

Prefazione

L'encefalopatia ipossico-ischemica è la più importante conseguenza dell'asfissia perinatale ed è una delle maggiori cause di morte neonatale e disabilità neurologica nel bambino. L'incidenza stimata è di circa 1-2/1000 nati a termine e fino al 60% nei neonati prematuri di peso inferiore a 1500 grammi. Una percentuale tra il 20 e il 50% dei neonati che sviluppano una encefalopatia ipossico-ischemica in seguito ad asfissia perinatale muore nel periodo neonatale, dei sopravvissuti circa il 25% presenta handicap neurologici maggiori (paralisi cerebrale, ritardo mentale, disturbi d'apprendimento, epilessia). I deficit neurologici maggiori compaiono tipicamente dopo breve tempo dall'evento asfittico, mentre eventi anossici moderati possono dar luogo, anche se in assenza di specifici quadri lesivi, ad alterazioni più sottili dello sviluppo cerebrale, che si rendono evidenti sul piano funzionale anche a distanza di anni. Dati epidemiologici recenti indicano infatti un'incidenza più elevata di disturbi attenzionali e cognitivi di varia natura e gravità in bambini in età scolare senza disabilità apparenti ma con un insulto anossico alla nascita.

A tutt'oggi, la gestione del neonato con insulto ipossico/ischemico nei reparti di terapia intensiva neonatale prevede principalmente misure di rianimazione primaria. Infatti, nonostante gli studi sperimentali degli ultimi anni abbiano contribuito a chiarire almeno in parte la complessa patogenesi del danno cerebrale ipossico/ischemico nel neonato, le strategie diagnostiche e di intervento nella fase acuta sono ancora insufficienti. Alcune terapie tuttora in fase sperimentale sembrerebbero avere un'efficacia neuroprotettiva, quali l'induzione dell'ipotermia, la somministrazione di antiinfiammatori non steroidei, antiossidanti, calcio-antagonisti, ma i dati clinici sono limitati e poco incoraggianti a tale proposito, probabilmente per la difficoltà di pianificare e condurre trial clinici anche per la complessità e la multifattorialità della sindrome post-asfittica nel neonato. La disponibilità di tecniche diagnostiche adattate alla particolare fisiologia del neonato, sarebbe di grande importanza sia per l'intervento precoce, sia per l'individuazione dei neonati a rischio di esiti a distanza, che seppur di minore gravità hanno un elevato impatto sanitario e sociale. Le funzioni attenzionali/cognitive sono infatti quelle più suscettibili ad appropriati interventi di recupero in fase prescolare e scolare e quindi l'individuazione di fattori di rischio neuropsicologico nei bambini senza disabilità maggiori deve rappresentare uno degli obiettivi principali per la gestione complessiva di questo importante problema sanitario.

Questa monografia raccoglie contributi di diversi gruppi clinici e sperimentali presentando un'analisi aggiornata di diversi aspetti della encefalopatia ipossico-ischemica nel neonato, con l'obiettivo di:

- illustrare lo stato dell'arte sulla patogenesi del danno cerebrale da ipossia/ischemia nel neonato;
- produrre un quadro aggiornato sulle strategie d'intervento attualmente in uso e sulle tecniche diagnostiche più avanzate per la valutazione del danno cerebrale nei neonati ad alto rischio;
- valutare il potenziale utilizzo di terapie ancora in fase sperimentale, e di marcatori fisiologici con valore diagnostico/prognostico, anche in riferimento a modelli animali;
- proporre ai clinici impegnati in questo settore la possibile utilizzazione di indici comportamentali precoci di rischio, particolarmente importanti per la prevenzione e l'intervento nel caso di deficit neurocomportamentali a più tardiva comparsa.

Ringraziamo tutti gli autori che con il loro impegno hanno reso possibile la realizzazione di questo fascicolo.

Gemma Calamandrei (a), Flavia Chiarotti (a) e Marcello Orzalesi (b)

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

(b) *Divisione di Terapia Intensiva Neonatale, Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù", Roma*

Encefalopatia ipossico-ischemica nel neonato

Carla OTTAVIANO, Chiara De MARCHIS e Marcello ORZALESI

Divisione di Terapia Intensiva Neonatale, Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù", Roma

Riassunto. - L'encefalopatia ipossico-ischemica è una delle maggiori cause di morte neonatale e disabilità neurologica nel bambino. L'incidenza stimata è di circa 1-2/1000 nati a termine e fino al 60% nei neonati prematuri di peso inferiore a 1500 grammi. Pur non potendo distinguere lesioni anatomico-patologiche esclusive del neonato a termine o pretermine, è noto che nel primo prevale l'interessamento della sostanza grigia cerebrale mentre nel secondo quello della sostanza bianca. Nei neonati più immaturi spesso il quadro è complicato dalla concomitante emorragia peri-intraventricolare. Tra i fattori che determinano la differente topografia del danno cerebrale ipossico-ischemico perinatale ricordiamo: l'intrinseca vulnerabilità di alcune cellule o regioni, fattori vascolari, natura e durata dell'insulto, età e maturità del neonato.

Parole chiave: asfissia perinatale, neonato pretermine, danno cerebrale, leucomalacia periventricolare, emorragia intraventricolare.

Summary (*Hypoxic-ischaemic encephalopathy in the newborn*). - Cerebral hypoxia-ischaemia occurring in the fetus and newborn is a major cause of acute mortality and chronic neurologic disability in survivors. Statistics suggest an incidence of systemic asphyxia in 1-2/1000 full-term infants and an incidence that approaches 60% in very low birth-weight newborns. Although the neuropathological features are not exclusively characteristic of full-term or preterm babies, it is well known that the gray matter is predominantly involved in the term baby while the white matter is damaged in the preterm newborn. In the premature infant encephalopathy is often accompanied by peri-intraventricular haemorrhage. The different distribution of neuropathologic lesions arising from perinatal hypoxia-ischaemia depend on several factors such as intrinsic cellular and regional vulnerability, vascular factors, nature and duration of the insult, age and maturity of the infant.

Key words: perinatal asphyxia, preterm newborn, cerebral damage, periventricular leukomalacia, intraventricular haemorrhage.

Definizione

Il termine ipossia (anossia) denota una parziale (o totale) carenza di ossigeno in uno o più tessuti del corpo incluso il sangue (ipossiemia, anossiemia). Il termine asfissia indica la condizione in cui gli scambi gassosi polmonari o placentari sono alterati conducendo progressivamente a ipossiemia e ipercapnia e successivamente bradicardia e ipotensione (asfissia: letteralmente mancanza di polso, di pressione sanguigna). L'ipossia moderata-severa è seguita da acidosi metabolica per accumulo di acido lattico derivante dal metabolismo anaerobio, mentre l'asfissia è generalmente associata con acidosi sia metabolica che respiratoria. L'ischemia è la riduzione o l'interruzione del flusso ematico conseguente a ipotensione o occlusione vasale. Nel feto o nel neonato l'ischemia è determinata o da precedenti ipossia-acidosi con effetto deprimente sul sistema cardiovascolare o da occlusione vascolare. Pertanto, nel neonato asfittico, l'ipossia e l'ischemia cerebrale vanno di pari passo e si parla in genere di danno ipossico-ischemico.

Introduzione

L'encefalopatia ipossico-ischemica è una delle maggiori cause di morte neonatale e disabilità neurologica nel bambino. L'incidenza stimata è di circa 1-2/1000 nati a termine [1, 2] e fino al 60% nei neonati prematuri di peso inferiore a 1500 grammi [3]. Una percentuale tra il 20 e il 50% dei neonati asfittici che sviluppano una encefalopatia ipossico-ischemica muoiono nel periodo neonatale, dei sopravvissuti circa il 25% presenta handicap neurologici maggiori (paralisi cerebrale, ritardo mentale, disturbi d'apprendimento, epilessia).

In generale le lesioni anatomico-patologiche (e i conseguenti esiti a distanza) sono differenti nel neonato a termine rispetto al pretermine. Nel primo prevale l'interessamento della sostanza grigia cerebrale (corteccia cerebrale, ippocampo, gangli della base, emisferi cerebellari), nel secondo è interessata prevalentemente la sostanza bianca. I fattori che determinano la differente topografia del danno cerebrale ipossico-ischemico perinatale sono di vario tipo:

intrinseca vulnerabilità cellulare o regionale, fattori vascolari, natura e durata dell'insulto, età e maturità del neonato, fattori contingenti come ipoglicemia, sepsi o malnutrizione.

In questa sede verranno schematicamente divise le lesioni in base alla loro maggiore frequenza nel neonato a termine o nel pretermine, ma, come sarà più volte sottolineato, si tratta di una divisione puramente didattica in quanto non solo non esistono quadri esclusivi di uno o dell'altro tipo, ma spesso si ha la coesistenza di varie lesioni.

Encefalopatia ipossico-ischemica nel neonato a termine

Le principali lesioni anatomico-patologiche nel neonato sono: necrosi neuronale selettiva, danno cerebrale parasagittale, necrosi cerebrale ischemica focale e multifocale e leucomalacia periventricolare. Queste lesioni verranno discusse separatamente benché normalmente non si verificano isolatamente.

Neuropatologia

Necrosi neuronale selettiva. - La necrosi neuronale selettiva è la lesione più comunemente osservata nell'encefalopatia ipossico-ischemica del neonato, anche quando non rappresenta la lesione preponderante nel quadro anatomico-patologico. Come espresso dal termine stesso, è il neurone la sede principale del danno. I primi cambiamenti sono delle vacuolazioni determinate dal rigonfiamento dei mitocondri che si notano tra i 5 e i 30 minuti dall'inizio dell'ipossia [4]. Nelle successive 24-48 ore subentrano alterazioni del reticolo endoplasmatico e del nucleo con picnosi o carioressi [5]. Nei 3-5 giorni seguenti si assiste al presentarsi di chiari segni di necrosi e si instaura un'astrocitosi. Nelle settimane successive i macrofagi spugnosi eliminano i detriti necrotici e si forma una matrice gliale. Lesioni molto gravi possono esitare in cavitazioni, specie nella corteccia cerebrale.

La topografia del danno neuronale dipende per lo più dalla severità e durata dell'insulto e dall'età gestazionale del neonato. Si possono distinguere 4 pattern principali:

1) *Danno diffuso:* si verifica per insulti severi e molto prolungati in neonati sia a termine che pretermine anche se per lo più in sedi diverse. I neuroni della corteccia cerebrale sono particolarmente vulnerabili, in particolare le cellule piramidali dell'ippocampo. Nel neonato a termine è l'area di Sommer la più delicata, nel pretermine il subicolo. Con insulti più gravi, nel neonato a termine, vengono poi compromessi i neuroni della corteccia visiva e peri-rolandica, fino a un interessamento diffuso della corteccia. I neuroni degli strati corticali più profondi ed in particolare della profondità dei solchi sono i più danneggiati. Questa topografia riflette probabilmente la

suscettibilità delle zone di confine vascolare. Per quanto riguarda le strutture nucleari profonde il talamo è coinvolto con uguale frequenza nel neonato a termine e nel pretermine e spesso lo è insieme ai nuclei della base, mentre i neuroni della testa del nucleo caudato e del putamen sono colpiti più frequentemente nel neonato a termine, laddove nel pretermine prevale l'interessamento del globo pallido. La combinazione di danno nel putamen e nel caudato è una tipica lesione asfittica del neonato, specialmente a termine. Caratteristico dell'encefalopatia ipossico-ischemica neonatale è il coinvolgimento del tronco-encefalo [6]. Nel neonato a termine la lesione sembra limitarsi ai neuroni, nel pretermine il danno può essere tanto grave da esitare in necrosi cistica. Nel mesencefalo particolarmente vulnerabile è il collicolo inferiore, nel ponte i nuclei motori del V e VII paio di nervi cranici, la formazione reticolare, i nuclei cocleari dorsali. Nel midollo allungato i nuclei dorsali del nervo vago, il nucleo ambiguo (IX e X paio di nervi cranici), nucleo olivare inferiore, gracile e cuneato. Nel pretermine è stata recentemente descritta l'associazione tra danno neuronale cerebellare e perdita neuronale nel nucleo olivare inferiore, forse per degenerazione retrograda transinaptica. Il cervelletto è particolarmente vulnerabile, in particolare nel neonato a termine le cellule del Purkinje e nel pretermine i neuroni dei granuli cellulari interni. Anche i neuroni del nucleo dentato sono più suscettibili che in altre età. Nel midollo spinale possono essere interessate le cellule delle corna anteriori con manifestazioni cliniche di ipotonia e debolezza fino a configurare i quadri della cosiddetta paralisi cerebrale atonica [7].

2) *Danno alla corteccia cerebrale e ai nuclei della base:* si verifica per insulti moderati-severi, gradualmente e prolungati, principalmente in neonati a termine. Interessa prevalentemente la neocortex, in particolare l'area parasagittale peri-rolandica e l'ippocampo, il putamen ed il talamo. Studi condotti con risonanza magnetica nucleare suggeriscono che questo sia il quadro predominante in circa il 35-65% dei neonati a termine asfittici [8].

3) *Danno ai nuclei della base e al tronco encefalico:* si verifica per insulti severi ed acuti principalmente in neonati a termine. Benché i neuroni dei nuclei della base ed il talamo siano coinvolti nei 2/3 dei neonati a termine asfittici, in circa il 15-20% il coinvolgimento dei nuclei della base, del talamo e del tronco-encefalo è predominante [9]. Una parte di questi casi con coinvolgimento massiccio della sostanza grigia profonda evolve nel cosiddetto stato marmorato, un disordine dei nuclei della base e del talamo che nonostante sia legato ad un insulto perinatale non si rende evidente fin verso la fine del primo anno di vita. Le alterazioni principali sono: perdita neuronale, gliosi e ipermielinizzazione. La ipermielinizzazione, che non è stata descritta prima degli 8 mesi, è la caratteristica distintiva di questa lesione cui conferisce il tipico aspetto "marmoreo". Un tempo si

pensava che le fibre abnormemente mielinizzate fossero assioni, con l'avvento della microscopia elettronica si è visto che, almeno in parte, si tratta di astrociti. Sembra dunque che l'encefalo molto giovane, al tempo in cui sta fisiologicamente mielinizzando alcune sue strutture, sia in grado di mielinizzare anche fibre non assoniche. Questo tipo di risposta sembra dipendere sia dal *timing* dell'insulto sia dalla topografia della lesione. Resta comunque sconosciuta la percentuale di neonati asfittici che sviluppano questa lesione e quali siano i fattori che determinano l'evoluzione verso gliosi e atrofia piuttosto che verso lo stato marmorato. E' stato ipotizzato che un insulto così grave da determinare la perdita sia dei neuroni che degli oligodendrociti possa solo evolvere in atrofia e gliosi senza possibilità di "ipermielinizzazione".

4) *Danno pontosubicolare*: tra i vari tipi di necrosi neuronale selettiva è il meno comune; si verifica per lo più nei neonati prematuri con un *timing* ancora da definire e riguarda prevalentemente la base del ponte e il subicolo dell'ippocampo; spesso si associa a leucomalacia periventricolare.

Danno cerebrale parasagittale. - E' una lesione tipica del neonato a termine caratterizzata da necrosi della corteccia cerebrale e della sostanza bianca sottocorticale immediatamente adiacente, con una caratteristica distribuzione "parasagittale", per lo più bilaterale e spesso simmetrica. A volte la necrosi può essere emorragica e nei casi più gravi estendersi nella corteccia cerebrale parieto-occipitale, esitando in atrofia.

Leucomalacia periventricolare. - Essendo una lesione più frequente nel neonato pretermine sarà trattata estesamente in seguito (vedi oltre).

Necrosi focale e multifocale. - Si tratta di una o multiple aree di necrosi localizzate nel territorio di distribuzione di una o più arterie cerebrali maggiori. Non sempre è facile distinguerle da lesioni determinate da una generale diminuzione del flusso ematico cerebrale (necrosi parasagittale, leucomalacia periventricolare) e spesso sembrano coesistere. Da studi anatomo-patologici è emerso che l'incidenza è del 5% tra le 28-32 settimane di età gestazionale, 10% tra le 32-37 settimane, 15% tra le 37 e le 40 settimane. In circa il 50% dei casi è coinvolta l'arteria cerebrale media, nei restanti casi sono interessati multipli piccoli vasi. Negli studi *in vivo* questa lesione si riscontra nel 20% dei neonati asfittici. In circa il 90% dei casi la lesione è unilaterale e tra le lesioni unilaterali pressoché tutte riguardano l'arteria cerebrale media. Di tutti i casi che coinvolgono l'arteria cerebrale media unilaterale il 75% riguarda la sinistra [10, 11].

Da un punto di vista microscopico si tratta di una necrosi di elementi cellulari con distribuzione tipicamente arteriosa, che compare tra le 18 e le 23 ore dopo l'insulto; poco dopo cellule monocito-

macrofagiche migrano dai vasi nella lesione e nel giro di 36-48 ore divengono macrofagi spugnosi. Dopo 3-5 giorni si ha iperplasia e ipertrofia degli astrociti che nell'arco di settimane o mesi formano un denso intreccio di fibrille. Frequente è l'esito in cavità cistiche.

Patogenesi

La condizione clinica in cui si verifica l'encefalopatia ipossico-ischemica è l'ischemia che in genere, ma non necessariamente è preceduta o accompagnata da ipossiemia. L'ipossiemia danneggia il sistema nervoso centrale principalmente causando disfunzione miocardica e perdita di autoregolazione del flusso ematico cerebrale, con conseguente ischemia. Il *timing* e la gravità dell'ipossia e dell'ischemia, nonché l'età gestazionale del neonato sono i principali determinanti della neuropatologia della lesione.

Le cause principali di grave ipossiemia nel periodo perinatale sono: asfissia, distress respiratorio, shunt destro-sinistro. Le cause principali di ischemia: grave ipossia di qualunque origine, asfissia intrauterina con acidosi e perdita della regolazione del flusso ematico cerebrale, insufficienza cardiocircolatoria.

I fattori che determinano la topografia del danno cerebrale ipossico-ischemico perinatale sono di vario tipo: 1) esiste una intrinseca vulnerabilità sia cellulare (neuroni > oligodendroglia > astrociti > microglia > vasi) che regionale (corteccia: strati 3, 5, 6; ippocampo, sostanza bianca: subcorticale e periventricolare; troncoencefalo: collicolo inferiore; cervelletto: strato cellulare di Purkinje); 2) fattori vascolari: nell'ipossia-ischemia sistemica le lesioni si localizzano nei territori di confine tra distretti vascolari, nell'occlusione vasale la lesione è localizzata a valle dell'ostruzione; 3) natura e durata dell'insulto: ipossia, ipossia-ischemia, ischemia; 4) età e maturità del neonato; 5) fattori contingenti: ipoglicemia, sepsi, malnutrizione.

Le ragioni della vulnerabilità di certi gruppi di neuroni nel sistema nervoso centrale sono diventate più chiare negli ultimi anni. Sicuramente fattori vascolari giocano un ruolo importante. Il danno neuronale è infatti più grave nella zone di confine tra distretti vascolari (ad esempio nella profondità dei solchi e nelle aree parasagittali); d'altra parte la stretta relazione che esiste tra la necrosi ponto-subicolare del prematuro e l'ipocapnia e l'iperossia sembra suggerire un ruolo importante della vasocostrizione in questa specifica lesione [12, 13]. Tuttavia la constatazione che il danno neuronale più selettivo non segua strettamente la distribuzione vascolare fa ritenere che siano in gioco altri fattori. Ad esempio la rapida maturazione e differenziazione dei neuroni nel ponte e nel subicolo al momento in cui si verifica l'insulto può rendere ragione della loro maggiore richiesta di energia, e della conseguente propensione verso l'apoptosi.

Per quanto riguarda le diverse suscettibilità regionali è possibile che siano legate a differenze metaboliche: capacità di glicolisi anaerobia, richieste energetiche, accumulo di lattato, funzione mitocondriale, flusso di calcio, sintesi di ossido nitrico, formazione di radicali liberi e capacità di neutralizzare gli stessi. Ad esempio le alte richieste energetiche della sostanza grigia profonda possono rendere ragione del perché queste zone siano particolarmente a rischio in caso di insulto ischemico improvviso e grave. Un ruolo hanno senz'altro anche le differenze recettoriali, in particolare per quanto riguarda i recettori del glutammato. Le zone che al momento dell'insulto ipossico-ischemico sono particolarmente ricche di sinapsi che usano come neurotrasmettitore il glutammato sono le più danneggiate, così come avviene, ad esempio, nel periodo perinatale per i gangli della base [14].

Esempi tipici di fattori vascolari come determinanti la topografia del danno sono offerti dalla leucomalacia periventricolare (vedi patogenesi oltre) e dal danno cerebrale in sede parasagittale che rappresenta la zona di confine tra i territori di irrorazione delle arterie cerebrali maggiori, e quindi la più suscettibile ai cali di flusso cerebrale, specialmente in sede posteriore.

L'occlusione vascolare e necrosi a valle è il meccanismo patogenetico principale nella necrosi ischemica focale e multifocale. Quale sia la causa che determina l'insufficiente o assente flusso in una arteria cerebrale maggiore rimane sconosciuto in circa il 50% dei casi, il 35% dei casi viene attribuito all'asfissia, nel rimanente 15% sono state trovate anomalie di sviluppo vascolare, vasculopatie, alterazioni della coagulazione, vasospasmo, distorsione vasale da trauma sul capo o sul collo, embolia e trombosi.

Diagnosi

Clinica. - Condizioni essenziali per la diagnosi di sofferenza perinatale sono: anamnesi positiva per sofferenza fetale (decelerazioni tardive al cardiogramma, liquido amniotico tinto di meconio, acidosi metabolica con $\text{pH} < 7,1$ e/o $\text{EB} \leq 10 \text{ mEq/l}$ nelle prime 2 ore di vita) depressione alla nascita con necessità di rianimazione, e sintomi neurologici precoci.

Il quadro clinico di un neonato che ha sofferto di ipossia-ischemia dipende dal *timing*, dalla severità e dalla durata dell'insulto e può variare dalla completa normalità fino alla presenza di segni e sintomi nell'immediato *post partum*. La sintomatologia neurologica del neonato a termine asfittico è stata classificata da Sarnat e Sarnat [15] in 3 stadi progressivi di gravità: asfissia lieve (iperecettibilità, veglia protratta, riflessi vivaci, tono normale o aumentato, midriasi, tachicardia), moderata (apatia, riflessi vivaci, ipotonia, convulsioni, miosi, bradicardia), grave (coma, riduzione o assenza di riflessi, flaccidità, raramente convulsioni, variabilità della

dilatazione pupillare, variabilità della frequenza cardiaca).

La stadiazione clinica alla nascita o subito dopo è fondamentale per determinare la severità del danno ipossico-ischemico, per iniziare il trattamento più appropriato e per stabilire la prognosi. Anche l'evoluzione, con il passaggio da uno stadio all'altro è un importante indice prognostico [16, 17].

