentati in pg/ml per i campioni liquidi e tutti i test sono stati eseguiti 3 volte.

**Brain derived neurotrophic factor.** - Il dosaggio del BDNF endogeno è stato effettuato con un kit a due siti immunoenzimatici (Promega, USA). Come per il dosaggio del NGF, immunoplastre a 96 pozzetti (Nunc) sono state rivestite con 100 µl per pozzetto di anticorpi monoclonali anti-BDNF murino e incubate overnight a 4 °C. Quindi le piastre sono state lavate tre volte con tampone di lavaggio e i campioni sono stati incubati nei pozzetti rivestiti (100 µl ciascuno) per 2 ore a temperatura ambiente, agitando su agitatore orbitale a 280 rpm. Dopo ulteriore lavaggio, l'antigene è stato incubato con anticorpi anti-BDNF umano per 2 ore a temperatura ambiente, agitando. Le piastre sono state nuovamente lavate con tampone di lavaggio e quindi incubate con anti-IgY HRP per un'ora a temperatura ambiente. Dopo ulteriore lavaggio le piastre sono state incubate con una soluzione cromogeno TMB/perossidasi per 15 min, ed è stato aggiunto ai pozzetti acido fosforico 1M (100 µl/pozzetto). Il risultato della reazione colorimetrica è stato misurato a 450 nm con lettore ELISA (Dynatech MR 5000, Germany). Le concentrazioni di BDNF sono state determinate tramite retta di regressione per il BDNF standard (con range da 7,8 a 500 pg/ml di BDNF murino purificato) incubato in condizioni simili in ogni test. La sensibilità del test è di 15 pg/ml di BDNF e la cross-reattività con altre molecole neurotrofiche correlate, come NGF, NT-3 e NT-4, è inferiore al 3%.

**Analisi statistica.** - L'analisi della varianza (ANOVA) è stata utilizzata per la caratterizzazione statistica dei dati usando il programma StatViewII per Macintosh (Abacus Concepts Inc. USA), considerando le condizioni sperimentali come fattore principale. I confronti *post hoc* sono stati analizzati per mezzo del test Tukey-Kramer. Valori di  $p < 0,05$  sono stati considerati statisticamente significativi.

## Risultati

### Grado di ipoacusia

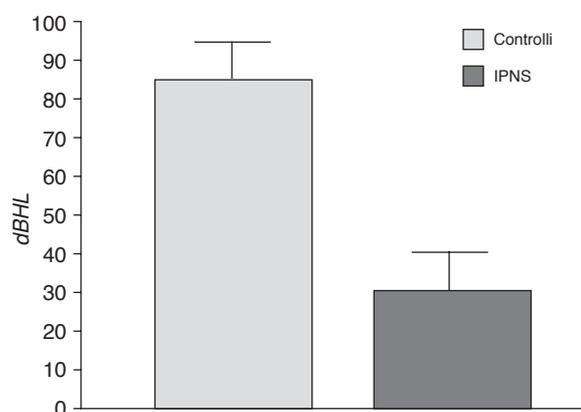
Sulla base delle soglie audiometriche, i nostri pazienti presentavano una IPNS da severo a profondo (4 profondo, 2 severo-profondo e 2 severo) (Fig. 1).

### Livelli circolanti di neurotrofine

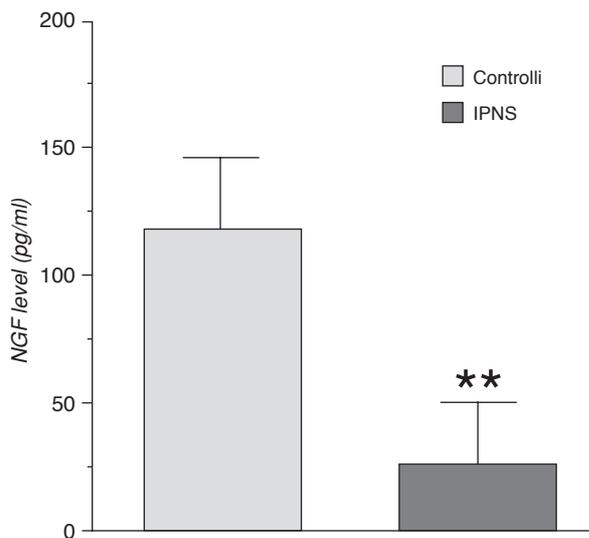
Numerose evidenze sperimentali hanno mostrato la presenza di NGF nel circolo ematico dell'uomo, e l'associazione dei livelli basali di tale molecola con deficit neurologici e neuro-immunitari [14]. In accordo con questi studi, abbiamo rilevato che il NGF era presente nel siero di soggetti sani e che i livelli di NGF ematico erano più alti nei pazienti adulti rispetto ai giovani. La differenza non era tuttavia significativa (dati non mostrati).

