

I modelli animali di encefalopatia ipossico-ischemica

Ombretta RUFINI, Angela VALANZANO e Gemma CALAMANDREI

*Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e di Sistema,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Riassunto. - In questa breve rassegna vengono presentati alcuni dei modelli sperimentali animali più utilizzati per la caratterizzazione degli effetti neurologici e neuropatologici dell'anossia/ischemia neonatale. Le tecniche utilizzate per indurre il danno in primati non umani, in ovini, suini e nel ratto di laboratorio sono concisamente descritte, riportando i risultati di maggiore rilievo, sia in relazione agli esiti neuropatologici che soprattutto agli effetti comportamentali. In accordo con i dati osservazionali nell'uomo, gli studi sperimentali condotti su modelli animali di encefalopatia ipossico/ischemica indicano che le regolazioni del comportamento motorio e delle funzioni attenzionali/cognitive sono tra le più colpite dall'asfissia perinatale.

Parole chiave: encefalopatia ipossico/ischemica, modelli animali, sviluppo neurocomportamentale, roditori.

Summary (*Animal models of hypoxic-ischaemic encephalopathy*). - This review presents the animal models more widely used to study neurological and neuropathological outcomes of perinatal asphyxia. Methods used to induce hypoxia/ischemia in fetal and newborn non-human primates, lambs, piglets and rodents are concisely described, reporting the more relevant neuropathological and behavioural findings. In line with human observational data, experimental studies indicate that motor behaviour and attentional/cognitive abilities are among those behavioural regulations more significantly affected by perinatal asphyxia.

Key words: hypoxic-ischaemic encephalopathy, animal models, neurobehavioural development, rodents.

Introduzione

L'encefalopatia ipossico-ischemica è la più importante conseguenza dell'evento asfittico perinatale per la particolare vulnerabilità del sistema nervoso centrale e per le potenziali ripercussioni più o meno gravi sulle funzioni motorie, cognitive e comportamentali. Negli ultimi dieci anni gli studi condotti su animali hanno contribuito a chiarire almeno in parte la complessa patogenesi del danno ipossico/ischemico, e a identificare la sequenza di eventi che dall'alterazione iniziale dello scambio gassoso placentare e/o alveolare produce alla fine morte neuronale per processi apoptotici e necrotici nel sistema nervoso centrale del feto o del neonato [1]. Va sottolineato che nessun modello sperimentale può essere considerato ideale nel rappresentare la varietà e complessità dell'encefalopatia ipossico/ischemica nel neonato umano. Come approfonditamente descritto in altri contributi a questo fascicolo, l'encefalopatia ipossico/ischemica ha un'eziologia multifattoriale, e gli esiti dell'evento asfittico sono diversi nel neonato pretermine e in quello nato a termine, ed è tecnicamente impossibile costruire un modello animale che tenga conto di tutti i diversi fattori potenzialmente coinvolti nella patogenesi del danno cerebrale, inclusa la condizione di nascita pretermine quale si verifica nella specie umana. Tuttavia, a partire dagli anni '70 diverse specie animali

sono state utilizzate per l'analisi dei meccanismi patogenetici che dall'evento anossico/ischemico conducono al danno neuronale, e gli obiettivi delle ricerche, i disegni sperimentali e le tecniche sono man mano divenuti sempre più sofisticati. In base ai parametri da esaminare, una specie animale può essere preferibile per le caratteristiche fisiologiche e per le maggiori o minori analogie con la specie umana. Ad esempio, sia il modello ovino che quello suino si sono rivelati più adatti per lo studio di *endpoints* metabolici e fisiologici acuti e subacuti, mentre i roditori e i primati non umani si adattano all'analisi degli effetti neurologici e comportamentali a lungo termine. In particolare, i roditori di laboratorio si prestano a studi a lungo termine soprattutto per il loro elevato tasso di sopravvivenza all'insulto ipossico/ischemico, che ha consentito di valutare alterazioni neurochimiche e comportamentali anche a lunga distanza dall'induzione dell'asfissia. Questo ultimo aspetto è di notevole importanza quando si consideri che gli esiti neurologici e comportamentali dell'asfissia perinatale si manifestano a stadi differenti dello sviluppo postnatale. Infatti, mentre i deficit neurologici maggiori, quali la paralisi cerebrale o l'epilessia compaiono tipicamente dopo breve tempo dall'insulto, eventi anossici moderati possono dar luogo ad alterazioni più sottili dello sviluppo cerebrale, che si rendono evidenti sul piano funzionale solo più