A volte i neonati appaiono relativamente normali nelle prime ore di vita per poi peggiorare rapidamente quando insorgono le crisi convulsive, altre volte sono in uno stadio 2 o 3 subito dopo la nascita. L'attività convulsiva compare nel 50-70% dei neonati asfittici, specialmente a termine, e nella maggior parte dei casi nelle prime 24 ore con un esordio tanto più precoce quanto più è grave l'asfissia. Quelli che sopravvivono mostrano un miglioramento nei giorni o nelle settimane seguenti, il tempo impiegato per il recupero delle normali funzioni neurologiche è anch'esso un fattore prognostico a lungo termine.

Oltre alle disfunzioni neurologiche, in circa il 50% dei casi l'asfissia determina alterazioni multi-organo riguardanti il rene, il cuore, i polmoni, l'intestino, con conseguenti alterazioni metaboliche quali ipoglicemia, ipocalcemia, alterazioni idro-elettrolitiche, iperammionemia, che contribuiscono ad aggravare le condizioni di un sistema nervoso già compromesso.

Strumentale. - *EEG:* nel grado 1 della classificazione di Sarnat e Sarnat l'EEG è normale sia nella veglia che nel sonno attivo e calmo, il ciclo del sonno è presente mentre la durata degli stati è alterata. Nel grado 2 il tracciato è di basso voltaggio, caratterizzato da ritmi con frequenza variabile dalla banda delta alla beta, a volte è del tipo "basso voltaggio più grafoelementi patologici", il ciclo del sonno è presente ma spesso alterato, frequenti le crisi elettrocliniche. Nel grado 3 il tracciato è prevalentemente inattivo o parossistico, il ciclo del sonno è assente e sono presenti crisi con dissociazione elettroclinica. Per quanto riguarda la prognosi questa è favorevole per il grado 1, gravissima per il grado 3 in cui le caratteristiche del tracciato riflettono una necrosi neuronale corticale diffusa, mentre per il grado 2 è favorevole se i segni clinici ed EEG tornano nella norma entro 5-7 giorni [18].

Una forma semplificata di elettroencefalogramma, con soli 2 canali, può essere ottenuta in continuo con il *cerebral function monitor*. Nonostante questa tecnica possa rilevare solamente le alterazioni maggiori dell'attività elettrica cerebrale (tracciato piatto, di basso voltaggio, *burst suppression*, crisi convulsive), senza possibilità di studiare le varie zone cerebrali, offre l'incommensurabile vantaggio di poter essere eseguita nell'arco delle 24 ore e di rilevare quindi in tempo reale non solo eventuali cambiamenti dell'attività elettrica ma anche il controllo della terapia sulle crisi elettriche o in neonati curarizzati.

Neuroimmagini: l'ecografia transfontanellare è molto utile nell'individuare le lesioni dei gangli della base, del talamo, la leucomalacia periventricolare, e danni ischemici focali e multifocali, ma non è in grado di rilevare lesioni corticali o del tronco encefalo in quanto spesso molto piccole o comunque troppo periferiche. D'altro canto la TAC, che pur non essendo eseguibile al letto del paziente, richiede comunque dei tempi relativamente brevi per l'acquisizione delle immagini, fornisce importanti informazioni anche riguardo il danno corticale nella necrosi neuronale selettiva, ma il suo valore è massimo diverse settimane dopo l'insulto.

L'indagine sicuramente più accurata per dovizia di particolari, e più precoce nello stabilire l'entità del danno è la risonanza magnetica nucleare sia tradizionale ma soprattutto con le nuove applicazioni in spettroscopia e diffusione. Queste nuove applicazioni infatti non solo consentono una maggiore sensibilità nell'individuazione del danno ma permettono di anticipare l'indagine alle prime ore di vita consentendo di formulare una prognosi tanto accurata quanto precoce. La risonanza magnetica in spettroscopia ($^1\text{H-MRS}$) è stata utilizzata per studiare i cambiamenti biochimici associati con il danno cerebrale. In particolare la $^1\text{H-MRS}$ può rilevare metaboliti quali: N-acetilaspargato (NAA) che rappresenta essenzialmente un marker neuronale; creatina (Cr) e fosfocreatina che sono marker energetici; Colina (Cho) che viene rilasciata a seguito di un danneggiamento delle membrane e lattato (Lac) che si accumula in risposta a metabolismo anaerobico [19, 20].

Prognosi

L'*outcome* di neonati con grave sofferenza perinatale è tuttora uno dei più difficili interrogativi con cui si confronta il neonatologo; sono stati studiati pertanto sia singolarmente che associati il valore prognostico di: indice di Apgar, emogasanalisi entro le prime 2 ore di vita, decorso clinico, esame neurologico, elettroencefalogramma, potenziali evocati, neuroimmagini, determinazione del flusso ematico cerebrale, monitoraggio della pressione intracranica. In questa sede ci occuperemo essenzialmente dell'andamento clinico e delle principali indagini strumentali.

Alcuni aspetti della sindrome neurologica neonatale sono particolarmente utili per formulare una prognosi: la gravità della sintomatologia, la presenza e il tempo di insorgenza delle convulsioni, la durata delle anomalie neurologiche.

Neonati con sindrome neurologica lieve hanno in genere un recupero completo, quelli con la forma grave o muoiono (80%) o presentano deficit (20%). Pur non essendo chiaro se le convulsioni di per sé aggravino il danno cerebrale o siano l'espressione di una maggiore compromissione, quando si verificano il rischio di

sequele aumenta di 2-5 volte, tanto più quanto più precoce è l'insorgenza. Per quanto concerne la durata dei sintomi è esperienza comune che il neonato che presenta una sindrome neurologica che dura meno di 1-2 settimane ha ottime probabilità di avere uno sviluppo normale nei primi anni di vita, anche se poco è noto riguardo alla performance in età scolare [21, 22].

Oltre al quadro clinico molte informazioni utili per formulare la prognosi possono essere date dalle indagini strumentali: il tipo di tracciato elettroencefalografico e le sue modifiche nel corso dei giorni, come già citato sopra, sono uno strumento di grande valore considerato anche la facilità di esecuzione al letto del paziente. Per quanto riguarda le neuroimmagini sicuramente l'ecografia cerebrale è la tecnica più utilizzata soprattutto per la possibilità di esecuzione al letto del paziente, rapidità, basso costo e innocuità, anche se non è sicuramente la tecnica appropriata per lo studio di quelle zone che frequentemente sono danneggiate nel neonato a termine quali la corteccia cerebrale o il tronco encefalo. Sicuramente più precise sono la TC e la RMN, in particolare quest'ultima, anche se richiede tempi più lunghi di esecuzione, offre senz'altro le neuroimmagini più affidabili e con le nuove applicazioni in spettroscopia e in diffusione mostra sin dalle prime ore di vita un quadro fedele di quello che è il danno e aiuta nel formulare la prognosi a distanza.

Alcuni studi hanno dimostrato una diminuzione del rapporto NAA/Cho e NAA/Cr e un aumento del rapporto Cho/Cr in neonati asfittici con gravi deficit dello sviluppo all'età di 1 anno. Inoltre sono stati dimostrati un aumento del lattato e una diminuzione del NAA nel talamo e un aumento del lattato e una riduzione della Cr nei gangli della base dei neonati asfittici [19, 20].

Encefalopatia ipossico-ischemica nel neonato pretermine

Il danno cerebrale ipossico-ischemico nel pretermine differisce da quello del neonato a termine da un punto di vista neuropatologico e fisiopatologico in relazione al differente grado di maturazione sia del tessuto cerebrale che del letto vascolare. Nel pretermine le lesioni cerebrali predominanti sono: 1) l'emorragia della zona germinativa, 2) l'emorragia intraventricolare, 3) l'emorragia parenchimale, 4) la leucomalacia periventricolare.

Nei neonati prematuri una zona di confine tra letti vascolari è localizzata nella sostanza bianca periventricolare adiacente ai margini esterni dei ventricoli laterali. Queste zone sono situate tra 3 e 10 mm dalla parete del ventricolo laterale tra i rami terminali delle arterie "centrifughe" che partono dal plesso corioideo e le arterie "centripete" che originano sulla superficie dell'encefalo. Il numero dei vasi centrifughi cresce con l'età gestazionale, la loro relativa esiguità

nel neonato pretermine rende ragione della vulnerabilità di questa zona al danno ischemico. La relativa salvaguardia della corteccia cerebrale nel prematuro potrebbe essere dovuta alla presenza di una ricca rete di anastomosi tra le arterie meningee e le cerebrali anteriore, media e posteriore. Queste anastomosi, particolarmente prominenti nel pretermine, tendono a diminuire con l'età gestazionale fino a una pressoché completa scomparsa a termine di gravidanza.

Neuropatologia

La matrice germinativa è un'area gelatinosa localizzata nella zona periventricolare tra il nucleo caudato e il talamo a livello del forame di Monro o appena posteriormente a questo. È formata da una ricca rete di vasi le cui pareti sono composte da un singolo strato endoteliale, senza cellule muscolari lisce, elastina o collagene. Queste cellule endoteliali contengono un gran numero di mitocondri e hanno un metabolismo ossidativo particolarmente attivo. All'interno della matrice sono contenute cellule precursori dei neuroni e della glia. Benché i neuroni siano già migrati prima della ventiseiesima settimana, la matrice germinativa continua ad essere una struttura prominente fino alla trentaquattresima settimana di gestazione e cellule gliali primitive possono essere riscontrate nella matrice fino quasi a termine. La sua irrorazione arteriosa è garantita dalla arteria di Heubner (ramo della cerebrale anteriore), dalle arterie striate laterali (rami della cerebrale media) e dall'arteria corioidea anteriore (ramo della carotide interna). Il sangue venoso viene drenato nella vena di Galeno.

Emorragia subependimale. - Il sanguinamento nelle emorragie intraventricolari generalmente comincia dalla rete capillare della matrice germinativa subependimale, benché nel neonato a termine e in circa il 10% dei neonati pretermine possa originare dal plesso corioideo. Il sito dell'emorragia nella matrice germinativa tende a variare con l'età gestazionale. In neonati con età gestazionale inferiore alle 28 settimane il sanguinamento avviene nella zona sopra il corpo del nucleo caudato, in neonati più maturi il sito principale è a livello della testa del nucleo caudato, vicino al forame di Monro. Studi su animali hanno dimostrato un parallelo andamento caudo-craniale della quantità di flusso ematico, delle richieste metaboliche e dell'involuzione della matrice germinativa che possono giustificare la diversa topografia delle lesioni alle varie età gestazionali [24].

L'esito neuropatologico di una emorragia isolata della matrice germinativa è una lesione cistica. Benché sia lecito supporre che la distruzione delle cellule gliali prima della loro migrazione possa alterare la normale citoarchitettura cerebrale, ad oggi non è possibile attribuire sequele cliniche a lungo termine a questo tipo di lesione.

Emorragia intraventricolare. - L'emorragia intraventricolare si verifica quando il sangue accumulatosi nell'emorragia della matrice germinativa irrompe nel ventricolo laterale attraverso l'ependima. Il sangue stravasato si spande nel sistema ventricolare, innesca una aracnoidite e se l'emorragia è massiva può formare grossi coaguli all'interno dei ventricoli.

La dilatazione acuta del sistema ventricolare è una complicazione relativamente frequente (circa il 50% dei neonati che sopravvivono), ma la nella maggior parte dei casi si risolve spontaneamente o rimane stabile. La causa di questa dilatazione è da ricercare nella compromissione del riassorbimento del liquor secondario ad un "intasamento" dei villi aracnoidei da parte di materiale corpuscolato del sangue o da veri e propri coaguli [25].

La conseguenza più importante dell'emorragia intraventricolare è l'idrocefalo post-emorragico che si verifica in circa il 25% dei casi. L'idrocefalo può essere comunicante o non comunicante. Nel secondo tipo l'ostruzione dell'acquedotto di Silvio, del forame di Monro o dei forami di Luschka e Magendie da parte di coaguli impedisce la circolazione del liquor. In questi casi la dilatazione ventricolare è generalmente rapida e l'idrocefalo è clinicamente evidente in circa 2 settimane dall'emorragia. L'idrocefalo comunicante può essere secondario ad una aracnoidite obliterativa nella fossa cranica posteriore, o ad un impedimento al riassorbimento del liquor ovunque nel sistema liquorale ad opera di coaguli o materiale corpuscolato derivato dal sanguinamento. Il decorso clinico è per lo più lento e un vero e proprio idrocefalo può non rendersi clinicamente evidente fino a diverse settimane dopo l'emorragia.

Emorragia parenchimale. - È un sanguinamento che coinvolge anche la sostanza bianca periventricolare e che esita in cisti poroencefalica. Benché si verifichi solo nel 10-15% dei neonati con emorragia è una causa importante di sequele a lungo termine.

L'esatta natura dell'emorragia parenchimale non è nota tuttavia sono ipotizzabili almeno due meccanismi. Molti studi di anatomia patologica hanno dimostrato che la causa più comune è un infarcimento emorragico probabilmente determinato dall'aumento della pressione venosa nella sostanza bianca periventricolare, secondario all'ostruzione al deflusso venoso nelle vene che attraversano la matrice germinativa derivante dall'ematoma subependimale. Anche l'emorragia intraventricolare può avere un ruolo sia ostacolando l'afflusso di sangue alla sostanza bianca periventricolare, rendendola così più vulnerabile, sia mediante il rilascio di mediatori vasoattivi [26].

Qualunque sia la patogenesi, è ormai noto che l'emorragia parenchimale periventricolare non è una semplice estensione dell'emorragia subependimale o intraventricolare quanto piuttosto una diretta conseguenza.

Leucomalacia periventricolare. - La leucomalacia periventricolare è una lesione ischemica che porta alla formazione di aree di necrosi nella sostanza bianca periventricolare. Si può presentare in forma focale o diffusa. Nel primo caso sono coinvolte prevalentemente le regioni adiacenti agli angoli esterni dei ventricoli laterali e la lesione inizia come aree focali di necrosi coagulativa seguite da proliferazione di astrociti e macrofagi e formazione di aree gliotiche o cistiche. Nei casi più gravi le aree cistiche diventano particolarmente evidenti. Nel secondo caso la sostanza bianca è diffusamente ma meno gravemente danneggiata, e tende ad assottigliarsi con secondario ampliamento dei ventricoli laterali, senza esitare in cisti. Poiché l'area coinvolta comprende la sostanza bianca attraverso cui passano le vie discendenti dalla corteccia motoria, ed essendo le vie motorie per gli arti inferiori le più vicine ai ventricoli laterali, ne consegue che l'esito neuromotorio più frequente è la diplegia spastica. Tanto più la lesione è estesa in senso laterale, tanto più sarà frequente il coinvolgimento anche degli arti superiori, configurando il quadro della quadriplegia spastica. Un'altra possibile conseguenza sono i deficit visivi per interessamento delle radiazioni ottiche.

L'incidenza della leucomalacia periventricolare non è nota. Anche se una percentuale variabile tra il 25 e il 75% dei neonati con peso molto basso alla nascita (VLBW) che muoiono hanno lesioni leucomalaciche riscontrate al tavolo autoptico, l'incidenza tra i sopravvissuti, stimata tra il 5 e 10%, non è certa. Infatti studi comparativi tra ecografie cerebrali transfontanelari e autopsie hanno dimostrato che solo il 30-40% delle lesioni leucomalaciche sono diagnosticate prima del decesso [27, 28]. Le tecniche ultrasonografiche attuali pertanto non sono sufficientemente sensibili per identificare tutti i bambini con leucomalacia periventricolare ed in effetti sono in grado di rilevare solo le lesioni più gravi. Pur tuttavia è chiaro che la lesione si riscontra prevalentemente nei neonati: 1) prematuri; 2) sopravvissuti più di qualche giorno; 3) con emorragia intraventricolare; 4) affetti da distress respiratorio; 5) con anamnesi ostetrica positiva per infezioni materne-placentari-fetali. Il caratteristico reperto ultrasonografico è rappresentato da ecodensità lineari adiacenti agli angoli esterni dei ventricoli laterali che dopo diverse settimane evolvono in areole cistiche che possono poi scomparire e lasciare il posto alla dilatazione ventricolare.

Diversamente dall'emorragia peri-intraventricolare la leucomalacia periventricolare spesso si manifesta dopo la prima settimana di vita. Poiché non esiste un *timing* ottimale per poterla rilevare è comunque raccomandato che neonati VLBW eseguano un'ecografia cerebrale in prossimità della dimissione e se presentano lesioni cistiche o aumento di volume dei ventricoli cerebrali

devono essere sottoposti ad attento follow up neurocomportamentale per paralisi spastica, deficit visivi e ritardo mentale.

Patogenesi

E' ormai noto che due fattori, la prematurità e l'insufficienza respiratoria acuta che richiede ventilazione meccanica, sono fortemente associati a emorragia peri-intraventricolare.

La prematurità è condizione essenziale perché si abbia la presenza di una matrice germinativa metabolicamente attiva e riccamente vascolarizzata, ed inoltre è noto che circa il 12% dei VLBW sani presentano emorragie della matrice germinativa. Il ruolo dell'insufficienza respiratoria è probabilmente legato alle alterazioni del flusso ematico cerebrale secondarie all'ipossia, all'ipercapnia e al danno ipossico-ischemico dell'endotelio della matrice germinativa.

Altri eventi neonatali quali il pneumotorace, l'ipotensione, l'acidosi, i disturbi della coagulazione, l'espansione della volemia, l'infusione di bicarbonato, il trasporto, sono stati correlati con un rischio aumentato di emorragia, ma queste condizioni forse riflettono più la gravità del neonato e la necessità di trattamenti aggressivi piuttosto che un rapporto di causa-effetto con l'emorragia.

L'ipotesi prevalente basata sugli studi neuroanatomici di Hambleton e Wigglesworth [29] è che alterazioni della pressione arteriosa e del flusso ematico nel letto vascolare immaturo della matrice germinativa possano iniziare il sanguinamento. Due meccanismi sono stati proposti. Il primo prevede che la vasodilatazione cerebrale secondaria all'ipossia e alla ipercapnia porti ad un iperafflusso nel letto capillare della matrice germinativa con incremento della pressione e conseguente rottura dei capillari. Il secondo presuppone che sia l'ipotensione ad alterare l'integrità vascolare, tanto che un successivo incremento della pressione arteriosa possa comportare un versamento dai capillari già lesionati [30]. Entrambi questi meccanismi presuppongono uno scarso controllo dell'autoregolazione del flusso ematico cerebrale che è noto avvenire per un intervallo ristretto di variazioni di pressione nel neonato prematuro. L'ossigeno e l'anidride carbonica sono potenti regolatori del flusso ematico cerebrale. In particolare l'ipossia e l'ipercapnia causano un marcato incremento del flusso cerebrale mentre l'iperossia e l'ipocapnia hanno un effetto opposto anche se meno drammatico. Il flusso ematico cerebrale risponde all'ipossia quando la pressione parziale di ossigeno scende a valori estremamente bassi (12-15 mm Hg), mentre la regolazione con la Pa CO₂ avviene per valori fisiologici. L'ipossia e l'ipercapnia possono reversibilmente soppraffare i meccanismi di regolazione del flusso ematico cerebrale legati alla pressione e in queste circostanze il flusso cerebrale diventa "passivo" alle

fluttuazioni di pressione, pertanto piccole variazioni della pressione arteriosa possono scatenare l'emorragia.

Per quanto riguarda la leucomalacia periventricolare, oltre a ricordare l'intrinseca vulnerabilità della sostanza bianca periventricolare, in particolare dei giovani e non ancora completamente differenziati oligodendrociti del prematuro, bisogna tenere presente che le zone che più risentono delle fluttuazioni dell'irrorazione cerebrale sono le cosiddette zone di confine. La vascolarizzazione dell'encefalo del prematuro è assicurata dai rami penetranti lunghi e corti che dalla superficie della pia madre arrivano rispettivamente nella sostanza bianca della zona profonda periventricolare e nella porzione più sottocorticale. Si tratta di rami terminali che derivano prevalentemente dalla arteria cerebrale media e in minore misura dalle cerebrali anteriore e posteriore e che si sviluppano nell'ultimo trimestre di gravidanza. La capacità di resistere all'insulto dipende essenzialmente dallo stato di sviluppo di questa vascolarizzazione ed è proporzionale perciò all'età gestazionale.

Diagnosi

Clinica. - L'identificazione clinica del neonato prematuro asfittico è più difficile rispetto al neonato a termine a causa dell'imaturità funzionale del sistema nervoso centrale, tanto che segni clinici che indicano depressione del sistema nervoso centrale del neonato a termine possono rappresentare il fisiologico livello di maturazione di un pretermine. In particolare tanto più un neonato è prematuro, tanto più sarà ipotensivo, meno vigile e meno saranno sviluppati i riflessi arcaici. Sulla base di scale di valutazione neurologica dei neonati prematuri il clinico può stabilire se il tono muscolare attivo e passivo, gli stati comportamentali, e i riflessi siano o meno adeguati all'età gestazionale, identificando così anche nel pretermine i segni precoci di una encefalopatia ipossico-ischemica [31, 32].

Prima dell'avvento della tomografia computerizzata e dell'ecografia, la diagnosi dell'emorragia periventricolare veniva effettuata sulla base di una serie di segni clinici ritenuti specifici di emorragia. Erano descritti due andamenti clinici: catastrofico e saltatorio. Il primo caratterizzato da un rapido deterioramento delle condizioni generali con ipotensione, apnee, acidosi metabolica, fontanella anteriore tesa, e rapido *exitus*, il secondo in cui ad un repentino peggioramento clinico faceva seguito un miglioramento e il ciclo si ripeteva varie volte nelle 48 ore successive fino al raggiungimento definitivo della stabilità o della morte. Con l'avvento delle neuroimmagini è stato ormai accertato che questi segni non sono specifici di emorragia periventricolare e inoltre circa il 50% dei neonati prematuri con emorragia peri-intraventricolare non mostrano affatto segni così eclatanti [33].

Strumentale. - *EEG:* l'elettroencefalogramma dovrebbe essere eseguito in ogni neonato con sospetto di encefalopatia ipossico-ischemica. In particolare è utile per confermare o escludere la presenza di crisi convulsive e attraverso lo studio dell'attività di fondo di stabilire la prognosi a distanza. In assenza di crisi elettriche o cliniche infatti un tracciato tipo *burst-suppression* o di basso voltaggio è foriero di un *outcome* neurologico sfavorevole; alterazioni meno importanti dell'attività di fondo che persistono meno di una settimana sono invece associate ad una prognosi più benigna.

Per quanto riguarda la leucomalacia periventricolare ricordiamo che è possibile individuare quelle ecodensità periventricolari che esiteranno in lesioni cistiche sulla base del reperto caratteristico di punte rolandiche positive.

Neuroimmagini: nel neonato pretermine l'ecografia cerebrale transfontanellare offre l'incommensurabile vantaggio di poter essere eseguita agevolmente al letto del paziente, di essere in grado di studiare adeguatamente proprio quelle zone ove per ragioni anatomiche si manifesta maggiormente il danno ipossico-ischemico e di usare gli ultrasuoni e non le radiazioni ionizzanti. Alcune limitazioni sono date dalla difficoltà di distinguere piccole emorragie subependimali da emorragie della matrice germinativa, di diagnosticare piccole quantità di sangue nei ventricoli laterali, soprattutto se si mantengono di dimensioni normali e dalla qualità dell'immagine ottenibile. La TC può essere utile per distinguere la natura emorragica o ischemica delle lesioni iperecogene adiacenti ai ventricoli laterali ed al terzo ventricolo anche se il tempo di comparsa, soprattutto nel neonato pretermine, ci può essere di aiuto, essendo probabilmente emorragica una lesione che compare nei primi due giorni di vita ed ischemica quella che compare da giorni fino a settimane dopo la nascita.