### Livelli sierici di NGF e BDNF in pazienti con ipoacusia neurosensoriale e in soggetti normali

I livelli di NGF nei pazienti con IPNS sono significativamente ridotti rispetto a quelli rilevati nell'insieme dei soggetti di controllo ( $p < 0,01$ ;  $F_{(1-14)} = 4388$ ) (Fig. 2).



**Fig. 1.** - Soglie audiometriche (valori medi e deviazione standard) dei pazienti con ipoacusia neurosensoriale (IPNS) rispetto ai controlli.



**Fig. 2.** - Concentrazione sierica di *nerve growth factor* (NGF) nei soggetti con ipoacusia neurosensoriale (IPNS) rispetto ai controlli. I livelli di NGF sono significativamente più bassi nei pazienti affetti da IPNS rispetto ai controlli. \*\*  $p < 0,01$ .

I pazienti sono stati inoltre divisi in due gruppi in base all'età:  $< 20$  anni ( $n = 4$ ) e  $> 20$  anni ( $n = 4$ ). I livelli di NGF nei pazienti  $> 20$  anni con IPNS erano significativamente inferiori rispetto ai controlli di pari età ( $p < 0,01$ ;  $F_{(1-6)} = 5,669$ ), mentre i livelli di NGF circolante nei pazienti  $< 20$  anni non mostravano alcuna differenza rispetto ai controlli ( $p = 0,13$ ;  $F_{(1-6)} = 2,45$ ). (Fig. 3, A-B) Non abbiamo riscontrato una correlazione significativa tra grado di ipoacusia e livelli sierici di NGF.

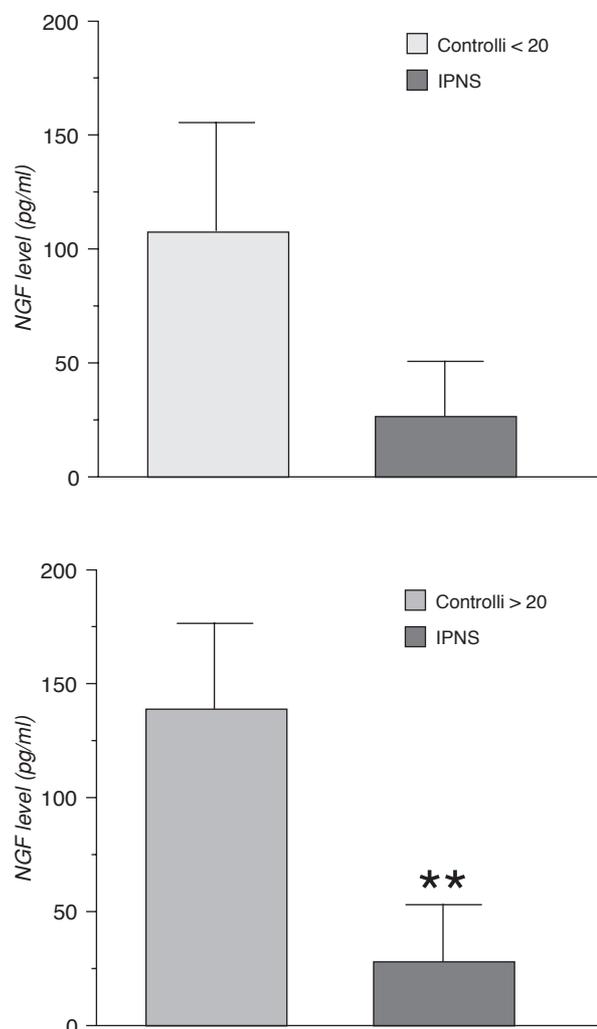
La differenza nella concentrazione sierica di BDNF tra i due gruppi di pazienti  $< 20$  e  $> 20$  anni ed i rispettivi controlli non risultava statisticamente significativa ( $p = 0,7699$ ;  $F_{(1-6)} = 0,089$ ), ( $p = 0,462$ ;  $F_{(1-6)} = 0,55$ ) rispettivamente (Fig. 4, A-B).