tardivamente. Dati epidemiologici recenti indicano infatti un'incidenza significativa di disturbi del comportamento e della sfera cognitiva in bambini senza disabilità apparenti ma con un precedente insulto anossico alla nascita [2].

In questa breve rassegna, saranno presentati alcuni dei modelli sperimentali animali più utilizzati per la caratterizzazione degli esiti neurologici e neuropatologici dell'anossia/ischemia neonatale. Saranno concisamente descritte le tecniche utilizzate per indurre il danno in primati non umani, nel modello ovino, suino e nel ratto di laboratorio, riportando i risultati di maggiore rilievo, sia in relazione agli esiti neuropatologici che soprattutto agli effetti comportamentali.

Induzione di ipossia/ischemia in modelli animali

Studi su primati non umani

Gli studi di Myers [3], Myers *et al.* [4, 5] e Brann e Myers [6] hanno aiutato a comprendere la dinamica delle patologie cerebrali indotte da un insulto ipossico-ischemico su feti e neonati di primati non umani. Gli studi fetali hanno riguardato feti sottoposti a differenti tipi di insulto in momenti diversi della gravidanza, ai quali seguivano valutazioni dei cambiamenti a carico dello stato cardiovascolare fetale e del sistema nervoso, nonché di parametri neuropatologici negli animali sopravvissuti al danno.

In tale modello animale l'insulto ipossico-ischemico veniva indotto in feti di 94-162 giorni di gestazione, nei quali dopo taglio cesareo l'asfissia intrauterina totale veniva prodotta mediante legatura del cordone ombelicale e mantenendo la testa del nascituro immersa in soluzione salina così da impedire il primo respiro per un intervallo di tempo di 12-16 minuti [4, 7-9]. L'asfissia parziale *in utero* veniva invece prodotta mediante tecniche di riduzione della circolazione uterina attraverso legatura delle arterie materne [10, 11].

I risultati di questi studi hanno evidenziato che il cervello fetale immaturo possiede un più elevato grado di tolleranza al danno ipossico-ischemico in confronto al cervello di animali a termine, e che per l'induzione di danni cerebrali misurabili era necessario, oltre all'insulto ipossico (riduzione della PaO₂) anche quello ischemico. In base alla natura e durata dell'insulto ipossico-ischemico, si possono osservare specifici cambiamenti neuropatologici, ovvero danno nucleare acuto nel tronco cerebrale a seguito di asfissia totale, mentre in seguito ad una parziale ma prolungata asfissia si genera edema con necrosi neuronale negli emisferi cerebrali [5, 6].

In particolare, l'induzione di prolungata e parziale ipossia nel feto mediante ipotensione provocata nella madre gravida da esposizione a una miscela di alotano e monossido di carbonio, provocava nei feti effetti

neuropatologici (edema ed emorragie a carico delle aree corticali) che si avvicinano a quelli osservati nel neonato umano [6].

Ricerche successive hanno evidenziato tuttavia delle limitazioni nel modello animale di Myers: in confronto alla specie umana, è necessario un grave grado di ipossia materna per causare danni al sistema nervoso centrale (SNC) fetale; i frequenti cambiamenti neuropatologici che si osservano nei primati non umani (ad esempio grave edema cerebrale a seguito della necrosi neuronale) non sono comunemente riscontrati nei neonati a termine dopo danno ipossico-ischemico, mentre le emorragie intra- e periventricolari e le lesioni ischemiche presenti nel neonato umano pretermine raramente si riscontrano nei primati non umani. Inoltre, le implicazioni economiche ed etiche dell'impiego per uso sperimentale dei primati non umani ne ha limitato l'utilizzo per gli studi di patologie perinatali, e si è andati via via preferendo altri modelli animali.