Prognosi

Emorragia piccola (gradi 1 e 2 secondo Papile). - Il sanguinamento è solo a carico della matrice germinativa o irrompe anche nei ventricoli occupandone non più del 10% del volume (grado 1) o fino al 50%, senza distenderli. L'*outcome* neurocomportamentale di questi bambini è simile ai pretermine di pari età gestazionale senza emorragia: circa il 10% ha deficit maggiori, prevalentemente una diplegia spastica. In età prescolare presentano però una minore coordinazione visuo-motoria, pertanto sono più a rischio per disturbi dell'apprendimento in età scolare [35].

Emorragia moderata (grado 3 secondo Papile). - L'emorragia interessa estesamente i ventricoli (più del 50% del volume) causandone la dilatazione. Circa il 40% presenta deficit neurologici maggiori sia motori (diplegia e quadriplegia) che cognitivi. Nelle prime classi

elementari circa il 50% ha bisogno di un insegnante di sostegno, e la percentuale sale nelle età successive.

Emorragia severa (grado 4 secondo Papile). - L'emorragia interessa il parenchima cerebrale. Circa l'80% manifesta deficit neurologici maggiori. Tra i disturbi motori l'emiparesi controlaterale al lato dell'emorragia è il più frequente.

Idrocefalo post-emorragico. - L'*outcome* dei bambini con idrocefalo comunicante che rispondono al trattamento con punture lombari seriate è lo stesso dei bambini con pari grado di emorragia senza dilatazione ventricolare [35]. Quelli con idrocefalo ostruttivo che richiede intervento chirurgico hanno una prognosi meno favorevole, con un rischio circa doppio di deficit maggiori. L'intervento stesso di derivazione ventricolo-peritoneale è gravato da una discreta mortalità (5-10%) nel post-operatorio, e tra i sopravvissuti il 70% andrà in contro ad infezioni della valvola o malfunzionamenti [36]. Al momento attuale sembra che le emorragie periventricolari di grado moderato-grave siano predittive di *outcome* sfavorevole. Molto probabilmente non è l'emorragia di per sé a causare i danni quanto piuttosto le lesioni macroscopiche (leucomalacia) o microscopiche e funzionali (attualmente non diagnosticabili con le moderne tecniche di neuroimmagini) ad essa associate.

Trattamento

Lo scopo principale è mantenere adeguate perfusione e ventilazione. Tutti gli sforzi vanno diretti al mantenimento di valori normali di PaO₂, PaCO₂, pH, osmolarità, glicemia, e un'adeguata pressione sistemica. Questo comporta un uso ponderato di colloidali e cercare di ridurre al minimo tutti quegli eventi che causano fluttuazioni della pressione arteriosa quali apnee, pneumotorace, agitazione, procedure dolorose, manovre di accudimento, infusioni endovenose.

L'emorragia intraventricolare di per sé non richiede nessun trattamento. In passato è stato tentato un approccio terapeutico con punture lombari successive nell'intento di evacuare il sangue e ridurre così l'incidenza di idrocefalo post-emorragico, ma senza successo [34].

Il trattamento dell'idrocefalo post-emorragico progressivo include, l'esecuzione di punture lombari, la somministrazione di farmaci che riducono la produzione di liquor, la ventricolostomia e lo shunt ventricolo-peritoneale. La risposta a questi trattamenti dipende essenzialmente dal tipo di idrocefalo. Nel caso dell'idrocefalo non comunicante o ostruttivo con rapida dilatazione ventricolare e ipertensione endocranica le punture lombari non sono risolutive. Benché in questi casi la terapia definitiva sia rappresentata dalla

derivazione ventricolo-peritoneale, se il bambino è troppo piccolo o non è in condizioni di subire questo intervento si può temporaneamente inserire un *reservoir* ventricolare da cui eseguire punture quotidianamente. Nell'idrocefalo comunicante la dilatazione è lenta e progressiva e non comporta ipertensione endocranica. In questi casi è raccomandata l'esecuzione di punture lombari e il tentativo con farmaci che riducono la produzione di liquor. Durante il trattamento è necessario un controllo con ecografia cerebrale settimanale per verificare il buon esito della terapia, al termine del trattamento il monitoraggio va proseguito per diverse settimane.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 5 novembre 2001.

BIBLIOGRAFIA

1. Thornberg E, Thiringer K, Odeback A, Milsom I. Birth asphyxia: incidence, clinical course and outcome in a Swedish population. *Acta Paediatr* 1995;84:927-32.
2. Hull J, Dodd KL. Falling incidence of hypoxic-ischaemic encephalopathy in term infants. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;99:386-91.
3. Ergander U, Eriksson M, Zetterstrom R. Severe neonatal asphyxia. *Acta Paediatr Scand* 1983;72:321-5.
4. Levy DE, Brierley JB, Silverman DG, Plum F. Brief hypoxia-ischemia initially damages cerebral neurons. *Arch Neurol* 1975; 32:450-6.
5. Edwards AD, Yue X, Cox P, Hope PL, Azzopardi DV, Squier MV *et al*. Apoptosis in the brains of infants suffering intrauterine cerebral injury. *Pediatr Res* 1997;42:684-9.
6. Leech RW, Alvord EC Jr. Anoxic-ischemic encephalopathy in the human neonatal period: the significance of brain stem involvement. *Arch Neurol* 1977;34:109-13.
7. Clancy RR, Sladky JT, Rorke LB. Hypoxic-ischemic spinal cord injury following perinatal asphyxia. *Ann Neurol* 1989;25:185-9.
8. Martin E, Barkovich AJ. Magnetic resonance imaging in perinatal asphyxia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1995;72:F62-70.
9. Natsume J, Watanabe K, Kuno K, Hayakawa F, Hashizume Y. Clinical, neurophysiologic, and neuropathological features of an infant with brain damage of total asphyxia type (Myers). *Pediatr Neurol* 1995;13:61-4.
10. Barmada MA, Barmada MA, Moossy J, Shuman RM. Cerebral infarcts with arterial occlusion in neonates. *Ann Neurol* 1979; 6: 495-502.
11. de Vries LS, Groenendaal F, Eken P, van Haastert IC, Rademaker KJ, Meiners LC. Infarcts in the vascular distribution of the middle cerebral artery in preterm and fullterm infants. *Neuropediatrics* 1997;28:88-96.
12. Hashimoto K, Hashimoto K, Takeuchi Y, Takashima S. Hypocarbica as a pathogenetic factor in pontosubicular necrosis. *Brain Dev* 1991;13:155-7.

13. Ahdab-Barmada M, Moosy J, Nemoto EM, Lin MR. Hyperoxia produces neuronal necrosis in the rat. *J Neuropathol Exp Neurol* 1986;45:233-46.
14. Johnston MV. Neurotransmitter and vulnerability of the developing brain. *Brain Dev* 1995;17:301.
15. Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress: a clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol* 1976;33:696-705.
16. Amiel-Tison C, Ellison P. Birth asphyxia in the full term newborn: early assessment and outcome. *Dev Med Child Neurol* 1986;28:671-82.
17. Lipper EG, Voorhies TM, Ross G, Vannucci RC, Auld PA. Early predictors of one-year outcome for infants asphyxiated at birth. *Dev Med Child Neurol* 1986;28:303-9.
18. Allemand F *et al*. Encefalopatia ipossico-ischemica neonatale di grado medio: follow-up a due anni. *Riv Ital Ped* 1983;9:227.
19. Huppi PS, Lazeyras F. Proton Magnetic Resonance Spectroscopy (H-MRS) in neonatal brain injury. *Pediatr Res* 2001;49:317-20.
20. Amess PN, Penrice J, Wylezinska M, Lorek A, Townsend J, Wyatt JS. Early brain proton magnetic resonance spectroscopy and neonatal neurology related to neurodevelopmental outcome at 1 year in term infants after presumed hypoxic-ischaemic brain injury. *Dev Med Child Neurol* 1999;41:436-45.
21. Robertson CM, Finer NN. Educational readiness of survivors of neonatal encephalopathy associated with birth asphyxia at term. *J Dev Behav Pediatr* 1988;9:298-306.
22. Robertson CM, Finer NN, Grace MG. School performance of survivors of neonatal encephalopathy associated with birth asphyxia at term. *J Pediatr* 1989;114:753.
23. Wigglesworth JS, Pape KE. An integrated model for haemorrhagic and ischaemic lesions in the newborn brain. *Early Hum Dev* 1978; 2:79-99.
24. Pasternak JF, Groothuis DR, Fischer JM, Fischer DP. Regional cerebral blood flow in the newborn beagle pup: the germinal matrix is a low flow structure. *Pediatr Res* 1982;16:499-503.
25. Hill A, Shackelford GD, Volpe JJ. A potential mechanism of pathogenesis for early posthemorrhagic hydrocephalus in the premature newborn. *Pediatrics* 1984;73:19-21.
26. Stutchfield PR, Cooke RW. Electrolytes and glucose in cerebrospinal fluid of premature infants with intraventricular haemorrhage: role of potassium in cerebral infarction. *Arch Dis Child* 1984; 64(4):470-5.
27. Paneth N, Rudelli R, Monte W, Rodriguez E, Pinto J, Kairam R *et al*. White matter necrosis in very low birth weight infants: neuropathologic and ultrasonographic findings in infants surviving six days or longer. *J Pediatr* 1990;16:975-84.
28. Hope PL, Gould SJ, Howard S, Hamilton PA, Costello AM, Reynolds EO. Precision of ultrasound diagnosis of pathological verified lesions in the brains of very premature infants. *Dev Med Child Neurol* 1988;30:457-71.
29. Hambleton G, Wigglesworth JS. Origin of intraventricular hemorrhage in the preterm infant. *Arch Dis Child* 1976;51:651-9.
30. Perry EH, Bada HS, Ray JD, Korones SB, Arheart K, Magill HL. Blood pressure increases, birth weight-dependent stability boundary, and intraventricular hemorrhage. *Pediatrics* 1990;85: 727-32.
31. Allen MC, Capute AG. Neonatal neurodevelopmental examination as a predictor of neuromotor outcome in premature infants. *Pediatrics* 1989;83:498-506.
32. Dubowitz LM, Dubowitz V, Palmer PG, Miller G, Fawer CL, Levene MI. Correlation of neurologic assessment in the preterm newborn infant with outcome at one year. *J Pediatr* 1984;105:452-6.
33. Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1500 grams. *J Pediatr* 1978;92:529-34.
34. Ventriculomegaly Trial Group: Randomized controlled trial of early tapping in neonatal post hemorrhagic ventricular dilation. *Arch Dis Child* 1990;65:3.
35. Papile LA, Munsick-Bruno G, Schaefer A. The relationship of cerebral intraventricular hemorrhage and early childhood handicaps. *J Pediatr* 1983;103:273-7.
36. Dykes FD, Dunbar B, Lazarra A, Ahmann PA. Posthemorrhagic hydrocephalus in high-risk preterm infants: natural history, management and long term outcome. *J Pediatr* 1989;114:611-8.

Strategie terapeutiche attuali nel danno neurologico del neonato asfittico

Mario MARCONI

Unità Operativa Assistenza Neonatale, Azienda Ospedaliera San Camillo-Forlanini, Roma

Riassunto. - L'encefalopatia ipossico-ischemica conseguente all'asfissia perinatale, rappresenta una delle principali cause di mortalità e di sequele neurologiche tra i neonati a termine. Gli interventi terapeutici che agiscono sui meccanismi, ora meglio conosciuti, che producono il danno cerebrale, hanno effetti neuroprotettivi. Vengono discussi l'uso dell'ossigeno nella rianimazione alla nascita, i farmaci in uso terapeutico sperimentale e la neuroprotezione ipotermica. Studi prospettici futuri dovranno approfondire la valutazione dell'efficacia dei singoli approcci terapeutici nella prospettiva di considerarne un utilizzo combinato.

Parole chiave: asfissia, danno cerebrale, rianimazione neonatale, stress ossidativo, neuroprotezione farmacologica, ipotermia.

Summary (*Recent therapeutic strategies of brain damage in the asphyctic newborn*). - Perinatal hypoxia-ischaemia is a major cause of mortality and neurological sequelae in term newborn. Modulation of mechanisms leading to brain cell death, in the so-called therapeutic window, may reduce apoptosis and necrosis. Oxidative stress and newborn resuscitation, early postnatal pharmacological treatment and hypothermic neuroprotection are described. Additional controlled prospective trials are warranted on newborns. A combination of neuroprotective agents with synergistic effects could represent a potential treatment strategy.

Key words: asphyxia, brain injury, newborn resuscitation, oxidative stress, pharmacological neuroprotection, hypothermia.

Introduzione

L'asfissia perinatale costituisce una causa importante di danno cerebrale perinatale acquisito nei neonati a termine. L'incidenza di morte o di limitazioni neurologiche gravi consecutive ad asfissia perinatale è di 0,5-1,0 per 1000 nati vivi nei paesi industrializzati [1-3], mentre nei paesi in via di sviluppo l'asfissia perinatale risulta avere un'incidenza maggiore [5-8]. È stato calcolato che, su 130 milioni di nascite annue nel mondo, 4 milioni di neonati soffrono di asfissia perinatale, e di questi circa 1 milione muore mentre un numero equivalente riporta sequele di rilievo [9], con prevalenza maggiore nei paesi in via di sviluppo, e con un numero approssimativo di neonati colpiti che va da 8000 a 25000 nella sola area europea.

Non è stata tuttora raggiunta una definizione univoca di asfissia perinatale e la definizione rimane clinica. L'asfissia perinatale è caratterizzata da un periodo variabile di ipossia-ischemia globale, seguito da riperfusione e riossigenazione. Durante l'insulto ipossico-ischemico viene causato un danno neuronale primario con necrosi cellulare [10]. La rianimazione neonatale e la rinnovata disponibilità di ossigeno e di flusso ematico, sebbene necessaria per limitare il danno cellulare ischemico, determina una fase di ossigenazione

e riperfusione che produce un danno ritardato, secondario, neuronale. Il meccanismo ritenuto responsabile di questa fase secondaria della lesione neuronale è la produzione di radicali liberi dell'ossigeno [11], l'ingresso del calcio intracellulare [12] e la successiva morte cellulare per apoptosi [13]. Inoltre la presenza di convulsioni è un dato comune della encefalopatia ipossico/ischemica [14], e rappresenta una causa aggiuntiva di danno, producendo aumento della richiesta metabolica del sistema nervoso centrale (SNC) [15], rilascio di neurotrasmettitori eccitatori [16], fluttuazioni nella pressione arteriosa sistemica [17], ipossia ed ipercapnea.

Diverse terapie hanno dimostrato di essere neuroprotettive nei modelli animali di ipossia-ischemia, ma soltanto pochi interventi terapeutici sono stati utilizzati in studi clinici su neonati a termine. Al presente non esistono quindi strategie terapeutiche consolidate che possano essere applicate in modo certo. Il *management* clinico attuale del neonato a rischio di danno post-asfittico si limita, nella maggior parte dei centri, a misure di supporto.

In questa rassegna vengono presentate alcune possibili strategie terapeutiche, ancora in fase sperimentale. La scelta della terapia da adottare dovrà tenere in considerazione i fattori che seguono:

- molti concetti scientifici della encefalopatia ipossico/ischemica derivano da studi sugli adulti, che spesso hanno esiti unilaterali o focali e non sono perciò direttamente applicabili alla fisiopatologia perinatale;

- le fasi dello sviluppo delle funzioni cerebrali fetoneonatali e la vulnerabilità dello sviluppo vascolare e cellulare creano una condizione di maggiore fragilità. Peraltro molti processi coinvolti nel danno cellulare avvengono normalmente nel corso dello sviluppo normale del SNC, quali l'apoptosi e la morte cellulare programmata. D'altro canto la plasticità del cervello in formazione contribuisce all'abilità di superare alcuni deficit;

- la dimensione tempo dell'insulto ipossico-ischemico assume una specifica importanza in relazione al parto. Danni prenatali si manifestano diversamente da lesioni postnatali. Valutazioni a lungo termine di danni procurati alla stessa età gestazionale ad un neonato prematuro e ad un feto possono essere significativamente differenti. La sensibilità tissutale tra prematuri e neonati a termine per danni vascolari simili è molto diversa e in assoluto la definizione temporale dell'inizio del danno è un importante problema diagnostico nell'uomo;

- i parametri metabolici dell'asfissia e i segni clinici del *distress* fetale non permettono di essere associati direttamente tra loro e, quindi, una diagnosi conclusiva in tempo reale di asfissia cerebrale non è al momento possibile;

- vanno tenuti in considerazione i tempi lunghi dello sviluppo dell'uomo per la verifica delle manifestazioni cliniche consecutive a deficit cerebrali in comparazione agli animali sperimentali;

- l'associazione tra valutazione di sviluppo neurologico, valutazioni istopatologiche del danno, diagnostica elettrofisiologia, *imaging* non invasivo e tecniche neurochimiche non risultano facilmente associabili come negli studi sperimentali.

Gli interventi proponibili fino ad oggi sono basati su tre aree principali:

- impiego dell'ossigeno nella rianimazione del neonato asfittico,
- l'utilizzo di farmaci in sperimentazione,
- la neuroprotezione con il freddo.

Uso dell'ossigeno nella rianimazione del neonato asfittico

La transizione da feto a neonato è normalmente caratterizzata da una serie complessa di eventi fisiologici che comunque richiedono, fino al 10% dei casi, qualche tipo di rianimazione attiva alla nascita [18].

La maggior parte dei testi di rianimazione in neonatologia e in medicina neonatale raccomanda l'uso dell'ossigeno al 100% [19-21]. *The American Heart Association* (AHA) e l'*American Academy of Pediatrics*

(AAP) raccomandano l'uso di O₂ puro nei neonati in fase di stabilizzazione in caso di bradicardia o cianosi alla nascita [19]. Recentemente, le linee guida proposte da un *consensus* internazionale di esperti (*International guidelines 2000 for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care*) indicano l'uso dell'ossigeno al 100% nella rianimazione del neonato asfittico al fine di ottenere i valori normali di saturazione. L'*International Liaison Committee on Resuscitation*, qualora l'ossigeno non risultasse disponibile, indica la ventilazione con aria ambiente, che viene considerata un'alternativa terapeuticamente efficace [22].

Negli ultimi anni, tali indicazioni sono state messe in discussione da una quantità di ricerche sviluppatesi a partire da dati sia clinici che sperimentali. Va tenuto presente che già in epoche immediatamente precedenti, l'uso di ossigeno iperbarico era ritenuto il presidio fondamentale per la rianimazione neonatale [23], ciò fino ad alcuni *trials* randomizzati che mettevano a confronto O₂ iperbarico ed intubazione endotracheale con pressione positiva intermittente, in cui i risultati apparivano identici [24]. Solo venti anni più tardi si sono avviati studi per verificare l'ipotesi che l'aria fosse altrettanto efficiente che l'O₂ puro nella rianimazione dei neonati.

Il principio di base faceva perno sull'ipotesi che i radicali liberi generati dalla ipoxantina-xantina ossidasi vengano prodotti in eccesso nel periodo di riossigenazione post ipossica, sulla base di studi *in vitro*, che indicavano una relazione proporzionale tra concentrazione di O₂ e produzione di radicali ossigeno [25].

Gli studi iniziali in questo senso [26], hanno dimostrato in neonati di maiale ipossici una PO₂ di 380 mmHg, dopo 5 minuti di rianimazione con ossigeno puro, laddove la rianimazione con aria, in tempi analoghi, portava la PO₂ da 38 mmHg a 87 mmHg. Uno studio analogo condotto su neonati a termine, esposti in sala parto ad O₂ al 75%, ha dimostrato come essi raggiungessero, in un minuto, valori di PaO₂ intorno ai 400 mmHg [27].

Altri autori hanno valutato in modelli animali pressione arteriosa media, frequenza cardiaca, pH ed ipoxantina plasmatica con tempi di normalizzazione analoghi nei due gruppi e valutazione istomorfologica cerebrale senza differenze significative [28]. A seguire studi più recenti hanno misurato la quantità di ipoxantina su microdialisi di corteccia cerebrale dimostrando una normalizzazione significativamente più lenta nel gruppo rianimato in O₂ [29].

Sulla base dell'insieme di questi dati si sono sviluppati studi pilota su neonati: inizialmente su 84 casi [30], in cui non si registravano differenze significative nella frequenza cardiaca, gas ematici ed equilibrio acido-base, mentre alla nascita si osservava un punteggio Apgar più elevato nel gruppo in aria. La sopravvivenza dei neonati e le valutazioni neurologiche a distanza erano sovrapponibili.

Effetti negativi della rianimazione con ossigeno puro

Lo studio Resair 2 [31] ha dimostrato che i neonati possono essere rianimati con successo con aria ambiente e i risultati indicano che ci sono alcuni effetti negativi collegati alla rianimazione con ossigeno al 100%. Questi dati sono stati, fino ad oggi, pressoché trascurati ma, assieme agli elementi sperimentali raccolti da gruppi di studio negli anni passati, rendono oggi possibile giungere ad un'identificazione di tali effetti.

Effetti della iperossia sulla ventilazione. - Il Resair 2 ha dimostrato che il tempo della comparsa del primo respiro e del pianto sono allungati in neonati rianimati con ossigeno puro in confronto con quelli rianimati in aria ambiente. Questo potrebbe indicare che si verifica un effetto immediato sulla ventilazione, che successivamente determina l'abbassamento del punteggio di Apgar nel corso del primo minuto di vita. Hutchinson [32] ha dimostrato come, oltre i 45 secondi di rianimazione, i valori di ventilazione minuto risultano del 50% più elevati con aria piuttosto che con ossigeno. Tali valori perdurano fino a 105 secondi e la PaCO₂ risulta significativamente più alta nel gruppo rianimato con O₂. La rianimazione in ossigeno puro ritarda, in confronto all'aria, i tempi del recupero, a causa della depressione della ventilazione [33].

Effetti della iperossiemia sul consumo di ossigeno. - Studi su volontari hanno dimostrato che miscele del 100% di ossigeno incrementano la PaO₂ media da 95 fino a 475 mmHg (12,7-63,3 kPa) e diminuiscono frequenza, gittata, lavoro cardiaco e resistenze polmonari, indicando un fattore sfavorevole della rianimazione con ossigeno al 100% che potrebbe essere causato da un decremento del consumo di ossigeno durante l'esposizione iperossica. Studi analoghi con pazienti critici esposti per periodi limitati fino a 90 minuti al 100% di ossigeno dimostrano iperossiemie fino a 400 mm HG di PaO₂ con scarsa distribuzione del flusso ematico e assorbimento dell'ossigeno diminuito del 10%. Valori in epoca neonatale studiati da Mortola [33] descrivono come neonati dopo esposizione di alcuni minuti ad ossigeno al 100% presentino un incremento medio del 45% del lavoro respiratorio e del consumo metabolico. A livello cerebrale, oltre che a livello retinico, il cui effetto di costrizione arteriolare dovuto all'esposizione è noto, la riduzione di flusso ematico neonatale appare notevole e sembra decrescere con la maturità [34]. Gli studi sul flusso ematico cerebrale, che hanno paragonato aria e O₂ all'80% durante la iniziale stabilizzazione alla nascita [35], presentavano una riduzione media del 23% a 2 ore di vita nel gruppo arricchito con ossigeno. Tale riduzione del flusso cerebrale risultava ulteriormente prolungata nella popolazione dei pretermine, sebbene esposti per periodi brevi ad iperossia.