### Discussione

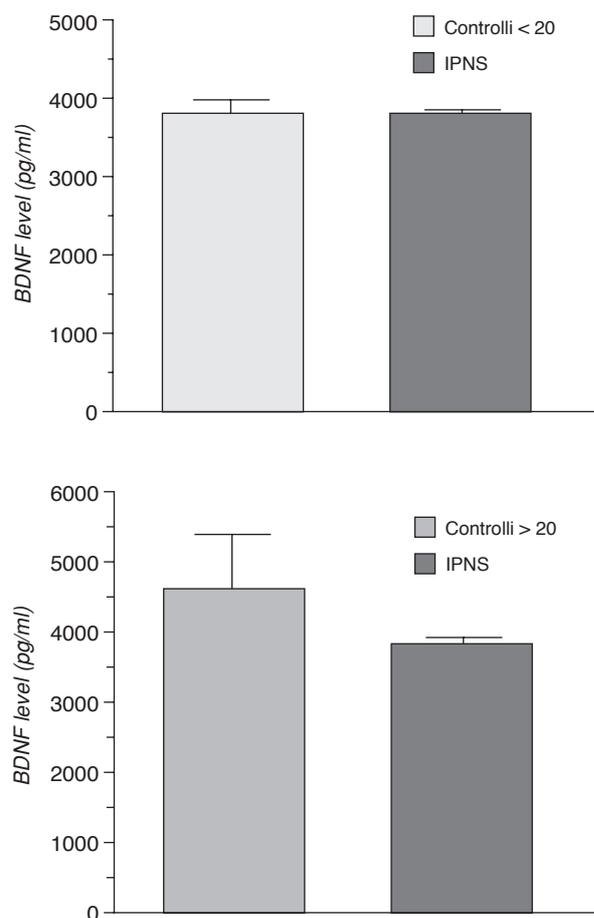
Sebbene i meccanismi alla base dell'azione ottoprotettiva delle neurotrofine non siano ancora completamente chiariti, le conoscenze disponibili permettono di ipotizzare che un alterato livello circolante di NGF possa essere una concausa di IPNS. I risultati qui riportati avvalorano tale ipotesi. Abbiamo, infatti, rilevato che i livelli di NGF circolanti nei pazienti con IPNS erano significativamente ridotti rispetto a quelli dei soggetti sani di pari età; tale differenza era presente nei soggetti adulti, ma non nei giovani. Anche se i meccanismi cellulari e molecolari coinvolti nell'IPNS restano da chiarire tramite indagini compiute su un numero maggiore di pazienti, i nostri

studi indicano che le cellule deputate alla produzione di NGF [10, 26] nei soggetti adulti producono una quantità di NGF superiore rispetto a quelle dei giovani, ipotesi supportata da numerose evidenze sul ruolo cruciale dell'NGF durante l'invecchiamento e il recupero nelle patologie legate alla senescenza.

I nostri studi hanno anche evidenziato che la differenza tra la concentrazione sierica di BDNF nei soggetti con IPNS e nei controlli di pari età non è statisticamente significativa. Questi dati sono in antitesi con quanto riportato da Gabaizadeh *et al.* [20]. La ragione di tale differenza resta da stabilire. Una possibile spiegazione può essere rappresentata dagli



**Fig. 3.** - **A.** Concentrazione sierica di *nerve growth factor* (NGF) nei soggetti con ipoacusia neurosensoriale (IPNS) e nei controlli con età  $< 20$  anni. Non ci sono differenze statisticamente significative nei livelli di NGF. **B.** Concentrazione sierica di NGF nei soggetti con ipoacusia IPNS e nei controlli con età  $> 20$  anni. I livelli di NGF nei pazienti con IPNS sono significativamente ridotti rispetto ai controlli. \*\*  $p < 0,01$ .