Studi su ovini e suini

Gli ovini sono considerati un modello d'elezione per gli studi volti ad analizzare il metabolismo ed il flusso sanguigno cerebrale nel feto, sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

Negli ovini il metodo per indurre l'insulto ipossico-ischemico prevede il taglio cesareo e la cateterizzazione del feto a 115-133 giorni di gestazione (il catetere rimane all'esterno del corpo materno), con successivo ritorno del feto *in utero* [12, 13]. Tre giorni dopo, l'insulto ipossico/ischemico viene prodotto dalla temporanea occlusione di entrambe le arterie carotidiche per un periodo di 30 minuti o dall'occlusione delle arterie uterine materne per 60 minuti, seguita in alcuni animali da un'ulteriore ipossia materna di 120 minuti.

I vantaggi di tale modello sono da attribuire al fatto che le femmine gravide sostengono molto efficacemente l'uterotomia senza entrare in travaglio prematuro ed inoltre tali studi possono essere condotti sul feto senza l'uso di anestetico e questo evita tutti i conseguenti effetti che l'anestesia può avere sul metabolismo e sul flusso cerebrale.

Alcuni importanti aspetti della fisiopatologia dell'insulto ipossico/ischemico, quali il ruolo dei radicali liberi nell'induzione del danno postischemico, sono stati evidenziati nel modello ovino [14]. Inoltre, la tecnica della cateterizzazione consente di verificare sia gli effetti dell'insulto ipossico/ischemico su parametri ematici e fisiologici, sia di valutare la potenziale efficacia di trattamenti neuroprotettivi su questi stessi parametri. Ad esempio, l'infusione di *insuline-like growth factor* (IGF) nel ventricolo cerebrale dopo 90 minuti dall'insulto ischemico previene efficacemente la morte di neuroni striatali [15].

Tuttavia le limitazioni del modello ovino risiedono nel fatto che non è stata approfondita l'entità dei danni cerebrali che seguono all'insulto, e che il cervello di un feto o neonato ovino è di gran lunga più maturo di quello umano a parità di giorno di gestazione, e quindi i dati ottenuti sono difficilmente confrontabili con dati umani.

Per quanto riguarda i suini, il maiale è una specie largamente utilizzata nello studio del metabolismo e del flusso cerebrale. In particolare, i feti e neonati di questa specie sono stati oggetto di studio dagli anni '80, contribuendo ampiamente alla comprensione di alcuni aspetti della patologia ipossico/ischemica [16], nonché alla valutazione di alcuni trattamenti farmacologici [17, 18].

Tutti gli studi fino ad oggi riportati sono stati condotti su animali neonati dalla nascita al 3° giorno di vita, e la condizione ipossico/ischemica viene prodotta mediante legatura reversibile della carotide ed esposizione a una miscela a bassa saturazione di O₂ per una durata di circa 30 minuti.

Tuttavia, in questa specie c'è una limitata sopravvivenza nel tempo dopo l'induzione dell'insulto ipossico/ischemico che ha reso assai difficile evidenziare effetti permanenti sul SNC. Perciò, analogamente ai modelli ovin, anche il modello suino si dimostra più adatto allo studio delle alterazioni immediate piuttosto che degli effetti a lungo termine che seguono al danno.

Studi su roditori di laboratorio

La maggior parte delle ricerche riguardanti lo studio degli effetti a lungo termine causati dall'insulto ipossico-ischemico, vengono condotte su roditori di laboratorio, e in particolare sulla specie ratto.

Infatti l'anatomia vascolare-cerebrale di questa specie non differisce significativamente da quella della specie umana e lo sviluppo neurologico e neurocomportamentale del ratto è ampiamente caratterizzato. Inoltre l'impiego dei roditori di laboratorio presenta notevoli vantaggi dovuti ai ridotti costi, alla velocità di riproduzione, e alla loro notevole resistenza al danno ipossico/ischemico che rende possibile l'analisi a lungo termine degli esiti del danno stesso.