Effetti dell'iperossia sui radicali liberi e sull'infiammazione. - Durante l'ipossia si accumula ipoxantina, metabolita della purina, che durante la riossigenazione genera radicali ossigeno. Tale meccanismo, dedotto inizialmente nel 1980 [36], è stato successivamente confermato ed integrato da studi che dimostrano come i radicali liberi possano essere prodotti nei mitocondri da più fonti. L'acido arachidonico ed altre sostanze come le catecolamine possono essere ossidate e generare radicali liberi, producendo una perossidazione lipidica delle membrane cellulari o ossidare proteine o DNA, ed indurre apoptosi [37]. La produzione di radicali liberi aumenta all'aumentare della concentrazione di ossigeno. E' stato dimostrato in diversi studi su animali [38] che essi vengono prodotti in quantità notevole durante la riperfusione dopo ischemia e che la riossigenazione di cavie neonate con il 100% di ossigeno produceva una quantità significativamente più alta di radicali ossigeno a livello della corteccia cerebrale a confronto con la rianimazione con aria [39]. Peraltro è ben noto che i radicali O₂ sono dei potenti vasoregolatori ed agiscono come vasocostrittori al livello del polmone o dilatatori in organi come il dotto arterioso ed il cervello [40] e con relazioni più complesse tra radicali ossigeno e circolazione con il variare della loro concentrazione [41].

I danni da riperfusione sono associati con l'attivazione dei leucociti e delle cellule endoteliali [42]. E' dimostrato come la riperfusione dopo ischemia nella corteccia cerebrale dei ratti produca un accumulo di mieloperossidasi che riflette l'infiltrazione neutrofila, con un'adesione di molecole sulle cellule endoteliali che attivate dalle citochine e da altri mediatori producono radicali O₂, in fase di ipossia e riossigenazione [43, 44]. Sperimentazioni recenti hanno confermato una produzione aumentata di radicali liberi nel tessuto polmonare delle cavie neonate rianimate in ossigeno puro [45].

Anche Vento [46], su un numero elevato di neonati rianimati alla nascita, ha confermato come l'utilizzo dell'aria normalizzi i *pattern* respiratori prima di quanto faccia l'ossigeno al 100%. In aggiunta, i valori di PaO₂ rilevati anche fino a 10 minuti dopo la cessazione della ventilazione con pressione positiva in ossigeno, risultavano di molto superiori ai valori fisiologici. Quindi per i neonati aver ricevuto un ammontare significativamente maggiore di ossigeno per kg di peso corporeo costituisce uno stimolo ossidativo che viene correlato positivamente con alte concentrazioni di glutazione ossidato. Ciò si verifica nonostante l'attivazione della glutazione reductasi e degli enzimi antiossidanti come superossido dismutasi (SOD) e catalasi, suggerendo che il sistema di difese antiossidanti del neonato, di cui il glutazione è il rappresentante intracellulare più importante, può essere sopraffatto da un accumulo di radicali liberi generati in fase di riperfusione in

un'atmosfera iperossica. L'alterazione del rapporto glutazione ossidato/glutazione ridotto (GSH/GSSG) si sbilancia con un incremento evidente di quest'ultimo. In questa condizione secondo Vento [46] i neonati rianimati in aria risultavano capaci di ristabilire un rapporto adeguato tra GSH/GSSG, mentre i neonati rianimati con ossigeno mantenevano un'alterazione, perdurante fino a quattro settimane del rapporto GSH/GSSG. Il perdurare di questo stress ossidativo può produrre effetti variabili sull'attività di proliferazione cellulare, dall'incremento della proliferazione all'apoptosi, lasciando intravedere oltre ai danni tissutali immediati una serie di conseguenze a lungo termine.

Effetti dell'iperossia sul metabolismo cerebrale. - In modelli animali neonatali con asfissia indotta si osservava un ritorno ai livelli di base di sodio, potassio, e ATPasi a livello del corpo striato entro circa due ore se esposti ad aria in contrasto con quelli trattati con il 100% di ossigeno, che presentavano inibizione persistente o ridotta di sodio, potassio e riduzione drastica della ATPasi [47]. Altri autori hanno registrato un livello extra cellulare di dopamina incrementato nel cervello dopo ipossia e riossigenazione che può esacerbare il danno cerebrale in presenza di rianimazione con ossigeno al 100% in confronto a quella con aria.

La misurazione di ossido nitrico effettuata direttamente sulla corteccia di cavie neonate ha mostrato un incremento notevole in corso di rianimazione con O₂ al 100% comparata con l'aria. Questi dati indicano che la riossigenazione in ossigeno puro risulta in una produzione aumentata di composti tossici a livello cerebrale.

Effetti positivi della rianimazione con ossigeno puro o con basse concentrazioni di ossigeno

Lo studio Resair 2 non ha escluso completamente che alcuni sottogruppi di neonati possano beneficiare dall'iniziare la rianimazione con ossigeno supplementato. Peraltro anche nei gruppi con sindrome da aspirazione meconiale, bradicardia intensa ed Apgar basso, analizzati separatamente, non si è dedotto alcun effetto negativo dall'uso dell'aria, ma il numero di casi esaminati non appare ancora sufficiente.

Se l'iperossia durante la riossigenazione è dannosa, si potrebbe ipotizzare che una concentrazione di ossigeno inferiore al 21% possa essere benefica. Esistono studi che hanno utilizzato concentrazioni di circa 40-45 mmHg (5,3-6,0 kPa) comparati con normossia, che hanno dimostrato migliore ripresa post-ischemica spinale nei conigli [48], miglioramento dell'inibizione della sintesi di proteine cerebrali [49] e, con una reintroduzione graduale di ossigeno, minori danni da riperfusione a livello dello stomaco [50]. Gli studi che paragonavano ossigeno al 21%, 12%, 8,5% nella rianimazione di cani

dopo arresto cardiaco non mostravano grandi vantaggi se comparati con l'impiego di aria. Il gruppo esposto al 8,5% presentava a distanza performances neurologiche peggiori. Questi ed altri autori concludono che né iperossia né ipossia sono livelli da raggiungere durante la rianimazione per minimizzare i danni neurologici e migliorare la prognosi.

Rianimazione dei pretermine. - Il pretermine presenta una necessità di rianimazione maggiore del neonato a termine, ma non vengono indicate linee guida specifiche e la World Health Organization stabilisce principi analoghi da applicare tanto al prematuro quanto al neonato a termine [1]. Lo stesso vale per la *International Liaison Committee on Resuscitation* [22], ma in via teorica il neonato pretermine potrebbe risultare più vulnerabile ad alte concentrazioni di ossigeno e quindi probabilmente l'esposizione a concentrazioni elevate di questo gas dovrebbe essere attentamente considerata.

La rianimazione neonatale è un'evenienza molto frequente, praticata su un numero di neonati che va da 4 a 7 milioni ogni anno ed ogni gradino di tale rianimazione dovrebbe essere fondato sulla "medicina basata sull'evidenza", cosa che attualmente non avviene. L'uso di alte concentrazioni di ossigeno, mai testato in precedenza, sembra produrre un certo numero di effetti negativi. Nuove linee guida per la rianimazione neonatale, basate sui dati attualmente accumulati, sembrano suggerire che essa debba avvenire né in iperossia né in ipossia e comunque l'esecuzione di una rianimazione ottimale dovrebbe essere eseguita con un monitoraggio continuo della saturazione di ossigeno.

Utilizzo di farmaci in sperimentazione

Non è stato a tutt'oggi definito alcun protocollo di trattamento farmacologico di provata efficacia per combattere le sequele dell'asfissia neonatale. Tuttavia interventi terapeutici che riescano ad interferire con ciascuno dei gradini del processo di cascata dei mediatori patologici possono potenzialmente prevenire la morte cellulare o ridurre il grado di lesione, il tutto in un equilibrio tra effetti ossidanti e difese antiossidanti.

Chelanti del ferro non legato a proteine, inibitori della xantina-ossidasi e scavengers dei radicali liberi

La perossidazione lipidica delle membrane cellulari neuronali costituisce un effetto della compromissione della funzione mitocondriale, con perdita di radicali liberi dai mitocondri nel citoplasma [51]. L'abbassamento del pH intracellulare durante l'ipossia-ischemia dà l'avvio al rilascio di ioni metallici dalle loro proteine leganti, con la formazione di radicale idrossilico. Con la riperfusione e la riossigenazione, si genera una produzione indotta dal calcio di ulteriori quantità di

radicali liberi e fosfolipasi con effetti sulla membrana cellulare e rilascio di acido arachidonico, che stimola la ciclossigenasi con formazione di una prostaglandina che produce radicale superossido. Peraltro la conversione di ipoxantina dovuta alla riossigenazione, aumenta ulteriormente la quantità di superossido. L'eliminazione dei metalli non legati tramite chelanti del ferro, come la *desferrosamina*, previene la formazione dei radicali liberi e, in studi su animali neonati, è stata utilizzata con prevenzione del decremento della attività Na^+/K^+ /ATPasi delle cellule corticali, con un mantenimento dell'attività elettrica e metabolica cerebrale [52]. Questo farmaco, utilizzato con babbuini neonati in corso di malattia da membrane ialine, ha però prodotto effetti vascolari tossici [53].

Il danno da radicali liberi può essere, in teoria, limitato potenziando la disponibilità degli *scavengers* (per es. catalasi e SOD), inibendo la perossidazione lipidica (per es. con alfa tocoferolo o lazaroidi) o inattivando i meccanismi che amplificano la loro tossicità (per es. chelanti del ferro). L'*acido ascorbico* plasmatico costituisce la prima linea di difesa contro i radicali liberi e la perossidazione lipidica si osserva soltanto dopo consumo dell'acido ascorbico *in situ*. Nel feto l'acido ascorbico è uno dei principali sistemi antiossidanti, mentre i sistemi antiossidanti enzimatici non si sviluppano fino alla fine del terzo trimestre [54]. Tuttavia i livelli plasmatici di acido ascorbico declinano rapidamente dopo il parto e tale reazione improvvisa può risultare in un incremento del rischio di danno ossidativo. Si ritiene che l'acido ascorbico agisca come un neuro-modulatore che facilita il rilascio di neurotrasmettitori e inibisce gli NMDA recettori. Nelle sperimentazioni animali, su modelli di coniglio pretermine la somministrazione di acido ascorbico (150 mg/kg in bolo + infusione continua di 60 mg/kg/h) determina l'incremento della sopravvivenza cellulare a livello corticale e dell'ippocampo. Se l'acido ascorbico viene associato con un analogo della vitamina E ne risulta un miglioramento ulteriore della vitalità cellulare e della valutazione istologica nelle 24 ore post-afissia [55]. Gli aspetti problematici dell'uso dell'acido ascorbico sono legati al dosaggio ottimale efficace per la neuroprotezione. Il sovradosaggio può risultare dannoso, in concentrazioni millimolari, su colture di neuroni corticali producendo un'inibizione della sintesi proteica con successiva morte neuronale. La somministrazione di acido ascorbico nei prematuri ad alto rischio [56] a dosi di 100 mg/kg/die per la prima settimana di vita sembra non produrre un incremento dell'emolisi, disfunzioni renali, infezioni, displasia broncopolmonare o emorragia intraventricolare. L'accumulo dell'acido ascorbico nel cervello può richiedere una fase di ossidazione nel plasma. La forma ossidata, acido deidrascorbico, attraversa rapidamente la barriera ematoencefalica mediante le cellule endoteliali, mentre

la forma ridotta non è in grado di farlo. Tale differenza non appare dannosa dal momento che l'effetto antiossidante protettivo dell'acido ascorbico si mantiene attivo preservando l'azione di altri antiossidanti nel cervello. Nelle valutazioni sperimentali, nei gruppi trattati i livelli di acido ascorbico nel cervello fetale alla fine della fase di ischemia-riperfusionazione risultavano paragonabili con i gruppi non trattati, indicando comunque una capacità totale antiossidante che suggeriva come questo farmaco fosse in grado di riciclare altri antiossidanti. Quindi, l'acido ascorbico sembra essere utile se somministrato in dose corretta e il suo effetto appare facilitato se utilizzato contemporaneamente con altri antiossidanti come per esempio l'*alfa-tocoferolo*. Quest'ultimo, somministrato in via supplementare ai pretermine, di cui è noto il deficit di vitamina E, non ha mostrato da solo effetti positivi, indicando invece un rischio incrementante di sepsi o enterocolite necrotizzante. In aggiunta, la sua potenziale utilizzazione come agente neuroprotettivo appare limitata da una lenta assunzione cerebrale.

L'*indometacina*, nella sua funzione di inibitore delle ciclossigenasi produce effetti analoghi sul metabolismo cerebrale [57], con in più, insieme all'*ibuprofene*, una capacità di ridurre i neutrofilici circolanti e quindi la produzione di citochine, con miglioramento della microcircolazione cerebrale [58, 59].

Farmaci con applicazioni promettenti sono i *lazaroidi*, non glucocorticoidi 21-aminosteroidi, che agiscono probabilmente sul comparto microvascolare, dal momento che non penetrano la barriera emato-encefalica. Essi stabilizzano la membrana cellulare in modo simile alla vitamina E, con un effetto di prevenzione sulla perossidazione lipidica. Una sperimentazione su ratti neonati è apparsa promettente con una notevole riduzione dell'edema cerebrale post-ischemico, mentre gli adulti, entro sei ore dall'ischemia cerebrale, non hanno mostrato alcun miglioramento significativo della prognosi a distanza [60, 61].

L'*allopurinolo*, che possiede anch'esso effetti chelanti [62, 63], può servire come paradigma delle problematiche affrontate per studiare un intervento farmacologico in questa situazione. Strutturalmente analogo ad una ipoxantina, inibisce competitivamente la xantina-ossidasi che, in ipossia-riossigenazione e ischemia-riperfusionazione, produce ossidanti come il superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2) e il radicale idrossido [64]. Organi come fegato e intestino che contengono il maggiore quantitativo di xantina-ossidasi risultano danneggiati dall'ischemia-riperfusionazione. Tale danno conduce xantina-ossidasi nella circolazione, e quest'ultima colpisce organi non ischemizzati, che posseggono piccole quantità di xantina-ossidasi endogena, come il cuore ed il cervello.

Nei modelli animali l'allopurinolo ha un effetto protettivo sull'ischemia cerebrale. In epoca neonatale [65] e, se somministrato quindici minuti dopo l'insulto ipossico-ischemico, riduce l'edema cerebrale, l'atrofia

cerebrale, e le lesioni infartuali [66, 67]. Negli studi effettuati non appare ancora definita la dose ottimale che permetta a questo farmaco di essere presente in quantità sufficiente a livello cerebrale. Sembra necessaria una dose elevata di allopurinolo per ottenere effetti neuroprotettivi, ciò in relazione, oltre che alla attività di semplice inibizione della xantina-ossidasi, anche ad un ipotizzato effetto diretto sui radicali e come chelante dei metalli. Se la dose viene ridotta da 150 mg/kg a 100 mg/kg/die in ratti adulti con ischemia focale, la riduzione del volume dell'infarto cerebrale passa dal 24% all'8% [68]. Esiste uno studio su un numero elevato di neonati pretermine [69], ai quali è stato somministrato allopurinolo per prevenire la leucomalacia periventricolare, che non ne ha dimostrato variazioni significative ed in più ha fatto temere effetti preoccupanti, seppur ipotizzati, sulla mortalità, la poroencefalia, e la NEC nel gruppo trattato.

Viene ipotizzato un effetto differente dell'allopurinolo tra neonati a termine e pretermine anche in base al dosaggio. In particolare, in un gruppo di 22 neonati asfissati a termine trattati con 40 mg/kg endovena, entro quattro ore dopo la nascita, l'allopurinolo produceva minori variazioni del flusso ematico cerebrale alla spettroscopia ad infrarossi ed una precoce stabilizzazione dell'attività elettrocorticale cerebrale [70]. In conclusione l'allopurinolo sembrerebbe utile se utilizzato in dosaggio corretto e con una somministrazione immediatamente successiva all'ipossia ed infine rappresenta un farmaco relativamente ben studiato e quindi applicabile anche in epoca neonatale [71].

Inibitori dell'ossido nitrico

L'ossido nitrico è un radicale libero che viene generato nelle cellule cerebrali endoteliali, gli astrociti, e nelle cellule neuronali in formazione, espletando attività fisiologiche come vasodilatazione, promozione della sinaptogenesi e modulazione di neurotrasmissione. L'ipossia-ischemia, soprattutto in fase secondaria produce in eccesso ossido nitrico sintetasi con aumento della produzione di ossido nitrico attraverso diversi meccanismi correlati che producono effetti persistenti a carico dei neutrofili, dei macrofagi e della microglia [72, 73]. Il tentativo terapeutico consiste nell'inibizione in fase precoce del periodo post-ischemico attraverso inibitori non selettivi della sintetasi [74, 75]. Studi successivi hanno utilizzato un'inibizione selettiva con risultati neuroprotettivi [76, 77].

Inibitori dei canali del calcio e dei recettori NMDA

Il livello intracellulare del calcio, che si mantiene in concentrazioni molto basse in condizioni fisiologiche, subisce importanti variazioni in condizioni di ipossia. In questo caso la caduta di ATP consente un ingresso anomalo di calcio con formazione di aminoacidi

eccitatori come il glutamato e con attivazione dei recettori N-metil-D-aspartato che producono un ulteriore ingresso di calcio e innescano una iperproduzione di radicali liberi. Calcio inibitori come *flunarizina* e *nimodipina* sono stati sperimentati per ridurre l'entità degli infarti cerebrali. In campo neonatale l'uso di questi farmaci, con la *nicardipina*, ha dimostrato gravi effetti collaterali con ipotensione sistemica [78].

Il *magnesio solfato*, utilizzato per anni nella preeclampsia, sembrava presentare risultati interessanti se somministrato prima del parto per ridurre i rischi di lesioni emorragiche cerebrali. In realtà un esame seriato ecografico non ha fornito dati totalmente convincenti. Somministrato nel neonato, con la funzione di bloccare i canali NMDA, non ha mostrato risultati convincenti sugli animali [79] ed in un trial multicentrico, nel trattamento della ipossia-ischemia neonatale, ha presentato effetti collaterali, probabilmente connessi con il dosaggio, che hanno obbligato all'interruzione della sperimentazione [80].

Antinfiammatori

In fase di riperfusione, vengono liberati mediatori dell'infiammazione come istamina, trombina e si realizza un'alterazione dell'endotelio vasale, stimolata dai mediatori attivati dall'ossigeno. Il verificarsi di danni microvascolari e di microinfiltrazioni nel tessuto cerebrale coinvolto è collegato alla presenza di fattori citotossici secreti dai leucociti, che, con adesione ad elevata affinità sono attratti dai fattori piastrino-attivati (PAF) e dalla interleuchina 8 (IL-8) consecutivamente alla attivazione dell'interleuchina 1 e del TNF (*tumor necrosis factor*) [81, 82], come è confermato dall'incremento di IL-1 β e di TNF-mRNA nelle regioni colpite da lesione celebrale [83].

L'utilizzo di antagonisti dell'IL-1 e del TNF appare avere effetti neuroprotettivi, confermando come il blocco di questi fattori costituisca un elemento importante per impedire lo svilupparsi di lesioni postipossico-ischemiche [84]. Un ruolo simile è stato ipotizzato per gli antagonisti dei PAF, che aumentano la risposta infiammatoria inducendo i neutrofili a rilasciare radicali liberi e facilitare la loro adesione vasale [85]. In modo analogo agirebbe il *transforming growth factor* (TGF- β), una citochina che incrementa la sopravvivenza neuronale su tessuti esposti alla neurotossicità del glutammato su colture corticali di ratto [86]. Esso è in grado di ridurre le lesioni ischemiche cerebrali in un modello animale [87]. Altri componenti del gruppo TGF- β possiedono effetto neurotrofico di protezione postischemica [88].

Agenti antiapoptotici

La correlazione tra apoptosi e infiammazione costituisce un meccanismo di rilievo nel determinare la lesione cellulare post ipossico-ischemica. Questi processi

risultano mediati dalle caspasi delle cisteino-aspartato proteasi, la cui inibizione appare neuroprotettiva su modelli animali [89].

Fattori di crescita

Una modulazione del danno cerebrale può essere prospettabile, in corso di sviluppo cerebrale, a seconda della produzione e disponibilità post ipossico-ischemica dei fattori neurotrofici e favorenti lo sviluppo dei neuriti [90]. Sono stati isolati numerosi fattori con effetto favorente la crescita. Il fattore di crescita insulinosimile (IGF-1) appare possedere un ruolo di modulazione del danno cerebrale. Prodotto in grosse quantità sotto forma di IGF-1 mRNA dopo ipossia-ischemia o somministrato centralmente nei ratti riduce la quantità di neuroni danneggiati.

HIF-1, responsabile dell'attivazione post-ischemica di precursori dell'eritropoietina, e VEGF, fattore di crescita vascolare endoteliale, risultano avere un ruolo di angiogenesi e neuroprotezione dopo ischemia globale cerebrale nel ratto [91]. Ruolo analogo viene svolto dal fattore neurotrofico di crescita epidermica. La somministrazione intraventricolocerebrale di fattori neurotrofici encefaloderivati mostrava una netta riduzione del danno neuronale nei ratti con un meccanismo età dipendente [92].

Eritropoietina

Notevole interesse scientifico e clinico è stato suscitato dalla scoperta di effetti non ematopoietici dell'*eritropoietina* [93]. Esistono dati preliminari e pubblicazioni sul ruolo biologico dell'eritropoietina (Epo) nel sistema nervoso centrale umano tanto in fase di sviluppo che in età adulta, basati sull'espressione del suo specifico recettore (Epo-R).

Il recettore (Epo-R) e la sua espressione genica sottostanno a cambiamenti durante lo sviluppo e presentano una regolazione encefalo-specifica. L'espressione di Epo-R è abbondante a livello encefalico in fase embrionale, fetale e adulta, ed accertata in diverse linee di sviluppo neuronale: NT2 (cellula precursore con capacità post-mitotiche), PC12 (linea cellulare del feocromocitoma del ratto) e SK-N-MC (linea cellulare del neuroblastoma umano) [94].

E' stato possibile investigare in dettaglio l'espressione genica dell'Epo nel sistema nervoso centrale umano in sviluppo. Dieci settimane dopo il concepimento, Epo viene rinvenuta in quantità marcata nelle zone ventricolari e periventricolari [95], a venti settimane si rinvia a livello del talamo, dell'ippocampo, dei corpi genicolati laterali, della corteccia, e del midollo spinale.