**Fig. 4. - A.** Concentrazione sierica di *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) nei soggetti con ipoacusia neurosensoriale (IPNS) e nei controlli < 20 anni di età. Non ci sono differenze significative. **B.** Concentrazione sierica di BDNF nei soggetti con IPNS e nei controlli > 20 anni di età. Non sono state riscontrate differenze significative.

alti livelli basali di BDNF circolante nell'uomo, che potrebbero rendere difficile l'individuazione delle differenze di concentrazione sierica di tale neurotrofina nei pazienti ipoacusici e nei controlli. Un'altra possibile ragione di tale difformità può essere ricercata nel diverso approccio metodologico usato nelle ricerche precedenti rispetto al nostro studio.

Attualmente, per la maggior parte dei pazienti affetti da IPNS profonda non esiste alcuna terapia medica efficace. Le uniche possibilità terapeutiche sono rappresentate dalle protesi acustiche e dagli impianti cocleari; entrambi rappresentano enormi passi avanti nella terapia dell'ipoacusia, ma presentano numerosi limiti sia tecnici che economici, tali da renderli fruibili solo ad una limitata porzione della popolazione ipoacusica [2]. Le attuali prospettive terapeutiche alternative trovano nella terapia genica e nell'induzione della rigenerazione e protezione dalla

morte delle cellule sensoriali e nervose dell'orecchio interno i due cardini fondamentali. In particolare, per quanto riguarda l'IPNS progressiva, si stanno sviluppando nuove strategie sperimentali come: 1) la prevenzione del decadimento della funzione uditiva nell'uomo attraverso l'utilizzo di fattori neurotrofici (NT-3, BDNF, NGF e GDNF) [8], 2) la rigenerazione delle cellule ciliate e la loro riconnessione con i neuriti dei neuroni del ganglio spirale, 3) l'uso delle neurotrofine per aumentare l'efficacia dell'impianto cocleare e come terapia medica nelle ipoacusie improvvise [15]. La possibilità di un ruolo dell'NGF nella terapia dei deficit dell'orecchio interno apre nuove frontiere nella terapia delle patologie uditive neurosensoriali. Il dosaggio ematico di neurotrofine e di altri fattori otoprotettivi nell'uomo potrebbe essere utile per valutare lo stato e/o il decorso fisiopatologico dell'udito. Esperimenti in corso su modelli animali di IPNS dovrebbero consentire di comprendere se le neurotrofine, singolarmente o in combinazione, siano efficaci *in vivo* nel prevenire la degenerazione neuronale e promuovere la riparazione delle cellule uditive. I risultati di tali studi potrebbero rivelarsi utili per valutare la potenziale applicabilità della molecola NGF nell'ipoacusia, come recentemente riportato per l'ulcera della cornea e ulcere cutanee umane [27, 28].

#### Ringraziamenti

Lo studio è stato supportato da Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Ortofonia di Roma, dal Grant n. 1-2001-877 da Juvenile Diabetic Foundation International e dalla Fondazione CARISBO, Italia a Luigi Aloe.

Ricevuto il 3 marzo 2003.

Accettato il 23 aprile 2003.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Willems PJ. Mechanisms of disease: genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med* 2000;342:1101-9.
2. Steel KP. Science, medicine, and the future. New interventions in hearing impairment. *BMJ* 2000;320:622-5.
3. Glorig A, Davis H. Age, nose and hearing loss. *Ann Otol* 1961;70:556-71.
4. Rosenhall U. Presbycusis-hearing loss in old age. *Lakartidningen* 2001;98:2802-6.
5. Mohr PE, Feldman JJ, Dunbar JL, McConkey-Robbins A, Niparko JK, Rittenhouse RK, Skinner MW. The societal costs of severe to profound hearing loss in the United States. *Int J Technol Assess Health Care* 2000 Autumn;16(4):1120-35.
6. Paparella MM. Review of sensorineural hearing loss. *Am J Otol* 1984;5(4):311-4.
7. Apfel SC, Kessler JA, Adornato BT, Litchy WJ, Sanders C, Rask CA. Recombinant human nerve growth factor in the treatment of diabetic polyneuropathy. *Neurol* 1998;51:695-702.
8. Qun LX, Pirvola U, Saarna M, Ylikosky J. Neurotrophic factors in the auditory periphery. *Ann NY Acad Sci* 1999;884: 292-304.