I metodi più comunemente utilizzati nella specie ratto per indurre un insulto ipossico/ischemico sono di seguito riportati. Come si vedrà, i modelli animali di encefalopatia ipossico/ischemica che utilizzano roditori di laboratorio si riferiscono in maggioranza all'induzione acuta di un evento ipossico/ischemico nella fase postnatale, con l'obiettivo di produrre danni neurologici maggiori, e di caratterizzarne i meccanismi patogenetici. La tecnica descritta da Levine nel 1960 [19] per indurre ischemia cerebrale nel ratto adulto, è stata modificata e applicata al ratto neonato da Rice *et al.* [20]: ratti di 7 giorni di età venivano sottoposti in anestesia a legatura unilaterale dell'arteria carotidea e in seguito esposti per

tre ore a una miscela di O₂ all'8%. I piccoli venivano sacrificati 48 ore dopo l'induzione dell'insulto ipossico/ischemico, e il cervello esaminato per la valutazione di alterazioni morfologiche. Nel 90% degli animali sopravvissuti sono state riscontrate lesioni della corteccia cerebrale, del corpo striato, dell'ippocampo e del talamo, infarto o necrosi della sostanza bianca, proporzionalmente alla durata dell'insulto ipossico [21].

Negli anni questa tecnica ha subito delle modifiche [22-25], quali la legatura di entrambi le arterie carotidiche seguita da ipossia al 6,5% per un periodo di 1 ora [26, 27], per indurre una ipossia/ischemia severa e quasi totale. Utilizzando questo modello sperimentale, sono stati caratterizzati, oltre agli esiti neuropatologici, le alterazioni metaboliche, evidenziando: a) deplezione dei substrati cellulari per la produzione di ATP; b) acidosi; c) accumulo di calcio intracellulare entro le 48 ore successive all'evento ipossico/ischemico. Altri studi nello stesso modello animale di ipossia/ischemia si sono focalizzati tra gli altri, sul ruolo degli aminoacidi eccitatori [28], dell'ossido nitrico [29] e sulle anomalie cerebrali riscontrabili attraverso la *magnetic resonance imaging* (MRI) [30]. Inoltre, numerosi studi sono stati condotti in questo modello animale per valutare gli effetti neuroprotettivi di diversi trattamenti farmacologici, inclusi gli antagonisti del recettore NMDA, gli antagonisti del glutammato, i glucocorticoidi, gli anti-infiammatori non steroidei, i fattori di crescita (si rimanda alla rassegna di Berger e Garnier [1] per una più estesa trattazione di questo aspetto).

A fronte dell'estesa caratterizzazione degli esiti neuropatologici in questo modello di ipossia/ischemia neonatale, sorprendentemente pochi studi hanno considerato gli effetti comportamentali di tale insulto. Bona *et al.* [31-33], Jansen *et al.* [34], Balduini *et al.* [35] hanno evidenziato un aumento dell'attività locomotoria degli animali ipossici allo svezzamento, effetto che poi scompare all'età adulta. Inoltre questi animali mostrano un tasso ridotto di alternanza spontanea quando vengono posti in un labirinto a T, e deficit nell'abilità di memoria spaziale nel labirinto acquatico di Morris. Questi dati indicano che la combinazione di ipossia e ischemia in ratti neonati causa deficit di apprendimento a lungo termine e asimmetrie nel comportamento motorio.