La scoperta che l'Epo viene espressa nel SNC in quantità comparabile con quella del fegato e del rene, sedi ove si rileva la quantità più cospicua di Epo

circolante in questa fase dello sviluppo, può suggerire il rilievo di questa proteina nella neurogenesi del cervello. Peraltro Epo si rileva nel liquido cerebrospinale (LCS) tanto di neonati, sia a termine che pretermine, che di adulti umani. La ricerca simultanea di Epo nel LCS e nel plasma in neonati ha fornito dati interessanti. Neonati trattati con Eporicombinante (rEpo), (1200-1400 U/kg/sett) per motivi ematologici, non presentavano livelli più alti nel LCS, rispetto ai controlli [96]. Al contrario valori elevati di Epo venivano riscontrati tanto nel plasma che a livello del LCS in neonati con asfissia.

Studi sperimentali *in vivo* hanno mostrato effetti protettivi della somministrazione intraventricolare o sistemica di rEpo sia in caso di lesioni ischemiche che infiammatorie [97], e numerosi studi indicano effetti *in vitro* di tipo neuroprotettivo su linee cellulari o tessuti cerebrali esposti ad agenti danneggianti, tanto con somministrazioni preventive che immediatamente successive al danno.

Non si hanno dati clinici ad oggi sugli effetti neuroprotettivi e neurotrofici dell'eritropoietina dal momento che, sebbene questa risulti largamente impiegata con neonati pretermine, nella profilassi o terapia dell'anemia, questi vengono normalmente esclusi dagli studi a causa del rischio connesso con la loro patologia di partenza. Relativamente all'impiego in età adulta in proposte sperimentali recenti, si ritengono proponibili *trials* ove l'eritropoietina, in forma di rEpo, venga impiegata in pazienti colpiti da ostruzioni vascolari cerebrali, per migliorare l'ossigenazione cerebrale.

La somministrazione per via sistemica, con funzione neuroprotettiva, appare avere una limitazione quantitativa dovuta ad un effetto di saturazione a livello della barriera ematoencefalica. Un'alternativa potrebbe essere rappresentata dagli EMP, peptidi che imitano gli effetti eritropoietici dell'eritropoietina, *in vivo* e *in vitro*, che possono modulare le proprie caratteristiche biologiche ed incrementare la propria affinità per gli eporecettori. Se confrontati con rEpo (purché somministrati in via preventiva per almeno 8 ore) appaiono altrettanto protettivi su colture di neurocellule in proliferazione, sottoposte tanto ad ipossia che ad irradiazione ultravioletta [98].

In conclusione tali dati suggeriscono un ruolo interessante dell'eritropoietina nello sviluppo fisiologico cerebrale e nelle funzioni di neuroprotezione e di riparazione tissutale neuronale consecutive a danno cerebrale.

Neuroprotezione da freddo

L'ipotesi che l'ipotermia potesse svolgere un ruolo neuroprotettivo nell'encefalopatia ipossico-ischemica è basata su osservazioni sperimentali su animali, che sembrano rispondere all'asfissia perinatale tentando

attivamente di ridurre la propria temperatura corporea, attivando una serie di meccanismi fisiologici (protezione cerebrale endogena).

Dopo le prime applicazioni in campo cardiocirurgico, sono stati effettuati alcuni studi, tanto su animali asfissati alla nascita che su neonati umani senza respirazione spontanea a 5 minuti di vita, che venivano immersi in acqua fredda fino alla comparsa dell'attività respiratoria. Tali valutazioni non facevano parte di studi controllati e avevano un follow up limitato [99]. Tale indirizzo terapeutico-rianimatorio venne totalmente abbandonato quando si ritenne fosse di rilevanza assoluta per la prognosi a distanza proteggere il neonato dal freddo.

Studi randomizzati su animali, sottoposti ad un insulto asfittico programmato alla nascita, hanno invece mostrato risultati positivi sulla sopravvivenza a breve e lungo termine [100]. Gli studi di risonanza magnetica in spettroscopia hanno dimostrato che l'ipotermia agisce sulla fase secondaria della caduta energetica cerebrale, che ha luogo a 12-24 ore dall'insulto lesionale, ed il cui andamento è predittivo della prognosi neurologica successiva. Animali sperimentali sottoposti a trattamento ischemizzante e successivamente a 12 ore di ipotermia non marcata, presentavano nel filtrato extracellulare raccolto mediante microdialisi cerebrale, un rilascio degli aminoacidi eccitatori e la produzione di ossido nitrico in quantità nettamente inferiori al gruppo non trattato, con una riduzione generale dei meccanismi di apoptosi e necrosi cellulare [101].

Numerosi esperimenti sono stati condotti su animali adulti, con la dimostrazione che una riduzione di 2-3 °C della temperatura cerebrale inraischemica produceva effetti protettivi sulle lesioni neurologiche in maniera indipendente dalla tecnica con cui veniva prodotto il raffreddamento encefalico [102].

Tempo zero e durata della protezione ipotermica

Alla nascita non siamo in grado di definire con precisione il momento d'inizio, la durata dell'asfissia, nonché l'esistenza di eventuali episodi pregressi. A questi vanno aggiunti i tempi necessari per la rianimazione e per approntare gli interventi necessari per il trattamento ipotermico. In tal senso gli esperimenti effettuati [103] ottengono risultati significativi iniziando la neuroprotezione con il freddo circa 1-1,5 ore dopo un insulto cerebrale significativo della durata di 30 minuti, con ipotermia perdurante per almeno 72 ore. Altri autori ritengono la finestra terapeutica molto più breve, riferendo risultati positivi solo con intervalli di pochi minuti. Negli studi consecutivi a traumi ischemici nell'adulto, ritardi del raffreddamento intorno a 5-6 ore, con raggiungimento della temperatura target dopo oltre 10 ore, dimostravano un effetto protettivo più che dimezzato [104].

Non è chiaro se i benefici del freddo, tanto in studi in epoca neonatale che nell'adulto, consistano in un ampliamento della finestra terapeutica, senza costituire una protezione duratura e quindi con una morte cellulare solo ritardata, oppure, al contrario possono offrire una protezione permanente. Tali differenze appaiono in relazione con diversi aspetti di questa metodica.

Sembra essere importante la durata dell'ipotermia, in relazione con la severità dell'asfissia. Ad esempio lo stesso tipo di insulto ipossico contrastato con un raffreddamento più prolungato (da 6 a 72 ore) produce una protezione più evidente [105]. Nei modelli animali dove il momento d'inizio dell'ipossia è noto ed il raffreddamento può essere attivato immediatamente, si è prodotta una protezione del 60% sulla sopravvivenza e sulle prestazioni a distanza con un abbassamento di temperature di 6 °C per 3 ore, in confronto ad un 35% di protezione in uno studio con insulto lesionale più grave. Il tentativo di mantenere per tempi prolungati un raffreddamento moderato produceva risultati interessanti [106].

Elementi interessanti vengono forniti da uno studio recente di Nedelcu [107], in cui l'effetto di 24 ore di trattamento ipotermico marcato (30 °C vs 37 °C) veniva studiato quotidianamente usando esami in risonanza magnetica e valutazione istopatologica, su animali sottoposti ad occlusione della carotide comune ed a 90 minuti di esposizione ad ossigeno all'8%. L'edema citotossico prodotto e la caduta del metabolismo cerebrale risultavano migliorati dall'abbassamento della temperatura, rispetto al gruppo di controllo; ma i casi con lesioni iniziali gravi sviluppavano comunque, nonostante l'ipotermia, vaste aree infartuali cerebrali ma con tempi di progressione del danno molto più lenti, lasciando quindi l'opportunità per un eventuale intervento terapeutico addizionale.

Temperatura cerebrale neuroprotettiva ottimale

Studi sperimentali animali condotti nella pecora e nel cane hanno indicato effetti protettivi per l'encefalo con temperature sistemiche appena al di sotto dei 34 °C, con risultati migliori rispetto ad abbassamenti moderati (28-32 °C) o marcati (15-25 °C), probabilmente a causa degli effetti negativi dell'ipotermia [108].

Nell'uomo adulto il raffreddamento corporeo totale a 33,5 °C per 24 ore migliora la prognosi nei soggetti con insulto di grado intermedio [104].

Forniscono dati interessanti le valutazioni istologiche ottenute in studi su ratti trattati con temperature variabili, dopo 20 minuti di ischemia cerebrale. I neuroni dell'area CA1, neuroni dei fasci piramidali altamente vulnerabili, apparivano totalmente indenni ed appariva nettamente ridotto il danno a carico delle cellule dei nuclei della base, in proporzione variabile all'ipotermia: del 75% con temperature di 33 °C del 100% con 30 °C.

Una sensibilità regionale cerebrale all'ipotermia indica le zone corticali e del talamo come le meno protette, in confronto al nucleo caudato, a parti del corpo striato e dell'ippocampo [106].

Raffreddamento selettivo

Un approccio selettivo ha tentato di ottenere il raffreddamento cerebrale minimizzando gli effetti negativi dell'ipotermia sistemica. Già Kotchev, nel 1970, aveva applicato una tecnica che utilizzava cuffie a bassa temperatura. Gunn ed altri applicano la stessa metodica a feti di pecora con ipossia, dimostrando che il raffreddamento della temperatura extradurale, tra 30 °C e 33 °C per 72 ore, riduceva gli esiti cerebrali sebbene l'abbassamento iniziasse fino a 5,5 ore dopo la riperfusione. In questo caso, la temperatura interna, misurata a livello esofageo, si riduceva di 1,5 °C in risposta al raffreddamento selettivo del capo e il calo di temperatura corporea veniva prevenuto con una perfusione placentare di sangue caldo. Uno studio analogo su neonati a temine con asfissia perinatale e sintomatologia neurologica precoce, otteneva temperature rettali di 35,7 °C, utilizzando cuffie raffreddate sul capo dei neonati con risultati ritenuti efficaci nel ridurre in modo rapido la temperatura cerebrale, senza effetti collaterali di rilievo [109].

In realtà esistono ben pochi dati disponibili sulla distribuzione della temperatura all'interno dell'encefalo neonatale umano, o sull'effetto del raffreddamento tanto locale che sistemico. Tali dati sono difficili da acquisire dal momento che una misurazione invasiva accurata della temperatura cerebrale neonatale non può essere facilmente giustificata ed i modelli animali possono essere confondenti a causa delle differenze nel metabolismo cerebrale, il flusso ematico, o la geometria anatomica.

Un'applicazione clinica del raffreddamento cerebrale richiederebbe che, come in altre terapie importanti, la distribuzione e la dose siano accuratamente note. Ciò è particolarmente importante dal momento che studi che utilizzano la risonanza magnetica hanno dimostrato che nel neonato umano le strutture encefaliche della base sono significativamente più calde di altri tessuti cerebrali più superficiali e che il danno alle strutture cerebrali profonde è predittivo di problematiche neurologiche più gravi mentre lesioni corticali risultano relativamente benigne [110].

Van Leeuwen e altri hanno studiato i metodi di raffreddamento cerebrale attraverso un modello numerico delle distribuzioni di temperatura all'interno della testa del neonato, con l'ipotesi di verificare "l'approccio selettivo", basato sull'applicazione di un casco raffreddante alla temperatura costante di 10 °C. Essi hanno ottenuto risultati che confermano come non sia la resistenza termica del cranio, ma piuttosto l'effetto dovuto alla perfusione cerebrale a prevenire un raffreddamento efficace [111].

L'unico tipo di simulazione che produceva una riduzione significativa della temperatura cerebrale profonda era quella in cui veniva abbassata a 34 °C la temperatura corporea interna, implicando la necessità di ridurre la temperatura totale corporea per ottenere un raffreddamento cerebrale profondo. In conclusione questi autori giudicano falsa l'ipotesi che il raffreddamento della superficie del cranio mediante l'applicazione di un casco raffreddante riduca significativamente la temperatura cerebrale profonda e produca un differenziale di temperatura tra le zone profonde dell'encefalo e la temperatura corporea interna nel neonato umano. Soltanto con l'abbassamento della temperatura interna si ottiene una riduzione significativa delle zone profonde dell'encefalo. Questi dati, sebbene successivamente contrastati da valutazioni successive con la prima misurazione diretta del gradiente T rettale/T cerebrale profonda [112], comportano in ogni caso la necessità di nuove ricerche per l'applicazione di metodiche coerenti della neuroprotezione da freddo.

Effetti sistemici negativi dell'ipotermia

Non si sono registrate differenze tra adulti con lesione encefalica che hanno subito un raffreddamento fino a 33,5 °C, in relazione a ipotensione, aritmie, infezioni, disturbi coagulativi, o necessità di supporto ventilatorio [104]. Al contrario nei neonati si sono osservati disturbi coagulativi con temperature al di sotto di 33 °C. L'ipotermia incrementa la viscosità ematica con un aumento del 2% per 1 °C, producendo così un rischio di difetto di perfusione se l'ematokrito è già di per sé alto. Ciò particolarmente in relazione ai rischi di lesioni intestinali, connesse con una riduzione del flusso ematico post-ipossico e rischio di enterocolite necrotizzante [113].

Studi recenti hanno analizzato e documentato in modo sistematico i rischi più frequenti di variazioni cardiovascolari [114] che appaiono:

1) caduta indesiderata della temperatura interna, su valori inferiori al *range* desiderato, dovuta ad una marcata variabilità individuale, influenzata dalla somministrazione di farmaci anticonvulsivanti o sedativi con un effetto di cattiva regolazione della vaso-costrizione, e necessità di riscaldamento immediato. Ciò comporta un certo grado d'incertezza nel progettare in quanto tempo e per quale durata si otterrà la caduta della temperatura interna, dal momento che esiste una spiccata differenza individuale in ciascun neonato nel difendersi dall'ipotermia;

2) abbassamenti improvvisi della pressione sanguigna di grado moderato, ma con effetti più marcati nei neonati in condizioni critiche, visto che il mantenimento della pressione sistemica dipende dalla capacità del neonato in condizioni già critiche di operare una vaso-costrizione periferica efficace, che viene contrastata dalla presenza dei pannelli radianti sul tronco e gli arti. La somministrazione di benzodiazepine, il cui metabolismo epatico

è ridotto dall'ipotermia, facilita ulteriormente la vasodilatazione periferica, riduce la gittata cardiaca ed accentua quindi l'ipotensione in fase di riaumento della temperatura;

3) un incremento improvviso del fabbisogno di ossigeno in corso di ipotermia è stato attribuito, con una certa probabilità, alla comparsa di ipertensione polmonare: con fabbisogno di ossigeno già elevato il raffreddamento può costituire un rischio aggiuntivo. Peraltro il riaumento della temperatura che si rende improvvisamente necessario deve essere strettamente monitorizzato per il rischio di ipotensione sistemica e di *shunt* destro-sinistro e va quindi realizzato lentamente (non più di 0,5 °C/h);

4) bradicardia sinusale, senza effetti negativi evidenti, senza aritmie, con valori, segnalati da più autori tra 75 e 90/minuto.

Ipertermia

La comparsa di ipertermia di grado intermedio viene segnalata come un evento non rilevato ma comune nell'iperemia della fase postischemica cerebrale dopo la rianimazione. Una sua influenza negativa appare dimostrata, poiché produce: un'accelerazione nell'evoluzione del danno neuronale ischemico nelle regioni vulnerabili, un'estensione del danno a regioni non ordinariamente vulnerabili all'ischemia; un rilascio facilitato degli aminoacidi eccitatori, e infine una riduzione della funzione della barriera ematoencefalica [115].

Valutazioni tese ad approfondire i tempi e gli effetti della termoregolazione sul cervello immaturo hanno studiato l'esposizione a ipo o ipertermia. La comparsa di iperpiressia, spontanea o connessa con un difficoltoso controllo della bassa temperatura, anche di breve durata, (per 3 ore, 24 ore dopo l'insulto), peggiorava nettamente la prognosi, ove l'induzione di ipotermia lieve e di breve durata, associata ad antipiretici per una settimana, produceva effetti neuroprotettivi [116].

Altrettanto vale per una eventuale esposizione all'ipertermia prima, come in caso di febbre materna in corso di travaglio di parto, durante o dopo l'ipossia-ischemia con deterioramento neurologico più marcato, ed accelerazione dell'apoptosi [106].

Una componente importante degli interventi di rianimazione consiste quindi nel porre come un obiettivo principale la prevenzione dell'ipertermia.

Risultati a lungo termine

Una valutazione a lungo termine degli esiti neurologici ha generato marcate controversie cliniche e sperimentali. Studi prospettici di lunga durata esistevano soltanto su popolazioni infantili, con età media di 30

giorni, sottoposti a trapianto cardiaco con arresto circolatorio in ipotermia profonda (temperatura rettale di 18+/-0,5 °C, tempo di ipotermia di circa 14 minuti). La valutazione psicomotoria a distanza, fino a 2,5 anni appariva normale e non sembrava influenzata in modo negativo dall'arresto cardiocircolatorio prolungato, né dall'ipotermia profonda. Tali studi, sebbene la tecnica di raffreddamento prevedesse una protezione del capo con applicazione di ghiaccio, presentavano notevoli differenze cliniche e sperimentali [117].

Studi recenti [118] si sono occupati di definire la prognosi neuroevolutiva a lungo termine. Quaranta neonati (con EG \geq a 37 sett.), arruolati entro 2-5 ore dalla nascita, con caratteristiche non significativamente differenti per gestazione, nascita, peso, punteggio di Apgar (< di 6 a 5 minuti) e pH iniziale (< di 7,09) venivano collocati in gruppi, la cui temperatura rettale prevista era: con raffreddamento minimo 36,5 °C- 36 °C, medio 35,9-35,5 °C oppure a 34,5 °C e tale temperatura veniva mantenuta fino a 72 ore. Il controllo clinico dei pazienti prevedeva esami ecografici, TAC, EEG, esami ematici e colturali, oltre a dati demografici e clinici rilevanti (tipo di rianimazione, farmaci anticonvulsivanti od altri, ecc.). I neonati venivano seguiti fino 18 mesi di vita e valutati periodicamente con esami neurologici seriati e somministrazione a 18 mesi della *Bayley scales of infant development*.

All'esame dei risultati viene sottolineata la difficoltà di raccogliere in uno studio adeguato un numero sufficiente di casi, sebbene la casistica descritta dall'autore lascerebbe intendere un sensibile effetto protettivo sugli esiti a distanza nel gruppo di neonati raffreddati a 35-34,5 +/-0,5 °C, nonché, in generale, una sostanziale sicurezza dell'impiego dell'ipotermia. Gli stessi autori, assumendo come indicativo che l'abbassamento della temperatura rettale fosse raggiunta prima di 6 ore di vita e fosse associata con una riduzione del 30% dei decessi o di disabilità, ritengono comunque necessari 175 neonati in ciascun gruppo per completare un follow up valido. In ogni caso alcuni aspetti dello studio in questione appaiono di rilievo per progettare ricerche successive. Ciò perché nonostante i criteri d'ingresso risultino definiti, un numero significativo di casi con pH alterato e Apgar basso presentano poi un andamento sostanzialmente normale, suggerendo di utilizzare una combinazione di fattori clinici alla nascita per aumentare la specificità dei neonati da selezionare per il trattamento. Al contrario l'identificazione precoce, mediante EEG ad integrazione d'ampiezza, di un reperto anormale nelle prime sei ore, può indicare una prognosi comunque negativa tra l'80 e il 90% dei casi [119, 120].

Sulla base dell'insieme dei risultati sperimentali globalmente incoraggianti sono stati avviati due *trials* multicentrici di trattamento ipotermico precoce per neonati con encefalopatia ipossico-ischemica alla nascita ed un terzo è in corso di progettazione. Queste speri-

mentazioni hanno pianificato il raggiungimento di una temperatura inferiore a quella utilizzata negli studi di Gunn, ed un reclutamento di neonati con criteri ancora più stretti [121].

Conclusioni

La limitazione dello stress ossidativo, l'utilizzo di farmaci, il trattamento ipotermico sembrano punti emergenti nel campo delle strategie future per la neuroprotezione nell'ipossia-ischemia perinatale. Un loro studio settoriale più approfondito potrebbe far ipotizzare un trattamento combinato.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 22 ottobre 2001.

BIBLIOGRAFIA

- Finer NN, Robertson CM, Richards RT, Pinnell LE, Peters KL. Hypoxic-ischemic encephalopathy in term neonates: perinatal factors and outcome. *J Pediatr* 1981;98:112-7.
- Levene MI, Kornenberg J, Williams THC. The incidence and severity of post-asphyxial encephalopathy in full-term infants. *Early Human Devel* 1985;11:21-6.
- Thornberg E, Thiringer K, Odeback A, Milsom I. Birth asphyxia: incidence, clinical course and outcome in a Swedish population. *Acta Paediatr* 1995;84:972-32.
- Al-Afry A, Carroll JE, Devarajan LV, Moussa MA. Term infant asphyxia in Kuwait. *Ann Trop Paediatr* 1990;10:355-61.
- Airede AI. Birth asphyxia and hypoxic-ischemic encephalopathy: incidence and severity. *Ann Trop Paediatr* 1991;11:331-5.
- Boo NY, Lye MS. Factors associated with clinically significant perinatal asphyxia in the Malaysian neonates: a case control study. *J Tropical Paediatr* 1991;38:284-9.
- Kinoti SN. Asphyxia of the newborn in east, central and southern Africa. *East African Med J* 1993;70:422-33.
- Singh M, Deorari AK, Khajuria RC, Paul VK. A four year study on neonatal morbidity in a New Delhi hospital. *Ind J Med Res* 1991;94:186-92.
- Volpe JJ. Hypoxic-ischemic encephalopathy: clinical aspects. In: Volpe JJ (Ed.). *Neurology of the newborn*, ed. 3. Philadelphia: W.B. Saunders; 1994.
- Hossman KA. Neuronal survival and revival during and after cerebral ischemia. *Am J Emerg Med* 1983;1:191-7.
- Mc Cord JM. Oxygene-derived free radicals in postischemic tissue injury. *Eng J Med* 1985;312:159-63.
- Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: mechanism of damage and treatment. *J Neurosurg* 1992;77:337-54.
- Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994;15:7-10.
- Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress. *Arch Neurol* 1976;33:696-05.
- Youkin DP, Delivoria-Papadopoulos M, Maris J, Donlon E, Clancy R, Chancee B. Cerebral metabolic effects of neonatal seizures measured with *in vivo* 31P NMR spectroscopy. *Ann Neurol* 1986;20:513-9.
- Mc Donald JW, Johnston MV. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Brain Res Rev* 1990;15:41-70.
- Clozel M, Daval JL, Monin P, Debruc C, Morselli PL, Vert P. Regional cerebral blood flow during bicuculline-induced seizures in the newborn piglet: effect of phenobarbital. *Dev Pharmacol Ther* 1985;8:189-99.
- Saugstad OD. Practical aspects of resuscitating asphyxiated newborn infants. *Eur J Pediatr* 1998;157(Suppl):S11-5.
- Emergency cardiac care committee and subcommittee, American Heart Association: guidelines for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiac care: VII neonatal resuscitation. *JAMA* 1992;268:2276.
- Fisher DE, Paton JB. Resuscitation of the newborn infant. In: Klaus HK, Fanaroff AA (Ed.). *Care of the high - risk neonate*. Philadelphia: WB Saunders; 1993:38.
- Robertson NCR. Resuscitation of the new born. In: Robertson NCR (Ed.). *Textbook of neonatology*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1992:173.
- Niermeyer S, Kattwinkel J, Van Reempts P, Nadkarni V, Phillips B, Zideman D *et al*. International guidelines for neonatal resuscitation: an excerpt from guidelines 2000 for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care: International consensus on science. *Pediatrics* 2000;106:e29.
- Hutchison JH, Kerr MM, Williams KG *et al*. Hyperbaric oxygen in the resuscitation of the newborn. *Lancet* 1963;2:1019.
- Hutchison JH, Kerr MM, Inall J, Sharks RA. Controlled trials of hyperbaric oxygen and tracheal intubation in asphyxia neonatorum. *Lancet* 1966;1:935.
- Fridovich I. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1970;244:3855.
- Saugstad OD. Resuscitation of newborn infants - do we need new guidelines? *Prenatal Neonatal Med* 1996;1:26.
- Huch A, Huch R, Rooth G. Monitoring the intravascular pO₂ in newborn infants. *J Perinatal Med* 1973;3:317-21.
- Rootwelt T, Odden J-P, Hall C, Saugstad OD. Regional blood flow during hypoxemia and resuscitation with 21% or 100% oxygen in newborn pigs. *J Perinatal Med* 1996;24:227.
- Feet BA, Yu X, Rootwelt T, Oyasaeter S, Saugstad OD. Effects of hypoxemia and reoxygenation with 21% or 100% O₂ in newborn piglets. Extracellular hypoxanthine in cerebral cortex and femoral muscle. *Crit Care Med* 1997;25:1384-96.
- Ramji S, Ahuja S, Thirupuram S, Rootwelt T, Saugstad OD, Rooth G. Resuscitation of asphyxiated newborn infants with room air or 100% oxygen. *Pediatr Res* 1993;34:809-12.