9. Agerman K, Hjerling-Leffler J, Blanchard MP, Scarfone E, Canlon B, Nosrat C, Ernfors P. BDNF gene replacement reveals multiple mechanisms for establishing neurotrophin specificity during sensory nervous system development. *Development* 2003;130(8):1479-91.
10. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987;4:1154-62.
11. Aloe L, Tirassa P, Bracci-Laudiero L. Nerve growth factor in neurological and non-neurological diseases: basic findings and emerging pharmacological perspectives. *Curr Pharm Des* 2001; 7:113-23.
12. Salvinelli F, Casale M, Greco F, Trivelli M, Di Peco V, Amendola T, Antonelli A, Stampachiachiere B, Aloe L. Nerve growth factor serum level is reduced in patients with sensorineural hearing impairment: possible clinical implications. *J Biol Regul Homeost Agents* 2002;16(3):176-80.
13. Weskamp G, Otten U. An enzyme-linked immunoassay for nerve growth factor (NGF): a tool for studying regulatory mechanisms involved in NGF production in brain and peripheral tissues. *J Neurochem* 1987;48:1779-86.
14. Aloe L. Nerve growth factor and neuroimmune responses: basic and clinical observations. *Arch Physiol Biochem* 2001;109(4):354-6.
15. Marzella PL, Gillespie LN. Role of trophic factors in the development, survival and repair of primary auditory neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29(5-6):363-71.
16. Malgrange B, Rigo JM, Van de Water TR, Staecker H, Moonen G, Lefebvre PP. Growth factor therapy to the damaged inner ear: clinical prospects. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1999;49:19-25.
17. Vega JA, San Jose I, Cabo R, Rodriguez S, Represa J. Trks and P75 genes are differentially expressed in the inner ear of human embryos. What may Trks and p75 null mutant mice suggest on human development? *Neurosci Lett* 1999;272:103-6.
18. Shoji F, Miller AL, Mitchell A, Yamasoba T, Altschuler RA, Miller JM. Differential protective effects of neurotrophins in the attenuation of noise-induced hair cell loss. *Hear Res* 2000;146(1-2):134-42.
19. Dugan LL, Creedon DJ, Johnson EM Jr, Holtzman DM. Rapid suppression of free radical formation by nerve growth factor involves the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(8):4086-91.
20. Gabaizadeh R, Staecker H, Liu W, Van De Water TR. BDNF protection of auditory neurons from cisplatin involves changes in intracellular levels of both reactive oxygen species and glutathione. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;50:71-8.
21. Staecker H, Gabaizadeh R, Federoff H, Van De Water TR. Brain-derived neurotrophic factor gene therapy prevents spiral ganglion degeneration after hair cell loss. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;119(1):7-13.
22. Nakao N, Kokaia Z, Odin P, Lindvall O. Protective effects of BDNF and NT-3 but not PDGF against hypoglycemic injury to cultured striatal neurons. *Exp Neurol* 1995;131(1):1-10.
23. Zheng JL, Gao WQ. Differential damage to auditory neurons and hair cells by ototoxins and neuroprotection by specific neurotrophins in rat cochlear organotypic cultures. *Eur J Neurosci* 1996;8(9):1897-905.
24. Kuang R, Hever G, Zajic G, Yan Q, Collins F, Louis JC, Keithley E, Magal E. Glial cell line-derived neurotrophic factor. Potential for otoprotection. *Ann NY Acad Sci* 1999;884:270-91.
25. Ruan RS, Leong SK, Mark I, Yeoh KH. Effects of BDNF and NT-3 on hair cell survival in guinea pig cochlea damaged by kanamycin treatment. *Neuroreport* 1999;10(10):2067-71.
26. Aloe L, Skaper SD, Leon A, Levi-Montalcini R. Nerve growth factor and autoimmune diseases. *Autoimmunity* 1994;19(2):141-50.
27. Lambiase A, Manni L, Bonini S, Rama P, Micera A, Aloe L. Nerve growth factor promotes corneal healing: structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(5):1063-9.
28. Bernabei R, Landi F, Bonini S, Onder G, Lambiase A, Pola R, Aloe L. Effect of topical application of nerve-growth factor on pressure ulcers. *Lancet* 1999;354(9175):307.