Un'altra tecnica per provocare asfissia nell'animale neonato è quella descritta da Dell'Anna *et al.* [36-38], che inducono ipossia mediante l'esposizione degli animali neonati a N₂ (100%) per 25 min a 2,7 atmosfere circa 30 ore dopo la nascita. In questo modello di asfissia neonatale gli effetti evidenziati sono soprattutto a carico dell'attività locomotoria e della memoria spaziale: gli animali ipossici risultano iperattivi durante il periodo adolescenziale (25-40 giorni) e deficitari in test di memoria spaziale nell'età adulta. Iuvone, Geloso e Dell'Anna [37] hanno inoltre riscontrato che

l'arricchimento dell'ambiente in cui gli animali vivono mediante aggiunta di oggetti di vario tipo e dimensione (dal giorno 21 al giorno 60 postnatale), riduceva le alterazioni comportamentali indotte dall'ipossia neonatale. Sebbene con questo metodo non si evidenzino deficit neurologici o esiti neuropatologici maggiori, tuttavia sono state riscontrate alterazioni della densità cellulare nell'area ippocampale presumibilmente correlabili alle modificazioni comportamentali osservate [36].

Il metodo che più si avvicina alla situazione clinica di asfissia perinatale nel neonato umano è quello messo a punto da Bjelke *et al.* [39] nel 1991 nel quale, dopo isterectomia a termine, l'evento di asfissia acuta viene indotto immergendo completamente l'utero all'interno di un bagno termostato contenente soluzione fisiologica a 37 °C per un periodo che varia dai 5 ai 20 minuti. In seguito i feti vengono liberati dal sacco amniotico e stimolati fino al verificarsi del primo respiro, prima di essere affidati ad una madre adottiva che abbia partorito normalmente nelle 24 ore precedenti. Per periodi di asfissia inferiori a 18-20 minuti i neonati mostrano un'alta percentuale di sopravvivenza e possono essere perciò seguiti fino all'età adulta, valutando eventuali effetti a lungo termine.

Utilizzando tale modello si osserva, negli animali di tre settimane che abbiano subito uno shock asfittico di 14-17 minuti, una riduzione del numero dei neuroni nelle aree CA1 e CA3 dell'ippocampo; tale risultato si ottiene anche nel feto ovino a seguito dell'occlusione dell'arteria carotidea, coinvolgendo anche l'area ippocampale CA2.

Le alterazioni a carico del SNC comprendono inoltre deficit in diversi sistemi di neurotrasmettitori [40, 41] e alterazioni del metabolismo cerebrale simili a quanto riportato in clinica.

Le analisi dei parametri neurocomportamentali sono state condotte quasi esclusivamente nell'animale adulto dove si sono effettuati studi atti a valutare l'apprendimento spaziale, la memoria e lo sviluppo cognitivo. I risultati ottenuti indicano che gli animali soggetti ad asfissia perinatale mostrano: a) deficit nella fase di acquisizione di test di apprendimento spaziale [10]; b) riduzione dei normali livelli di attività locomotoria negli animali maschi adulti posti in un ambiente nuovo [42]; c) alterazioni nelle risposte emozionali nel *plus-maze test*, che potrebbero riflettere cambiamenti a carico degli aminoacidi eccitatori nell'ipotalamo [43]; d) marcata risposta comportamentale all'anfetamina dato che suggerisce un eventuale coinvolgimento del sistema dopaminergico [44]. Queste alterazioni comportamentali a lungo termine si accompagnano a una riduzione dei livelli dei neurotrasmettitori dopamina e acido gamma ammino butirrico (GABA), suggerendo che l'induzione di asfissia perinatale secondo questa tecnica provoca deficit cronici nella neurotrasmissione, soprattutto a livello dei nuclei della base [40].