31. Saugstad OD, Rootwelt T, Aalen O. Resuscitation of asphyxiated newborn infants with room air or oxygen: an international controlled trial: the Resair 2 study. *Pediatrics* 1998; 102:e1.
32. Hutchison AA. Recovery from hypopnea in preterm lambs: effects of breathing air or oxygen. *Pediatr Pulmonol* 1987;3:317-27.
33. Mortola JP, Frappell PB, Frappell DE, Villena-Cabrera N, Villena-Cabrera M, Pena F. Ventilatory and metabolic responses to acute hyperoxia in newborn. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:11.
34. Leahy FAN, Cates D, Mac Callum M, Rigatto H. Effect of CO₂ and 100% O₂ on cerebral blood flow in preterm infants. *J Appl Physiol* 1989;67:1551.
35. Lundstrom K, Pryds O, Greisen G. Oxygen at birth and prolonged cerebral vasoconstriction in preterm infants. *Arch Dis Child* 1995;73:F81.
36. Saugstad OD, Aasen AO. Plasma hypoxanthine concentrations in pigs. A prognostic aid in hypoxia. *Eur Surg Res* 1993;81:22.
37. Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci* 1996;21:83-9.
38. Bagenholm R, Nilsson UA, Gotborg CW, Kjellmer I. Free radicals are formed in the brain of the fetal sheep during reperfusion after cerebral ischemia. *Pediatr Res* 1998;43:271-7.
39. Andersen CB, Hoffman DJ, Du C *et al*. Effect of reoxygenation with 21% or 100% oxygen on free radical formation following hypoxia in the cerebral cortex of newborn piglets. *Pediatr Res* 1997;41:30A.
40. Sanderud J, Norstein J, Saugstad OD. Reactive oxygen metabolites produce pulmonary vasoconstriction in young pigs. *Pediatr Res* 1991;29:543-63.
41. Archer SL, Peterson D, Nelson DP, DeMaster EG, Kelly B, Eaton JW *et al*. Oxygen radicals and antioxidant enzymes alter pulmonary vascular reactivity in the rat lung. *J Appl Physiol* 1989; 66:102-11.
42. Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T *et al*. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. *Stroke* 1994;25:1469-71.
43. Etzioni A. Adhesion molecules-their role in health and disease. *Pediatr Res* 1996;39:1991-9.
44. Mc Rae A, Gilland E, Bona E, Hagberg H. Microglia activation after neonatal hypoxic-ischemia. *Brain Res Dev Res* 1995;84:245-56.
45. Nakai A, Asakura H, Taniuchi Y, Koshino T, Araki T, Siesjo BK. Effect of alpha-phenil-N-tert-butyl nitron (PBN) on fetal cerebral energy metabolism during intrauterine ischemia and reperfusion in rats. *Pediatr Res* 2000;47:451-6.
46. Vento M, Asensi M, Sastre J, Garcia-Sala F, Vina J. Six years of experience with the use of room air for the resuscitation of asphyxiated newly born term infants. *Biol Neonate* 2001;79:261-7.
47. Huang CC, Yonetani M, Lajevardi N, Delivoria-Papadopoulos M, Wilson DF, Pastuszko A. Comparison of postasphyxial resuscitation with 100% and 21% oxygen on cortical oxygen pressure and strial dopamine metabolism in newborn piglets. *J Neurochem* 1995;64:292-9.
48. Danielisova V, Marsala M, Chavko M, Marsala J. Posts ischemic hypoxia improves metabolic and functional recovery of the spinal cord. *Neurology* 1990;40:1125-9.
49. Burda J, Marsala M, Radonak J, Marsala J. Graded posts ischemic reoxygenation ameliorates inhibition of cerebral cortical protein synthesis in dogs. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991;11:1001-11.
50. Perry MA, Wadhawa SS. Gradual reintroduction of oxygen reduces reperfusion injury in cat stomach. *Am J Physiol* 1988; 254:G366.
51. Phillis JW. A radical view of cerebral ischemic injury. *Prog Neurobiol* 1994;42:441-8.
52. Groenendaal F, Shadid M, Mc Gowan JE, Mishra OP, Van Bel F. Effects of deferoxamine, a chelator of free iron, on Na⁺, K⁺-ATPase activity of cortical brain cell membrane during early reperfusion after hypoxia-ischemia in newborn lambs. *Pediatr Res* 2000;48:560-4.
53. Dorrepaal CA, Berger HM, Benders MJNL, Van Zoren-Grobben D, Van de Bor M, Bel F. Nonprotein-bound iron in postasphyxial reperfusion injury of the newborn. *Pediatrics* 1996;98:883-9.
54. Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Anti-oxidant enzymes in fetal guinea pig brain during development and effect of maternal hypoxia. *Dev Brain Res* 1988;42:173-9.
55. Tan S, Zhou F, Wang Z-W *et al*. Administration of antioxidants to the mother after onset of fetal bradycardia ameliorates fetal brain injury in rabbits. *Pediatr Res* 1997;41:182A.
56. Bass WT, Malati N, Castel MC, White LE. Evidence for the safety of ascorbic acid administration to the premature infant. *Am J Perinatol* 1998;15:133-40.
57. Shadid M, Moison RMW, Steendijk P, Hiltermann L, Berger HM, Van Bel F. The effect of antioxidative combination therapy on post-ischemic perfusion, metabolism and electrical activity of the newborn brain. *Pediatr Res* 1994;44:119-24.
58. Liu TH, Beckman JS, Freeman BA. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am J Physiol* 1989;256:H589-3.
59. Rosenberg AA, Murdaugh E, Withe CW. The role of oxygen free radicals in post asphyxia cerebrum hypoperfusion in newborn lambs. *Pediatr Res* 1989;26:215-20.
60. A randomized trial of tirilazad mesylate in patients with acute stroke (RANTTAS). The RANTTAS investigators. *Stroke* 1996; 27:453-8.
61. Fleishaker JC, Peters GR. Pharmacokinetics of tirilazad and U-89678 in ischemic stroke patients receiving a loading regimen and maintenance regimen of 10mg/kg/day of tirilazad. *J Clin Pharmacol* 1996;36:809-13.
62. Ko KM, Godin DV. Inhibition of transition metal ion-catalysed ascorbate oxidation and lipid peroxidation by allopurinol and oxypurinol. *Biochem Pharmacol* 1990;40:803-9.
63. Van Bel F, Shadid M, Moison RMW, Dorrepaal CA, Fontijn J, Monteiro L *et al*. Effect of allopurinol on postasphyxial free radical formation, cerebral hemodynamics and electrical brain activity. *Pediatrics* 1998;101:185-93.
64. Parks DA, Granger DN. Ischemia-induced vascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol* 1983; 245:G285-9.

65. Palmer C, Vannucci RC, Towfighi J. Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol. *Pediatr Res* 1990;27:332-6.
66. Franke CL, Palm R, Dalby M, Schoonderwaldt HC, Hantson L, Eriksson B *et al.* Flunarizine in stroke treatment (FIST): a double-blind, placebo-controlled trial in Scandinavia and Netherlands. *Acta Neurol Scand* 1996;93:56-60.
67. Hudome S, Palmer C, Roberts RL, Mauger D, Housman C, Towfighi J. The role of neutrophils in the production of hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *Pediatr Res* 1997;41:607-16.
68. Lindsay S, Liu TH, Xu JA, Marshall PA, Thompson JK, Parks DA *et al.* Role of xanthine dehydrogenase and oxidase in focal cerebral ischemic injury to rat. *Am J Physiol* 1991;259:H2051-7.
69. Russel GA, Cooke RW. Randomised controlled trial of allopurinol prophylaxis in very preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 1995;73:F27-31.
70. Vannucci RC, Perlman JM. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 1997;100:1004-14.
71. Mc Gaurn SP, Davis LE, Krawczeniuk MM, Murphy JD, Jacobs ML, Norwood WI *et al.* The pharmacokinetics of injectable allopurinol in newborns with the hypoplastic left heart syndrome. *Pediatrics* 1994;94:820-3.
72. Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol* 1999;9:119-31.
73. Iadecola C, Zhang F, Xu X. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am J Physiol* 1995;268:R286-92.
74. Dorrepaal CA, Van Bel F, Moison RMW, Shadid M, Van de Bor M, Steendijk P *et al.* Oxidative stress during post hypoxic-ischemic reperfusion in newborn lamb: the effect of nitric oxide synthesis inhibition. *Pediatr Res* 1997;41:321-6.
75. Dorrepaal CA, Shadid M, Steendijk P, Van der Velde ET, Van de Bor M, Baan J *et al.* Effect of post hypoxic-ischemic inhibition of nitric oxide synthesis on cerebral blood flow, metabolism and electrocortical brain activity in newborn lambs. *Biol Neonate* 1997;72:216-26.
76. Higuchi Y, Hattori H, Kume T, Tsuji M, Akaike A, Furusho K. Increase in nitric oxide in the hypoxic-ischemic neonatal rat brain and suppression by 7-nitroindazole and aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* 1998;342:47-9.
77. Tsuij M, Higuchi Y, Shiraishi K, Kume T, Akaike A, Hattori H. Protective effect of aminoguanidine on hypoxic-ischemic brain damage and temporal profile of brain nitric oxide in neonatal rats. *Pediatr Res* 2000;47:79-83.
78. Levene MI, Gibson NA, Fenton AC, Papatoma E, Barnett D. The use of a calcium-channel blocker, nifedipine, for severely asphyxiated newborn infants. *Dev Med Child Neurol* 1990;32:567-74.
79. Greenwood K, Cox P, Mehmet H, Penrice J, Amess PN, Cady EB *et al.* Magnesium sulfate treatment after transient hypoxia-ischemia in the newborn piglet does not protect against cerebral damage. *Pediatr Res* 2000;48:346-50.
80. Levene MI, Blennow M, Whitelaw A, Hanco E, Fellman V, Hartly R. Acute effects of two different doses of magnesium sulphate in infants with birth asphyxia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1995;73:F174,F177.
81. Hudome S, Palmer C, Roberts RL, Mauger D, Housman C, Towfighi J. The role of neutrophils in the production of hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *Pediatr Res* 1997;41:607-16.
82. Jean WC, Spellman SR, Nussbaum ES, Low W. Reperfusion injury after focal cerebral ischemia: the role of inflammation and the therapeutic horizon. *Neurosurgery* 1998;43:1382-97.
83. Silverstei FS, Barks JD, Hagan P, Liu XH, Ivacko J, Szaflarski J. Cytokines and perinatal brain injury. *Neurochem Int* 1997;30:375-83.
84. Kadoya C, Domino EF, Yang GY, Stren JD, Betz AL. Preischemic but not postischemic zinc protoporphyrin treatment reduces infarct size and edema accumulation after temporary focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1995;26:1035-8.
85. Matsuo Y, Kihara T, Ikeda M, Ninomiya M, Onodera H, Kogure K. Role of platelet-activating factor and thromboxane A2 in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain. *Brain Res* 1996;709:296-302.
86. Prehn JHM, Backhauss C, Kriegelstein J. Transforming growth factor- β 1 prevents glutamate neurotoxicity in rat neocortical cultures and protects mouse neocortex from ischemic injury *in vivo*. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993;13:521-5.
87. Clemens JA, Stephenson DT, Yin T, Smalstig EB, Panetta JA, Little SP. Drug-induced neuroprotection from global ischemia is associated with prevention of persistent but not transient activation of nuclear factor-KappaB in rats. *Stroke* 1998;29:677-82.
88. Yagi T, Jikihara I, Fukumura M, Watabe K, Ohashi T, Eto Y *et al.* Rescue of ischemic brain injury by adenoviral gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor after transient global ischemia in gerbils. *Brain Res* 2000;11:R1-4.
89. Rabuffetti M, Sciorati C, Tarozzo G, Clementi E, Manfredi AA, Beltramo N. Inhibition of caspase-1-like activity by Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-Chloromethyl ketone induces long-lasting neuroprotection in cerebral ischemia through apoptosis reduction and decrease of proinflammatory cytokines. *J Neurosci* 2000;20:4398-404.
90. Klempt ND, Klempt M, Gunn AJ, Singh K, Gluckman PD. Expression of insulin-like growth factor binding protein 2 (IGF-BP2) following transient hypoxia-ischemia in the infant rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1992;15:55-61.
91. Jin KL, Mao XO, Nagayama T, Goldsmith PC, Greenberg DA. Induction of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 alpha by global ischemia in rat brain. *Neuroscience* 2000;99:577-85.
92. 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;41:5521-9.
93. Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem* 1994;269:19488-93.

94. Juul SE, Andreson DK, Li Y, Christensen RD. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res* 1998;43:40-9.
95. Juul SE, Yachnis AT, Roijani AM, Christensen RD. Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr Dev Pathol* 1992;2:148-58.
96. Juul SE, Harcum J, Li Y, Christensen RD. Erythropoietin is present in the cerebrospinal fluid of neonates. *J Pediatr* 1997;130:428-30.
97. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C *et al.* Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10526-31.
98. Wrighton NC, Farrel FX, Chang R, Kashyap AK, Barbone FP, Mulcahy LS *et al.* Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science* 1996;273:458-64.
99. Westin B, Miller JA, Nyberg R, Wedenberg E. Neonatal asphyxia pallida treated with hypothermia alone or with hypothermia and transfusion of oxygenated blood. *Surgery* 1959;45:868-79.
100. Bona E, Loberg EM, Bagenholm R, Hagberg H, Thoresen M. Protective effects of moderate hypothermia after hypoxia-ischemia in a neonatal rat model: short and long term outcome. *Pediatr Res* 1998;43:738-45.
101. Thoresen M, Penrice J, Lorek A, Wyatt J, Cady EB, Wylezinska M *et al.* Mild hypothermia following severe transient hypoxia-ischemia ameliorates delayed ("secondary") cerebral energy failure in the newborn piglet. *Pediatr Res* 1995;5:667-70.
102. Laptook AR, Corbett RJ, Sterret R, Burns DK, Tolefsbol G, Garcia D. Modest hypothermia provides partial neuroprotection for ischemic neonatal brain. *Pediatr Res* 1994;35:436-42.
103. Sirimanne ES, Blumberg RM, Bossano D, Gunnong M, Edwards AD, Gluckman PD *et al.* The effect of prolonged modification of cerebral temperature on the outcome after hypoxic-ischemic brain injury in the infant rat. *Pediatr Res* 1996;39:591-7.
104. Marion Dwea. Treatment of traumatic brain injury with moderate hypothermia. *N Engl J Med* 1997;336:540-6.
105. Simbruner G, Haberk C, Harrison V, Linley L, Willeitner AE. Induced brain hypothermia in asphyxiated human newborn infants: a retrospective chart analysis of physiological and adverse effects. *Intensive Care Med* 1999;25:1111-7.
106. Towfighi J, Ousmann C, Heitian DF, Vannucci RC, Jager JY. The effect of focal cerebral cooling of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Acta Neurophatol* 1994;87(6):598-604.
107. Nedelcu J, Klein MA, Aguzzi A, Martin E. Resuscitative hypothermia protects the neonatal rat brain from hypoxic-ischemic injury. *Brain Pathol* 2000;10(1):61-71.
108. Gunn AJ, Gunn TR, de Haan HH, Williams CE, Gluckman PD. Dramatic neuronal rescue with prolonged selective head cooling after ischemia in fetal lambs. *J Clin Invest* 1997;99:248-56.
109. Gunn AJ, Gluckman PD, Gunn TR. Selective head cooling in newborn infants after perinatal asphyxia: a safety study. *Pediatrics* 1998;102:885-92.
110. Kady EB, D'Souza PC, Penrice J, Lorek A. The estimation of local brain temperature by *in vivo* 1H magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 1995;33:862-7.
111. Van Leeuwen GMJ, Hand JW, Yan JW, Lagedijk JJW, Azzopardi DV, Edwards AD. Numerical modeling of temperature distributions within the neonatal head. *Pediatr Res* 2000;48:351-6.
112. Thoresen M, Simmonds M, Satas S, Tooley J, Silver JA. Effective selective head cooling during post-hypoxic hypothermia in newborn piglet. *Pediatr Res* 2001;49(4):594-9.
113. Haaland K, Loberg EM, Steen PA, Satas S, Thoresen M. Post hypoxic hypothermia in newborn piglets. *Prenat Neonat Med* 1997;2:329-37.
114. Thoresen M, Whitelaw A. Cardiovascular changes during mild therapeutic hypothermia and rewarming in infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2000;106:92-9.
115. Rumna CS, Gopinath SP, Uzura M, Valadka AB, Robertson CS. Brain temperature exceeds systemic temperature in head-injured patients. *Crit Care Med* 1998;26:562-7.
116. Reith J, Jorgensen HS, Pedersen PM, Nakayama H, Raaschou HO, Jeppesen LL *et al.* Body temperature in acute stroke: relation to stroke severity, infarct size, mortality and outcome. *Lancet* 1996;347:422-5.
117. Eke C, Gundry RS, Baum MF, Chinnoek RE, Razzouk AJ, Bailey LL. Neurologic sequelae of deep hypothermic circulatory arrest in cardiac transplant infants. *Ann Thorac Surg* 1996;61:783-8.
118. Battin MR, Dezoete JA, Gunn TR, Gluckman PD, Gunn AJ. Neurodevelopmental outcome of infants treated with head cooling and mild hypothermia after perinatal asphyxia. *Pediatrics* 2001;107(3):480-4.
119. Al Naqeeb N, Edwards AD, Cowan FM, Azzopardi D. Assessment of neonatal encephalopathy by amplitude-integrated electroencephalography. *Pediatrics* 1999;103:1263-71.
120. Toet MC, Hellstrom-Westas L, Groenendaal F, Eken P, De Vries LS. Amplitude integrated EEG 3 and 6 hours after birth in full term neonates with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999;81:F19-F23.
121. Thoresen M, Whitelaw A. Cardiovascular change during mild therapeutic hypothermia and rewarming in infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2000;106:92-9.

Ruolo della semeiotica neurologica nella valutazione e nella prognosi del neonato a termine asfittico

Andrea GUZZETTA, Enrico BIAGIONI e Giovanni CIONI

Fondazione Stella Maris e Divisione di Neuropsichiatria Infantile,
Università degli Studi, Pisa

Riassunto. - L'encefalopatia ipossico-ischemica, ovvero la sindrome neurologica che consegue direttamente all'asfissia neonatale, rappresenta una delle principali cause di sequele neurologiche tra i neonati a termine. Nonostante il costante arricchimento di dotazioni strumentali per la diagnosi precoce, come le indagini elettrofisiologiche e le neuroimmagini, la semeiotica neurologica ha mantenuto un ruolo centrale nell'inquadramento clinico del neonato asfittico, confermando la sua importante valenza prognostica. La facilità di esecuzione dell'esame neurologico e la sua ripetibilità permettono infatti un monitoraggio del funzionamento neuropsichico delle primissime fasi dello sviluppo, che risulta altamente correlato con la successiva evoluzione clinica. In questo lavoro riportiamo la nostra esperienza ed una rassegna più generale sul tema del ruolo della semeiotica neurologica nella formulazione di una corretta previsione prognostica nei neonati con encefalopatia ipossico-ischemica.

Parole chiave: encefalopatia ipossico-ischemica, neonato, esame neurologico, *general movements*, prognosi.

Summary (*Role of neurological assessment in the evaluation and prognosis of asphyxiated term newborns*). - Hypoxic-ischaemic encephalopathy, the clinical neurological syndrome that follows birth asphyxia, is one of the main causes of neurological sequelae in term newborns. Despite the advent of new imaging and neurophysiological techniques in the last two decades, the value of the neurological assessment of the newborn has not been reduced. The possibility to perform easily serial neurological evaluations allows a detailed and non-invasive follow up of the early developmental processes, providing reliable prognostic information. In this paper we report our experience and a more general review of the literature on the prognostic value of the neurological assessment in term newborns with hypoxic-ischaemic encephalopathy.

Key words: hypoxic-ischaemic encephalopathy, newborn, neurologic test, general movements, prognosis.

Introduzione

Uno dei principali obiettivi che la disciplina della neurologia neonatale si pone da sempre, consiste nella possibilità di prevedere precocemente e correttamente la prognosi dei piccoli pazienti con rischio neurologico. Tale compito di predittività, che riguarda sostanzialmente ogni ambito del sapere medico, è tuttavia particolarmente complesso se applicato alle fasi precoci della vita, per diversi ordini di ragioni. In primo luogo, le condizioni cliniche del neonato risentono spesso dell'influenza negativa di fattori stressanti acuti verificatisi intorno all'evenienza del parto. Inoltre, il neonato in terapia intensiva è spesso sottoposto a terapie farmacologiche che possono alterare transitoriamente il funzionamento neuropsichico, basti pensare a questo proposito agli effetti di sedazione di alcuni farmaci utilizzati nella profilassi e nella terapia delle convulsioni. Tutto questo rende più ardua l'interpretazione delle manifestazioni cliniche precoci e riduce l'accuratezza delle valutazioni effettuate nei primi giorni di vita. Inoltre, come è noto, nelle prime fasi dello sviluppo il cervello è ancora dotato

di grandi capacità di riorganizzazione plastica, sia funzionale che anatomica, le quali, se da un lato costituiscono la base di un recupero talvolta inaspettato, dall'altro rendono più complessa la previsione sull'evoluzione del quadro clinico.

Queste considerazioni, valide per tutto l'ambito della neurologia neonatale, assumono un particolare rilievo nel caso della sindrome asfittica, che costituisce, dopo la prematurità, la principale ragione di consultazione del neurologo nelle unità di terapia intensiva neonatale. Il neonato asfittico si trova infatti ad aver subito un insulto cerebrale acuto nell'immediatezza della nascita, dopo uno sviluppo intrauterino che spesso è avvenuto in modo del tutto regolare, e in conseguenza di tale evento corre seriamente il rischio di compromettere in modo irreversibile il proprio successivo sviluppo neuropsichico. In queste circostanze si fa sentire molto pressante la richiesta, sia da parte dei familiari che dei clinici, di una precisa quantificazione dell'entità del danno che il neonato ha subito, e di una stima delle possibili conseguenze che ne deriveranno, soprattutto per quanto concerne lo sviluppo neuropsichico.

L'encefalopatia ipossico-ischemica

Quando all'evento asfittico segue un interessamento del sistema nervoso centrale, ovvero si manifesta nelle ore e giorni successivi all'asfissia una chiara sindrome neurologica neonatale, si parla di encefalopatia ipossico-ischemica (EII), la quale rappresenta tuttora nel mondo occidentale una delle principali cause di sequele neurologiche tra i neonati a termine [1, 2]. Dal punto di vista clinico l'EII consiste in un pattern caratteristico di segni e sintomi neurologici che seguono l'asfissia perinatale e che progrediscono con modalità pressoché costante. La severità di tali segni dipende in gran parte dalla durata dell'asfissia cui il neonato è stato sottoposto, e può essere valutata in base alle manifestazioni cliniche del soggetto [3]. I primi a fornire una classificazione clinica dell'EII, sono stati Sarnat e Sarnat nel 1976, distinguendo tre gradi di severità: lieve, moderata e grave [4]. Sebbene questa e le successive classificazioni permettano di graduare la gravità dei diversi quadri clinici, la loro predittività risulta insoddisfacente, soprattutto nelle forme a gravità intermedia la cui evoluzione è incerta [1, 5]. Per questo motivo nel corso degli anni un grande sforzo è stato compiuto nello sperimentare nuove metodiche di indagine che permettessero una migliore accuratezza prognostica. Tra queste sono risultate certamente fondamentali le indagini elettrofisiologiche, EEG e potenziali evocati [6-9], e le più recenti tecniche di neuroimaging come la risonanza magnetica nucleare (RMN) [10-12], la *diffusion weighted* RMN [13] e la spettroscopia [14, 15]. Allo stato attuale non sembra tuttavia possibile individuare alcuno strumento clinico che, utilizzato isolatamente, presenti una predittività assoluta.

La valutazione clinica del neonato asfittico

Concetti generali

Nonostante il costante arricchimento in termini di dotazioni cliniche e strumentali in questo ambito, particolarmente florido nelle ultime decadi, alcuni assunti generali sulla predittività degli strumenti diagnostici possono considerarsi sempre validi [3]. In primo luogo, tutti i test predittivi, clinici e strumentali, aumentano la loro accuratezza nei casi collocati ai due estremi dello spettro clinico, come la normalità o l'estrema gravità, piuttosto che nelle condizioni intermedie. Inoltre, risultano più predittivi quando vengono ripetuti più volte a distanza ravvicinata ed analizzati complessivamente, piuttosto che sulla base di singole osservazioni. Come conseguenza di ciò, l'approccio più indicato alla valutazione del neonato asfittico rimane a tutt'oggi quello basato sull'analisi ragionata ed integrata dei diversi strumenti disponibili, soprattutto se interpretati in

un'ottica evolutiva che tenga conto dell'epoca di insorgenza del danno e delle capacità di riorganizzazione e recupero. Le sofisticate tecniche messe a punto negli ultimi anni, con in primo luogo le metodiche di neuroimaging, non sembrano in grado di rimpiazzare la valutazione clinica come strumento centrale della valutazione del neonato asfittico. Al contrario, appaiono averne significativamente rafforzato il ruolo, consentendo una migliore correlazione tra il danno biologico o anatomico, ed i pattern di manifestazione neuropsichica.

Nei prossimi paragrafi verrà analizzato l'apporto della semeiotica neurologica alla formulazione di una corretta previsione prognostica nei neonati a termine con encefalopatia ipossico-ischemica. In particolare verranno discussi alcuni contributi forniti dal nostro gruppo in anni recenti su due temi di nuovo interesse: a) il valore di valutazioni neurologiche seriate, integrate con le tecniche di neuroimaging, nella valutazione e nella prognosi del neonato asfittico e b) l'applicazione a tale patologia delle recenti metodiche semeiologiche basate sull'osservazione dei *general movements* (GM) sviluppate dalla scuola di Heinz Prechtl.

Indici clinici globali

Numerosi indici clinici sono correntemente utilizzati nella valutazione del neonato asfittico. Un indicatore globale di funzionamento, misurato nei primissimi minuti di vita, è costituito dal punteggio di Apgar. Questo indice è in uso ormai da 50 anni, e studi recenti hanno confermato il suo valore predittivo per la mortalità nel primo mese di vita, superiore a quello del pH dell'arteria ombelicale [16]. Sebbene numerosi studi abbiano dimostrato una scarsa correlazione di tale indice con il grado di asfissia e, soprattutto, con l'evoluzione e l'*outcome* neuropsichico, la facilità di applicazione e la sua ampia diffusione nella pratica clinica, lo rendono ancora oggi uno strumento utile per lo screening dei soggetti a rischio [17, 18]. Una valutazione clinica più approfondita è costituita dalla già citata classificazione di Sarnat e Sarnat, basata sull'analisi di diversi aspetti dell'assetto neurologico, come lo stato di coscienza, il tono muscolare, i riflessi, la funzione del sistema neurovegetativo e la presenza di convulsività [4]. Diversi studi longitudinali hanno dimostrato la validità di tale approccio, evidenziando tuttavia alcuni limiti non trascurabili. In linea generale, come già accennato, questa classificazione presenta un alto valore predittivo per le categorie agli estremi dello spettro clinico: tutti i soggetti con un grado lieve di encefalopatia ipossico-ischemica presentano un *outcome* nella norma, mentre tutti quelli con una forma severa vanno incontro ad importanti disabilità motorie e/o ritardo cognitivo, o all'*exitus*. Al contrario, la prognosi rimane incerta nelle forme

intermedie, che conservano in una percentuale non trascurabile il rischio di un'evoluzione anche grave [1, 5].

La semeiotica neurologica

In questo contesto si collocano i numerosi tentativi di mettere a punto tecniche semeiologiche più specifiche di valutazione del neonato con sofferenza asfittica. I maggiori sistemi di valutazione neurologica tradizionale sono stati applicati al neonato a termine a rischio, con risultati che presentano spiccate concordanze sul piano della predittività, tanto da far condividere unanimemente alcuni concetti di massima [19-23]. Un esame neurologico normale alla nascita può considerarsi consistentemente associato ad uno sviluppo neuropsichico regolare. Per contro, la maggior parte dei soggetti che sviluppano un deficit neuromotorio e/o cognitivo nel corso dell'età evolutiva, presentavano quasi invariabilmente alla nascita un esame neurologico alterato. Se ne deduce che il vero fattore limitante la predittività sia rappresentato dal numero di falsi positivi, ovvero di soggetti con quadro clinico inizialmente alterato, ma che recuperano successivamente. Alcune possibili ragioni di ciò sono state accennate all'inizio, e consistono sostanzialmente nell'influenza che esercitano sul comportamento del neonato alcuni fattori solo transitoriamente coinvolti nel funzionamento neuropsichico, come la presenza di patologie internistiche acute concomitanti o la somministrazione di farmaci per la profilassi e cura degli episodi convulsivi. Per queste ed altre ragioni, la predittività dell'esame neurologico è attesa incrementarsi con il passare dei giorni, quando ci si allontana progressivamente dall'evento lesivo.

L'esame neurologico classico: recenti applicazioni

Lo studio del valore prognostico dell'esame neurologico, e della sua predittività in funzione dell'epoca di somministrazione dell'esame è stato oggetto di una recente ricerca dell'Hammersmith Hospital di Londra in collaborazione con il nostro gruppo [22]. Novanta neonati a termine con sofferenza ipossico-ischemica sono stati testati utilizzando l'esame neurologico standardizzato di Dubowitz *et al.* [24], immediatamente dopo l'ammissione in terapia intensiva neonatale, e longitudinalmente a distanza di pochi giorni nel primo mese di vita. Tutti i soggetti sono stati inoltre sottoposti ad almeno un esame di RMN nei primi giorni di vita, con controllo tra 4 e 6 settimane. L'*outcome* è stato valutato tra i 18 mesi e i 5 anni, mediante l'utilizzo di scale di sviluppo e valutazioni neurologiche standardizzate.

Sebbene i risultati di questa ricerca siano stati in buona parte concordi con i precedenti lavori sopra citati, alcuni nuovi elementi di interesse meritano di essere

sottolineati. Mentre un esame neurologico normale è risultato sempre associato ad uno sviluppo nella norma, indipendentemente dall'epoca in cui venisse eseguito (assenza di falsi negativi), un esame anormale non risultava sempre associato ad un *outcome* sfavorevole (presenza di falsi positivi). Tuttavia, il valore predittivo dell'esame migliorava sensibilmente con il passare dei giorni tanto che alla fine della terza settimana i falsi positivi si erano ridotti a meno dell'1% (Fig. 1). In altre parole, dopo appena tre settimane dalla nascita, l'esame neurologico si rivelava altamente predittivo con un valore prognostico paragonabile a quello di tecniche di indagine molto più complesse e costose.

Grazie all'utilizzo contemporaneo delle tecniche di neuroimaging, è stato possibile correlare alcuni pattern di espressione clinica alle diverse tipologie di lesione visibili alla RMN. Ad esempio, tutti i soggetti con RMN normale o coloro che mostravano lievi alterazioni dei nuclei della base o della sostanza bianca, potevano presentare nelle prime due settimane un esame neurologico anormale che però tendeva a migliorare entro la terza settimana, lasciando talvolta esclusivamente una modesta riduzione di tono del tronco o del capo. L'*outcome* era sempre favorevole. Al contrario, tutti i soggetti con lesioni importanti a carico dei nuclei della base, frequenti in caso di asfissia grave, presentavano alterazioni globali dell'esame neurologico indipendenti dall'epoca di somministrazione dell'esame, e mostravano un'evoluzione invariabilmente patologica. Tra questi, i pattern neurologici più frequentemente riscontrati consistevano in una ipotonia diffusa e persistente, o in una anomala distribuzione del tono con prevalenza del tono estensorio dei muscoli del tronco e del collo, e postura preferenziale con arti inferiori estesi e superiori flessi. L'*outcome* motorio era sempre costituito dalla paralisi cerebrale.

I risultati di questo studio dimostrano che l'esame neurologico tradizionale può essere considerato uno strumento affidabile e con elevato valore prognostico

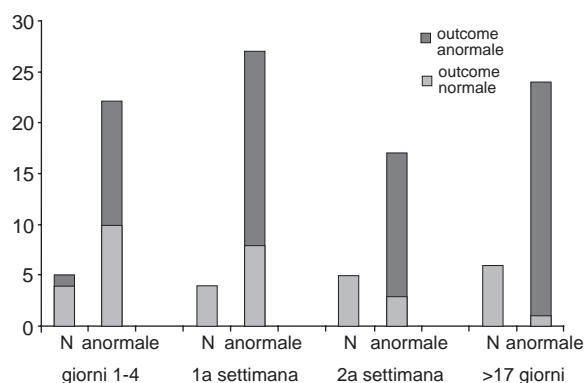


Fig. 1. - Valutazioni neurologiche raggruppate in base all'epoca di esecuzione e all'*outcome*, in un gruppo di neonati a termine con encefalopatia ipossico-ischemica. N = esame neurologico normale (modificata da [22]).

nei neonati a termine con EII. Attraverso una corretta interpretazione dei segni clinici in relazione all'epoca di somministrazione dell'esame, è possibile in una certa misura prevedere il tipo di evoluzione e la severità dell'*outcome*. Tali informazioni appaiono complementari a quelle fornite da altri strumenti clinici altamente specialistici come la RMN, l'EEG o la spettroscopia, e risultano pertanto particolarmente utili nelle sedi dove tali metodiche non siano prontamente disponibili.

Nuove prospettive: la valutazione della motricità spontanea

Nel corso delle ultime due decadi una nuova metodica per la semeiotica neurologica del neonato e del lattante è stata messa a punto dal gruppo di Prechtl [25, 26]. Questa tecnica, basata sull'osservazione dei movimenti spontanei, ha già dimostrato in numerosi trial clinici di possedere un'elevata affidabilità e potere predittivo sia nella valutazione del prematuro che del nato a termine [27-30].

Il feto ed il neonato producono un elevato numero di movimenti spontanei, che interessano tutte le parti del corpo, con una sequenza variabile e con sovrapposte delle componenti distali rotazionali. La loro durata va da qualche secondo ad alcuni minuti, e le loro caratteristiche sono simili nel feto e nel neonato esprimendo una vera e propria continuità di pattern motori tra prima e dopo la nascita [25]. Tali movimenti sono ormai concordemente definiti nella letteratura internazionale come *general movements* (GM). Intorno ai due mesi di vita i GM si modificano, passando da movimenti con carattere contorsivo, apparentemente più rigidi e più lenti (*writhing movements*), a movimenti più fluidi ed eleganti, di ridotta ampiezza e più ricchi di componenti rotazionali distali (*fidgety movements*) [31-33].

I primi studi che hanno esaminato sistematicamente le caratteristiche dei movimenti spontanei nei soggetti normali ed in quelli con lesioni cerebrali, hanno dimostrato come non esistano differenze significative nella frequenza e nella durata dei pattern motori spontanei tra questi due gruppi, e che pertanto l'analisi di indici *quantitativi* del movimento risulti scarsamente predittiva. Al contrario, la motricità spontanea dei neonati con lesioni è risultata sensibilmente differente dal punto di vista *qualitativo*, essendo lenta e monotona, oppure brusca e caotica, ovvero priva di complessità e fluenza. L'analisi della motricità spontanea intesa come capacità di discriminare queste differenze qualitative del movimento si è dimostrata pertanto strumento diagnostico e prognostico di elevata affidabilità [34].

L'analisi qualitativa del movimento mediante l'osservazione dei GM è stata recentemente applicata allo studio dei neonati a termine con EII, ed il suo valore prognostico è stato comparato a quello dell'esame neurologico tradizionale [30-35]. Anche nel caso della valutazione dei GM si è confermata l'importanza di eseguire delle valutazioni seriate longitudinali per una migliore definizione della prognosi. Questa metodica infatti, presenta un sensibile aumento del proprio valore prognostico con il passare dei giorni, ovvero allontanandosi dall'evento lesivo, con sensibile riduzione del numero dei falsi positivi (Fig. 2). Anche in questo studio questa tendenza si è confermata ugualmente valida per l'esame neurologico tradizionale, che si è dimostrato tuttavia più tardivo nell'identificazione dei disordini neurologici transitori, ovvero si è normalizzato in epoca lievemente più avanzata rispetto ai GM nei casi che hanno presentato successivamente uno sviluppo normale. La comparazione tra queste due tecniche di valutazione ha comunque evidenziato una buona concordanza prognostica nei soggetti con EII, sebbene l'osservazione dei GM sia risultata lievemente superiore in tutte le età valutate (Tab. 1).

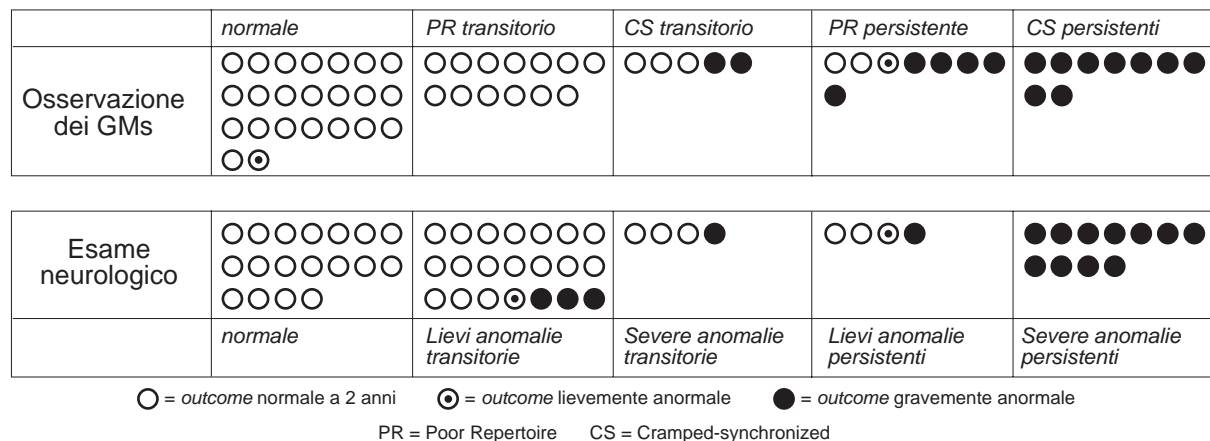


Fig. 2. - Correlazione tra valutazioni longitudinali mediante osservazione dei GM ed esame neurologico, in un gruppo di neonati a termine con encefalopatia. PR: *poor repertoire*; CS: *cramped-synchronized* (modificata da [35])

Tabella 1. - Valore predittivo dell'osservazione dei general movement (GM) e dell'esame neurologico, rispetto all'*outcome* a due anni, in un gruppo di neonati a termine con encefalopatia (modificata da [35])

	Età del termine	Periodo post-termine		
Età post-mestruale (settimane)	38-42	43-47	48-56	57-65
n. dei casi	51	45	58	54
Osservazioni dei GM				
sensibilità (%)	94,1	94,1	94,4	82,3
specificità (%)	58,8	85,7	82,5	83,8
Esame neurologico				
sensibilità (%)	88,2	88,2	88,9	94,1
specificità (%)	58,8	67,8	72,5	81,1

Grazie alle sue caratteristiche, ovvero alla totale assenza di invasività ed alla semplicità di esecuzione, l'osservazione dei GM risulta particolarmente adatta all'esecuzione di valutazioni seriate longitudinali, e può essere considerato l'esame di elezione in tutti i casi in cui non è indicata o non è possibile la mobilizzazione del soggetto. L'utilizzo di questa metodica appare complementare agli approcci tradizionali, i quali forniscono senza dubbio un inquadramento più completo delle diverse sottofunzioni del sistema nervoso, come ad esempio i nervi cranici o il sistema neurovegetativo. Va peraltro ricordato che questi strumenti non risultano utili nei casi di estrema depressione del sistema nervoso, secondari ad esempio a severa asfissia, o a profonda sedazione, quando solo le indagini strumentali possono fornire informazioni realmente utili [8].

Conclusioni

L'encefalopatia ipossico-ischemica costituisce ancora oggi un'importante causa di patologia neuropsichica. Una diagnosi ed un inquadramento clinico precoce sono indispensabili per intraprendere un trattamento riabilitativo che possa incidere significativamente sulla storia naturale della malattia. Studi recenti hanno confermato il ruolo centrale svolto dall'esame neurologico nella diagnosi precoce e nella previsione accurata dell'evoluzione neuropsichica del neonato a termine asfittico. Sia l'esame neurologico tradizionale che le nuove tecniche semeiologiche basate sull'osservazione dei GM si sono confermate altamente predittive, particolarmente dopo 2-3 settimane di vita, ovvero all'allontanarsi dall'evento lesivo. La comparazione con tecniche strumentali ha inoltre consentito una migliore correlazione tra il danno e le caratteristiche cliniche dei soggetti, permettendo un migliore inquadramento clinico che potrebbe risultare particolarmente utile nei centri periferici dotati di minori strumentazioni diagnostiche tecnologicamente avanzate.

Nonostante i progressi fatti tuttavia, ulteriori studi randomizzati con casistiche più ampie sono indispensabili per la comprensione delle reali potenzialità della valutazione neurologica nell'EII, e per la messa a punto di un protocollo clinico standardizzato su cui raggiungere il maggior consenso scientifico possibile.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 19 luglio 2001.

BIBLIOGRAFIA

1. Robertson C, Finer N. Term infants with hypoxic-ischemic encephalopathy: outcome at 3.5 years. *Dev Med Child Neurol* 1985;27:473-84.
2. Thornberg E, Thiringer K, Odeback A, Milsom I. Birth asphyxia: incidence, clinical course and outcome in a Swedish population. *Acta Paediatr* 1995; 84:927-32.
3. Volpe JJ. Hypoxic-ischaemic encephalopathy: clinical aspects. In: *Neurology of the newborn*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2001.
4. Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol* 1976;33:696-705.
5. Finer NN, Robertson CM, Richards RT, Pinnell LE, Peters KL. Hypoxic-ischemic encephalopathy in term neonates: perinatal factors and outcome. *J Pediatr* 1981;98:112-7.
6. Biagioni E, Bartalena L, Boldrini A, Pieri R, Cioni G. Constantly discontinuous EEG patterns in full-term neonates with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Clin Neurophysiol* 1999;110:1510-5.
7. Biagioni E, Mercuri E, Rutherford M, Cowan F, Azzopardi D, Frisone MF *et al.* Combined use of electroencephalogram and magnetic resonance imaging in full-term neonates with acute encephalopathy. *Pediatrics* 2001;107:461-8.
8. Eken P, Toet MC, Groenendaal F, de Vries LS. Predictive value of early neuroimaging, pulsed Doppler and neurophysiology in full term infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1995;73:F75-80.
9. Selton D, Andre M. Prognosis of hypoxic-ischaemic encephalopathy in full-term newborns-value of neonatal electroencephalography. *Neuropediatrics* 1997;28:276-80.