Conclusioni

Quale che sia il metodo utilizzato per indurre il danno ipossico-ischemico, alcuni parametri comportamentali, quali l'attività locomotoria e le prestazioni di apprendimento e memoria spaziale risultano costantemente alterati nei modelli animali di encefalopatia ipossico/ischemica. Secondo alcuni autori, gli animali con insulto asfittico perinatale tendono a essere iperattivi attorno all'età dello svezzamento, ma i livelli di attività si ristabiliscono a livelli normali nell'età adulta suggerendo che eventuali meccanismi adattativi/riparativi si verificano durante la maturazione strutturale e funzionale del cervello. Altri studi riportano invece una riduzione dei livelli di attività locomotoria all'età adulta, limitata al sesso maschile. Le funzioni cognitive risultano alterate, soprattutto in relazione alle prestazioni di apprendimento e memoria che coinvolgono processi di discriminazione ed elaborazione delle caratteristiche spaziali dell'ambiente. Nel complesso quindi, in accordo con i dati osservazionali nell'uomo, gli studi animali indicano che le regolazioni del comportamento motorio e delle funzioni attenzionali/cognitive complesse sono tra le più colpite dal precedente insulto. Questo insieme di effetti neurocomportamentali è in accordo con la compromissione di aree ippocampali, corticali e dei nuclei della base, che sono tipicamente riportati nei modelli animali, e che potrebbero verosimilmente verificarsi nel neonato con danno anossico da lieve a moderato-lieve, anche se in assenza di specifici quadri lesivi o di esiti neurologici gravi. Tali alterazioni "sottili" potrebbero concorrere alla genesi di quei disturbi del comportamento e delle funzioni attenzionali/cognitive che hanno una significativa incidenza in bambini con precedente insulto asfittico alla nascita. Inoltre, i difetti della trasmissione dopaminergica riportati negli animali con asfissia perinatale sono in accordo con l'ipotesi, avanzata sulla base di significative evidenze epidemiologiche [45], secondo la quale l'anossia alla nascita sarebbe tra i possibili fattori di rischio per il successivo insorgere di gravi patologie psichiatriche, quali la schizofrenia.

I modelli animali di encefalopatia ipossico/ischemica, pur con i limiti precedentemente discussi, si dimostrano rappresentativi di alcuni aspetti della situazione clinica. Va sottolineato che nei modelli animali i deficit riscontrati corrispondono piuttosto a un quadro clinico di alterazioni "minori", quali quelle che possono sfuggire alla diagnosi precoce nel neonato e nel bambino, ma che potrebbero essere responsabili di disabilità cognitive e alterazioni comportamentali più tardive. Alcuni dei contributi a questo stesso fascicolo (si vedano gli articoli di Vicari, Chiarotti *et al.*, Cioni *et al.*, Suppiej, Triulzi) sottolineano l'importanza della diagnosi precoce nel neonato asfittico, che consenta il più rapidamente possibile l'intervento terapeutico e/o riabilitativo per

limitare e/o prevenire il danno neuronale. Cioni *et al.* evidenziano l'importanza di indici di sviluppo neuro-motorio per una corretta previsione prognostica nei neonati con encefalopatia ipossico-ischemica. Tuttavia, nei modelli animali descritti in questa rassegna la valutazione delle alterazioni comportamentali nelle fasi immediatamente successive all'insulto è stata fino ad oggi tralasciata. Esperimenti in corso nel nostro laboratorio, utilizzando il modello di asfissia perinatale descritto da Boksa *et al.* [10], evidenziano alterazioni di pattern comportamentali neonatali per periodi di asfissia moderata/severa (15-20 min). In particolare, gli animali presentano un comportamento motorio alterato a 5 giorni di vita, emettono un numero maggiore di vocalizzazioni ultrasoniche in condizioni di isolamento (un indice precoce di alterazione delle risposte emozionali) e hanno latenze maggiori nel rispondere a stimoli familiari. Una caratterizzazione sistematica delle alterazioni motorie e comportamentali nella fase neonatale precoce anche nei modelli animali, sarebbe di indubbia rilevanza, soprattutto nella valutazione degli effetti di trattamenti farmacologici neuroprotettivi e/o preventivi, sull'efficacia dei quali i dati clinici sono ancora limitati e poco incoraggianti.

Ringraziamenti

Questo contributo è stato realizzato nell'ambito del progetto di ricerca finalizzata 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

- Berger R, Garnier Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Rev* 1999;30:107-34.
- Robertson CMT, Finer NN. Long-term follow-up of term neonates with perinatal asphyxia. *Clin Perinatal* 1993;20:483-99.
- Myers RE. Fetal asphyxia due to umbilical cord compression. *Biol Neonate* 1975;26:21-43.
- Myers RE, deCourten-Myers GM, Wagner KR. Effect of hypoxia on fetal brain. In: Beard RW, Nathanielz PW (Ed.). *Fetal Physiology and Medicine*. New York: Decker; 1984. p. 419-58.
- Myers RE, Beard R, Adamsons K. Brain swelling in the newborn rhesus monkey following prolonged partial asphyxia. *Neurology* 1969;19:1012-8.
- Brann AW, Myers RE. Central nervous system findings in the newborn monkey following severe in utero partial asphyxia. *Neurology* 1975;25:327-38.
- Berman D, Karalitzky AR, Berman AJ. Auditory thresholds in monkeys asphyxiated at birth. *Exp Neurol* 1971;31:140-9.
- Raju TNK. Some animal models for the study of perinatal asphyxia. *Biol Neonate* 1992;62:202-14.
- Ranck JB, Windle WF. Brain damage in the monkey, Macaca mulatta, by asphyxia neonatorum. *Exp Neurol* 1959;1:130-54.
- Boksa P, Krishnamurthy A, Brooks W. Effects of a period of asphyxia during birth on spatial learning in the rat. *Pediatr Res* 1995;37(4):489-96.
- Mirsky AF, Orren MM, Stanton L, Fullerton BC, Harris H, Myers RE. Auditory evoked potentials and auditory behavior following prenatal asphyxia in rhesus monkeys. *Dev Psychobiology* 1979; 12:369-79.
- Tan WKM, Williams CE, Gunn AJ, Mallard EC, Gluckman PD. Pretreatment with monosialoganglioside GM1 protects the brain of fetal sheep against hypoxic-ischemic injury without causing systemic compromise. *Pediatr Res* 1993;34:18-22.
- Tan WKM, Williams CE, Gunn AJ, Mallard EC, Gluckman PD. Suppression of postischemic epileptiform activity with MK-801 improves neural outcome in fetal sheep. *Ann Neurol* 1992;32:677-82.
- Rosenberg AA, Murdaugh E, White CW. The role of oxygen free radicals in postasphyxia cerebral hypoperfusion in newborn lambs. *Pediatr Res* 1989;26:215-9.
- Guan J, Bennet L, George S, Waldvogel HJ, Faull RLM, Gluckman PD et al. Selective neuroprotective effects with insulin-like growth factor-1 in phenotypic striatal neurons following ischemic brain injury in fetal sheep. *Neuroscience* 2000;95(3):831-9.
- Pourcyrous M, Leffler C, Busija D. Role of prostanoids in cerebrovascular responses to asphyxia and reventilation in newborn pigs. *Am J Physiol* 1990;259:H662-7.
- LeBlanc MH, Vig V, Smith B, Parker CC, Evans OB, Smith EE. MK-801 does not protect against hypoxic-ischemic brain injury in piglets. *Stroke* 1991;22(10):1270-5.
- McPhee AJ, Maxwell GM. The effect of theophylline on regional cerebral blood flow responses to hypoxia in newborn piglets. *Pediatr Res* 1987;21:573-8.
- Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 1960;36:1-17.
- Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 1981;9:131-41.
- Towfighi J, Yager JY, Housman C, Vannucci RC. Neuropathology of remote hypoxic-ischemic damage in the immature rat. *Acta Neuropathol* 1991;81:578-87.
- Hamada Y, Hayakawa T, Hattori H, Mikawa H. Inhibitor of nitric oxide synthesis reduces hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat. *Pediatr Res* 1994;35:10-4.
- Hayakawa T, Higuchi Y, Nigami H, Hattori H. Zonisamide reduces hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats irrespective of its anticonvulsant effect. *Eur J Pharmacol* 1994;257:131-6.
- Palmer C, Vannucci RC, Towfighi J. Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol. *Pediatr Res* 1990;27:332-6.
- Palmer C, Towfighi J, Roberts RL, Heitjan DF. Allopurinol administered after inducing hypoxia-ischemia reduces brain injury in 7-day-old rats. *Pediatr Res* 1993;33:405-11.

26. Hattori Y, Wasterlain CG. Posthypoxic glucose supplement reduces hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat. *Ann Neurol* 1990;28:122-8.
27. Schwarts PH, Massarweh WF, Vinters HV, Wasterlain CG. A rat model of severe hypoxic-ischemic brain injury. *Stroke* 1992; 23:539-46.
28. Gordon KE, Simpson JS, Statman D, Silverstein FS. Effects of perinatal stroke on striatal amino acid efflux in rats studied with *in vivo* microdialysis. *Stroke* 1991;22:928-32.
29. Ferriero DM, Sheldon RA, Black SM, Chuai J. Selective destruction of nitric oxide synthase neurons with quisqualate reduces damage after hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Pediatr Res* 1995;38:912-8.
30. Rumpel H, Buchli R, Gehrmann J, Aguzzi A, Illi O, Martin E. Magnetic resonance imaging of brain edema in the neonatal rat: a comparison of short and long term hypoxia-ischemia. *Pediatr Res* 1995;38:113-8.
31. Hagberg H, Gilland E, Bona E, Hanson LA, Hahn-Zoric M, Blennow M *et al*. Enhanced expression of interleukin (IL)-1 and IL-6 messenger RNA and bioactive protein after hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr Res* 1996;40(4):603-9.
32. Hagberg H, Bona E, Gilland E, Puka-Sundvall M. Hypoxia-ischemia model in the 7-day-old rat: possibilities and shortcomings. *Acta Pediatr Suppl* 1997;422:85-8.
33. Bona E, Johansson BB, Hagberg H. Sensorimotor function and neuropathology five to six weeks after hypoxia-ischemia in seven-day-old rats. *Pediatr Res* 1997;42(5):678-83.
34. Jansen EM, Low WC. Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. *Behav Brain Res* 1996;78:189-94.
35. Balduini W, De Angelis V, Mazzoni E, Cimino M. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res* 2000;859:318-25.
36. Dell'Anna ME, Calzolari S, Molinari M, Iuvone L, Calimici R. Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. *Behav Brain Res* 1991;45:125-34.
37. Iuvone L, Geloso MC, Dell'Anna E. Changes in open field behavior, spatial memory, and hippocampal parvalbumin immunoreactivity following enrichment in rats exposed to neonatal anoxia. *Exp Neurol* 1996;139:25-33.
38. Dell'Anna E, Iuvone L, Calzolari S, Geloso MC. Effect of acetyl-L-carnitine on hyperactivity and spatial memory deficits of rats exposed to neonatal anoxia. *Neurosci Lett* 1997;223:201-5.
39. Bjelke B, Andersson K, Ogren SO, Bolme P. Asphytic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine transmission. *Brain Res* 1991;543:1-9.
40. Loidl CF, Herrera-Marschitz M, Andersson K, You ZB, Goiny M, O'Connor *et al*. Long-term effects of perinatal asphyxia on basal ganglia neurotransmitter system studied with microdialysis in rat. *Neurosci Lett* 1994;175:9-12.
41. Chen Y, Ogren SO, Bjelke B, Bolme P, Eneroth P, Gross J *et al*. Nicotine treatment counteracts perinatal asphyxia-induced changes in the mesostriatal/limbic dopamine systems and in motor behaviour in the four-week-old male rat. *Neuroscience* 1995; 68(2):531-8.
42. Loidl CF, Gavilanes AWD, Van Dijk EHI, Vreuls W, Blockland A, Vles JSH *et al*. Effects of hypothermia and gender on survival and behavior after perinatal asphyxia in rats. *Physiol Behav* 2000; 68:263-9.
43. Kohlhauser C, Kaehler S, Mosgoeller W, Singewald N, Kouvelas D, Prast H *et al*. Histological changes and neurotransmitter levels three months following perinatal asphyxia in the rat. *Life Sci* 1999; 64(23):2109-24.
44. El-Khodori BF, Boksa P. Birth insult increases amphetamine-induced behavioral responses in the adult rat. *Neuroscience* 1998;87(4):893-904.
45. McNeil TF. Perinatal risk factors and schizophrenia: selective review and methodological concerns. *Epidemiol Rev* 1995;17:107-12.