10. Rutherford MA, Pennock JM, Dubowitz LM. Cranial ultrasound and magnetic resonance imaging in hypoxic-ischaemic encephalopathy: a comparison with outcome. *Dev Med Child Neurol* 1994;36:813-25.
11. Rutherford MA, Pennock JM, Schwieso JE, Cowan FM, Dubowitz LM. Hypoxic ischaemic encephalopathy: early magnetic resonance imaging findings and their evolution. *Neuropediatrics* 1995;26:183-91.
12. Rutherford M, Pennock J, Schwieso J, Cowan F, Dubowitz L. Hypoxic-ischaemic encephalopathy: early and late magnetic resonance imaging findings in relation to outcome. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1996;75:F145-51.
13. Forbes KP, Pipe JG, Bird R. Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: detection with diffusion-weighted MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000;21:1490-6.
14. Hanrahan JD, Cox IJ, Azzopardi D, Cowan FM, Sargentoni J, Bell JD *et al.* Relation between proton magnetic resonance spectroscopy within 18 hours of birth asphyxia and neurodevelopment at 1 year of age. *Dev Med Child Neurol* 1999; 41:76-82.
15. Barkovich AJ, Baranski K, Vigneron D, Partridge JC, Hallam DK, Hajnal BL *et al.* Proton MR spectroscopy for the evaluation of brain injury in asphyxiated, term neonates. *AJNR Am J Neuroradiol* 1999; 20:1399-405.
16. Casey BM, McIntire DD, Levene KJ. The continuing value of the Apgar score for the assessment of newborn infants. *N Engl J Med* 2001;344:519-20.
17. Sykes GS, Molloy PM, Johnson P, Gu W, Ashworth F, Stirrat GM *et al.* Do Apgar scores indicate asphyxia? *Lancet* 1982; 27(1):494-6.
18. Marrin M, Paes BA. Birth asphyxia: does the Apgar score have diagnostic value? *Obstet Gynecol* 1988; 72:120-3.
19. Prechtl HFR *The neurological examination of the full-term newborn infant*. 2nd ed. revised and enlarged. London: Heinemann; 1977. (Clinics in developmental medicine, 63).
20. Amiel-Tison C. Cerebral damage in full-term newborn. Aetiological factors, neonatal status and long-term follow-up. *Biol Neonat* 1969;14:234-50.
21. Dubowitz L, Mercuri E, Dubowitz V. An optimality score for the neurologic examination of the term newborn. *J Pediatr* 1998;133: 406-16.
22. Mercuri E, Guzzetta A, Haataja L, Cowan F, Rutherford M, Counsell S *et al.* Neonatal neurological examination in infants with hypoxic ischaemic encephalopathy: correlation with MRI findings. *Neuropediatrics* 1999;30:83-9.
23. Touwen BC, Lok-Meijer TY, Huisjes HJ, Olinga AA. The recovery rate of neurologically deviant newborns. *Early Hum Dev* 1982; 7:131-48.
24. Dubowitz LMS, Dubowitz V. *The neurological assessment of the preterm and fullterm newborn infant*. London: Heinemann; 1981. (Clinics in developmental medicine, 79).
25. Prechtl HFR. *Continuity of neural functions from prenatal to post-natal life*. Oxford: Blackwell; 1984. (Clinics in developmental medicine, 94).
26. Prechtl HFR. Qualitative changes of spontaneous movements in fetus and preterm infant are a marker of neurological dysfunction. *Early Hum Dev* 1990;23:151-8.
27. Ferrari F, Cioni G, Prechtl HF. Qualitative changes of general movements in preterm infants with brain lesions. *Hum Dev* 1990; 23:193-231.
28. Geerdink JJ, Hopkins B. Qualitative changes in general movements and their prognostic value in preterm infants. *Eur J Pediatr* 1993;152:362-7.
29. Hadders-Algra M, Klip-Van den Nieuwendijk A, Martijn A, van Eykern LA. Assessment of general movements: towards a better understanding of a sensitive method to evaluate brain function in young infants. *Dev Med Child Neurol* 1997;39:88-98.
30. Prechtl HF, Ferrari F, Cioni G. Predictive value of general movements in asphyxiated fullterm infants. *Early Hum Dev* 1993;35:91-120.
31. Einspieler C, Prechtl HF, Ferrari F, Cioni G, Bos AF. The qualitative assessment of general movements in preterm, term and young infants-review of the methodology. *Early Hum Dev* 1997; 50:47-60.
32. Hadders-Algra M, Prechtl HF. Developmental course of general movements in early infancy. I. Descriptive analysis of change in form. *Early Hum Dev* 1992;28:201-13.
33. Hadders-Algra M, Van Eykern LA, Klip-Van den Nieuwendijk AW, Prechtl HF. Developmental course of general movements in early infancy. II. EMG correlates. *Early Hum Dev* 1992;28:231-51.
34. Cioni G, Ferrari F, Prechtl HF. Posture and spontaneous motility in fullterm infants. *Early Hum Dev* 1989;18:247-62.
35. Cioni G, Prechtl HF, Ferrari F, Paolicelli PB, Einspieler C, Roversi MF. Which better predicts later outcome in full-term infants: quality of general movements or neurological examination? *Early Hum Dev* 1997;50:71-85.

Tecniche di neuroimaging per la diagnosi del danno cerebrale nel neonato

Fabio TRIULZI

Unità Operativa di Radiodiagnostica e Neuroradiologia,
Ospedale dei Bambini "V. Buzzi", Milano

Riassunto. - Il ruolo della neuroradiologia nella valutazione del danno anossico-ischemico perinatale è stato profondamente modificato dall'avvento della risonanza magnetica (RM). Questa tecnica consente da un lato la migliore valutazione possibile dell'anatomia normale dell'encefalo neonatale, e dall'altro offre importanti informazioni diagnostiche sia nella valutazione del prematuro che del nato a termine. Nel prematuro, la RM è in grado di identificare la presenza di piccole lesioni della sostanza bianca non visualizzabili allo studio ecografico, mentre nell'asfissia del nato a termine identifica un quadro caratteristico di coinvolgimento selettivo di aree ad elevata richiesta energetica. Grazie a particolari tecniche di acquisizione, è inoltre possibile ottenere immagini dipendenti dalla diffusione molecolare, tali immagini sono di estrema utilità nella valutazione della fase acuta del danno anossico-ischemico, permettendo un bilancio prognostico estremamente precoce.

Parole chiave: risonanza magnetica, ecografia transfontanellare, asfissia perinatale, diffusione.

Summary (*Neuroimaging techniques for diagnostic evaluation of neonatal brain damage*). - Recently, magnetic resonance (MR) has become the technique of choice in evaluating neonatal central nervous system (CNS) diseases. It is the only imaging technique that can discriminate myelinated from neonatal unmyelinated white matter; it offers the highest sensitivity in detecting acute anoxic injury of neonatal brain, and, with proper coils and sequences, it can exquisitely depict neonatal brain anatomy and locate pathology. With new generation high-field MR imaging units it is now possible to obtain images of molecular diffusion. Preliminary reports suggest that diffusion imaging may be useful in early detection of perinatal brain ischemia and it is likely to become crucial in the effective and safe use of neuroprotective strategies.

Key words: magnetic resonance, ultrasonography, perinatal asphyxia, diffusion.

Introduzione

L'avvento della risonanza magnetica (RM) ha profondamente modificato l'approccio diagnostico neuroradiologico al danno cerebrale da insulto ipossico/ischemico neonatale. Qualsiasi considerazione sulle tecniche diagnostiche non può quindi prescindere dal ruolo centrale acquisito da questa tecnica nella valutazione dell'encefalo neonatale.

Dopo aver brevemente valutato lo stato dell'arte della RM e le principali tecniche di acquisizione utilizzate nel periodo neonatale considereremo i differenti quadri diagnostici rispettando la classica divisione in età gestazionale, valutando quindi dapprima le alterazioni del prematuro e successivamente quelle del nato a termine.

Tecniche di studio

In epoca neonatale le tecniche neuroradiologiche disponibili per lo studio del sistema nervoso centrale sono: l'ecografia, la tomografia computerizzata (TC) e la RM.

L'*ecografia* per praticità d'uso, relativa ampia disponibilità, bassi costi e assenza di radiazioni ionizzanti, rimane la tecnica diagnostica di screening nella valutazione della patologia del SNC neonatale. Attraverso l'ecografia viene stabilito il *grading* nelle emorragie peri-intraventricolari del prematuro e conseguentemente poste le basi per un inquadramento prognostico. Sempre attraverso l'ecografia viene facilmente monitorato, nel paziente con emorragia peri-intraventricolare, l'insorgere e l'eventuale progressione di una dilatazione ventricolare. E' inoltre tecnica fondamentale nella prima valutazione del danno anossico-ischemico sia nel prematuro che nel nato a termine seppure la sua sensibilità e specificità sia inferiore alla RM. E' in buona sostanza una tecnica diagnostica insostituibile in neonatologia per un primo inquadramento del danno cerebrale nel neonato.

La *TC* è una tecnica progressivamente in disuso in ambito neonatale. Ha una ottima sensibilità per le lesioni emorragiche, ma una complessiva scarsa sensibilità nei confronti delle lesioni anossico-ischemiche se confrontata alla RM. Il suo impiego è inoltre limitato dall'uso di radiazioni ionizzanti. L'impiego per il quale risulta ancora oggi insostituibile nella diagnostica

neuroradiologica del neonato è lo studio del cranio e del massiccio facciale (malformazioni e traumi) e delle calcificazioni intracraniche.

La RM è la tecnica che presenta attualmente la più alta sensibilità verso le lesioni anossico-ischemiche sia del prematuro che del nato a termine. Oltre a dimostrare una elevata sensibilità la RM offre anche la miglior definizione possibile della anatomia normale del SNC neonatale ed è inoltre l'unica tecnica in grado di valutare il processo di mielinizzazione. Un ulteriore vantaggio nei confronti della TC è l'assenza di radiazioni ionizzanti, mentre presenta nei confronti dell'ecografia dei limiti legati al relativo alto costo e minor disponibilità e alla necessità dell'immobilità del neonato durante l'esecuzione dell'esame. Entro i primi uno-due mesi di vita, è tuttavia possibile eseguire l'esame RM senza sedazione, avendo cura di preparare il neonato prima dello studio con una congrua deprivazione di sonno seguita dall'allattamento.

Tecnica di studio RM dell'encefalo neonatale

Un corretto esame RM dell'encefalo neonatale prevede una tecnica di acquisizione *dedicata*, in altri termini la scelta delle sequenze di acquisizione, delle bobine e del magnete/gradienti deve considerare le specifiche caratteristiche del SNC neonatale [1].

Magnete/gradienti. - E' indubbiamente da preferire un magnete ad alto campo (1,5 T) con gradienti particolarmente potenti e rapidi. L'alto rapporto segnale/rumore consente un uso maggiormente flessibile dei parametri come lo spessore della sezione ed il campo di vista, fondamentali nello studio di piccoli volumi, consente inoltre l'utilizzo al meglio di sequenze di acquisizione o tecniche di particolare importanza nella patologia anossico-ischemica come la diffusione e la spettroscopia.

Bobine. - Il piccolo volume dell'encefalo neonatale è più facilmente valutabile con bobine dedicate con un diametro trasverso utile di 18-20 cm. Per la loro geometria simile a quella della bobina dell'encefalo, ma di dimensioni ridotte, possono essere in genere utilizzate le cosiddette bobine per lo studio delle estremità (ginocchio-caviglia).

Sequenze di acquisizione. - Debbono essere considerati dei parametri di acquisizione specifici legati prevalentemente al fatto che il cervello di un neonato essendo pressoché completamente privo di mielina è molto più ricco in acqua che non il cervello di un adulto o di un bimbo di 4-5 anni [2]. In linea generale, per ottenere nell'encefalo del neonato un buon contrasto fra sostanza bianca non mielinizzata e sostanza grigia, occorre accentuare la dipendenza della sequenza sia dal tempo di rilassamento T1 che dal tempo di rilassamento T2. Da un punto di vista tecnico per una sequenza spinecho standard T2 dipendente il TR non dovrebbe

essere inferiore a 3000 ms e il TE a 100-120 ms. L'aumento del TR comporta un aumento del tempo di acquisizione, tuttavia la recente introduzione nella routine clinica delle sequenze spin-echo rapide (Fast o Turbo SE) ha consentito di ridurre nettamente il tempo di acquisizione mantenendo dei TR elevati ed un eccellente rapporto segnale/rumore. Le sequenze veloci possono essere utilizzate anche nelle acquisizioni con tecnica *inversion recovery* che consentono un eccellente contrasto T1 fra sostanza bianca, sostanza grigia e liquor.

Nello studio della patologia cerebrovascolare del neonato, le sequenze spin-echo dipendenti dalla densità protonica e le sequenze FLAIR si sono dimostrate di scarsa utilità ed appaiono complessivamente meno informative delle sequenze convenzionali spin-echo T1 e T2 dipendenti ed *inversion recovery* T1 dipendenti.

Nel sospetto di emorragia della matrice germinale o d'infarto emorragico periventricolare, l'obiettivo delle sequenze RM è quello di evidenziare le caratteristiche modificazioni di segnale legate alle proprietà paramagnetiche dei derivati emoglobinici. In questo senso, a causa della continua rifocalizzazione degli impulsi RF, le sequenze spin-echo veloci T2 dipendenti risultano poco efficaci in quanto "appiattiscono" gli effetti paramagnetici rispetto alle corrispondenti convenzionali spin-echo, specie con apparecchiature a campo magnetico medio-basso (< 0,5 T). In questi casi è preferibile non utilizzare sequenze veloci, ma ad eco di gradiente che utilizzano un sistema di rifocalizzazione misto (RF + gradienti) e che hanno una buona sensibilità agli effetti paramagnetici. Una proposta di protocollo per lo studio RM dell'encefalo del neonato è riportata in Tab. 1.

Sequenze per la valutazione della diffusione. - Queste sequenze di recente applicazione nella routine diagnostica offrono informazioni di estrema utilità nella valutazione del danno anossico-ischemico. Nelle immagini dipendenti dalla diffusione l'intensità del segnale RM non è più influenzata unicamente dai tempi di rilassamento, ma prevalentemente dall'entità della diffusione molecolare, in particolare dalla diffusione delle molecole d'acqua. Ogni tessuto biologico ha proprie caratteristiche di diffusione: se consideriamo un contenitore d'acqua le molecole di acqua si muovono (diffondono) liberamente e con moto casuale influenzato unicamente dalla temperatura. Se tuttavia le molecole d'acqua trovano degli ostacoli, come avviene normalmente in qualsiasi struttura biologica, la loro possibilità di diffusione è inevitabilmente ridotta. Questa riduzione o limitazione può essere distribuita in modo sostanzialmente uniforme nei tre piani dello spazio (riduzione e conseguente diffusione isotropica), come avviene ad esempio nella sostanza grigia, o può essere ridotta lungo piani preferenziali (diffusione anisotropa) come avviene nella sostanza bianca. La sostanza bianca è infatti costituita prevalentemente da assoni che formano

Tabella 1. - Esempio di sequenze di acquisizione RM standard per lo studio dell'encefalo del neonato

Tipo di sequenza	Parametri
A) Sequenza SE convenzionale T1 dipendente	Piano sagittale, 15 sezioni di 4 mm di spessore; TR 527 ms, TE 14; campo di vista 150-170 mm; tempo totale di scansione 4 min e 11 s
B) Sequenza turbo SE T2 dipendente	Piano assiale (orbito-meatale); 18-23 sezioni di 3-4 mm di spessore; TR 5200 ms, echo train 15; campo di vista 130-150 mm; tempo totale di scansione 2 min e 10 s
C) Sequenza SE convenzionale T1 dipendente	Piano assiale; 17 strati di 4 mm di spessore; TR 527 ms, TE 14; campo di vista 150 mm; tempo totale di 4 min e 11s
D) Sequenza turbo <i>inversion-recovery</i> T1 dipendente	Piano assiale; 12 strati di 5 mm di spessore; TR 5800 ms, TE 60, TI 300; campo di vista 130-150 mm; tempo totale di scansione di 2 min e 25 s

fasci di fibre all'interno dei quali l'acqua ha diffusione massima nella direzione parallela all'assone e minima in quella perpendicolare. Applicando ad una normale sequenza spin-echo dei gradienti appositamente ponderati per la diffusione otteniamo quindi una immagine nella quale l'intensità di segnale è proporzionale alla restrizione della diffusione. In altri termini il segnale proveniente dal liquor, assimilabile all'acqua, dove massima è la diffusione sarà basso, mentre quello proveniente da strutture dove la diffusione è fortemente limitata sarà alto. Inoltre per quanto detto sulla anisotropia della sostanza bianca, il segnale proveniente dalla sostanza bianca sarà diverso a seconda dell'orientamento dei gradienti pesati in diffusione. Se il gradiente sarà ad esempio applicato sul piano z che attraversa la sezione assiale dal basso verso l'alto sarà parallelo a certi fasci di fibre, come ad esempio quello cortico-spinale che dimostrerà massima diffusione e basso segnale, ma sarà perpendicolare ad altri, come la radiazione visiva ed il corpo calloso che evidenzieranno un alto segnale per una limitata diffusione. Se da un lato questa tecnica di acquisizione può risultare estremamente interessante nell'isolare differenti fasci di fibre, è per altri versi utile ottenere delle immagini che rappresentino la sommatoria dei tre assi cartesiani per una miglior identificazione di aree di restrizione patologica della diffusione. Queste immagini prendono il nome di *tracce* e sono quelle più utilizzate nella diagnostica clinica. Tuttavia per rendere maggiormente informativo il dato della diffusione vanno affiancate alle immagini dipendenti dalla diffusione anche delle immagini che ne possano dare una quantificazione, che possano in altri termini rappresentare direttamente il *coefficiente di diffusione apparente* (ADC). L'immagine dipendente o pesata dalla diffusione è infatti pur sempre influenzata dai tempi di rilassamento in particolare dal T2. Per cercare di ridurre l'influenza del T2 nella genesi dell'immagine posso aumentare la dipendenza dalla diffusione aumentando il fattore *b*, ma in modo molto più efficace posso, al pari di quanto avviene con il calcolo del T2, campionare più immagini con *b* crescenti e

ottenere la curva di decadimento del segnale dalla quale ottengo il valore numerico di ADC. L'importanza dell'ADC è di stretta evidenza quando un'alterazione presenti un aumento di segnale sia in T2 che nella sequenza pesata in diffusione. In questo caso non può essere escluso che l'alto segnale della diffusione sia almeno in parte un "trascinamento" dell'alto segnale in T2 e quindi non rappresenti realmente una restrizione della diffusione. L'immagine ADC dà invece il valore certo della diffusione che è inversamente proporzionale alla restrizione poiché ovviamente il coefficiente di diffusione è maggiore quanto la restrizione è minore. In altri termini al segnale elevato della immagine dipendente dalla diffusione deve corrispondere un basso segnale della immagine ADC per poter confermare una effettiva restrizione.

Anatomia normale RM dell'encefalo neonatale

L'aspetto maggiormente caratteristico delle immagini RM nel neonato è la pressoché completa assenza di mielina ben evidenziabile sia nelle immagini T1 che T2 dipendenti [3]. L'assenza di mielina determina una inversione dei normali rapporti di contrasto fra sostanza bianca e sostanza grigia. Nell'adulto o nel bambino a processo di mielinizzazione completato, sostanza bianca e sostanza grigia hanno dei caratteristici rapporti di contrasto governati sostanzialmente dalle differenti concentrazioni in acqua e lipidi. In particolare la sostanza bianca essendo relativamente più povera in acqua e più ricca in lipidi della sostanza grigia presenta un segnale più basso della sostanza grigia nella sequenza T2 dipendente e più alto della sostanza grigia nella sequenza T1 dipendente. Nel neonato viceversa l'assenza di mielina comporta una relativa alta concentrazione in acqua e bassa in lipidi della sostanza bianca con un'inversione dei rapporti di contrasto in T1 e T2 fra sostanza bianca e sostanza grigia: la sostanza bianca avrà quindi un segnale relativamente iperintenso nei confronti della grigia nella sequenza T2 dipendente e relativamente

ipointenso sempre nei confronti della grigia nella sequenza T1 dipendente.

Per altro verso, tali rapporti di contrasto consentono di identificare all'interno della sostanza bianca quelle aree dove nel neonato comincia a rendersi evidente il processo di mielinizzazione. Tali aree sono costituite nel neonato principalmente dalle vie sensitive (lemnische mediali, nuclei ventro posterolaterali dei talami, corone radiate) comprese le vie uditive (lemnische laterali, collicoli inferiori, corteccia uditiva primaria) e visive (tratti ottici, nuclei genicolati, corteccia calcarina) e da alcune aree filogeneticamente più antiche come le strutture archi e paleocerebellari.

Patologia anossico-ischemica del neonato

L'encefalopatia anossico-ischemica è la prima causa di morbilità fra le patologie neurologiche del neonato [4].

Nell'inquadramento di tale patologia va seguito il criterio generale che le caratteristiche anatomo-patologiche delle alterazioni encefaliche e di conseguenza anche i reperti RM sono strettamente dipendenti dal grado di maturazione del sistema nervoso centrale e quindi dall'età gestazionale del neonato. Vanno quindi separate le alterazioni caratteristiche del nato pretermine (dalle 24 alle 36 settimane di età gestazionale) da quelle del nato a termine (dalle 37 alle 41 settimane di età gestazionale).

Differentemente dall'adulto, dove il danno anossico-ischemico causa invariabilmente un danno diffuso a carico della sostanza grigia, il danno anossico-ischemico del neonato sia nel prematuro che nel nato a termine è più frequentemente *selettivo*. La selettività del danno si modifica rapidamente con lo sviluppo biochimico, cellulare e anatomico del SNC neonatale. Le stesse richieste energetiche del cervello variano a seconda del suo stato di maturazione come ben documentato *in vivo* dalla PET [5].

In linea generale è possibile affermare che in caso di danno anossico lieve-moderato la sostanza bianca è più vulnerabile nel prematuro e la sostanza grigia nel nato a termine; mentre in caso di danno anossico grave e prolungato è possibile osservare un danno della sostanza grigia anche nel prematuro e un danno diffuso con quadro finale di encefalopatia multicistica nel nato a termine.

Patologia anossico-ischemica del prematuro

Si è calcolato che dal 5 al 15% dei prematuri nati sotto i 1500 g evidenzia successivamente deficit motori inquadri genericamente nelle paralisi cerebrali infantili, mentre sempre nello stesso gruppo si rilevano più tardivamente deficit comportamentali o di apprendimento in percentuali variabili dal 25 al 50% [4]. Il

principale substrato di tali disturbi neurologici è costituito da lesioni encefaliche di natura vascolare.

Nella prematurità si possono riscontrare due fondamentali e caratteristiche patologie del SNC etichettabili come patologie di significato vascolare: a) *l'emorragia della matrice germinativa* e b) *la leucomalacia periventricolare (LPV)*. Da un punto di vista eziopatogenetico tuttavia, mentre le emorragie della matrice germinale, pur dipendendo in buona misura dall'intrinseca fragilità della struttura capillare della matrice del prematuro, hanno genesi pluri-fattoriale, la leucomalacia periventricolare è il risultato di un danno anossico-ischemico localizzato a livello della sostanza bianca.

Come già ricordato in precedenza la sostanza bianca del prematuro è particolarmente vulnerabile al danno anossico che può determinare lesioni variabili da ampie aree di necrosi a piccole lesioni gliotiche.

Contrariamente alla emorragia della matrice, la LPV presenta un picco di incidenza attorno alla trentesima settimana e non è direttamente correlabile con l'età gestazionale.

Attualmente non esiste una teoria eziopatogenetica unitaria, ma piuttosto si ritiene che possano intervenire almeno tre fattori, fortemente correlabili, che potrebbero assieme o indipendentemente determinare il danno anatomo-patologico.

Il primo fattore è riferibile alla teoria che prevede una diversa disposizione dei territori di confine arteriosi nel pretermine, rispetto al nato termine. Tali territori sarebbero dipendenti dai rami terminali delle arterie ventriculopete e delle arterie ventriculofughe e si troverebbero nel pretermine a livello delle regioni periventricolari [6]. L'anossia diffusa comporterebbe nel pretermine un danno selettivo nei territori di confine e quindi delle regioni periventricolari. In realtà, l'esistenza di arterie ventriculofughe è stata recentemente messa in dubbio e il concetto di sofferenza nei territori di confine sembra aver oggi perso quell'importanza che aveva in passato [7, 8].

Il secondo fattore è riferibile alla mancanza o all'insufficiente vasoregolazione arteriosa presente nel nato prematuro, che non sarebbe quindi in grado di rispondere in modo adeguato alla presenza di un'anossia cerebrale [9].

Il terzo fattore è quello che attualmente suscita maggiore interesse in ambito sia di ricerca di base che di ricerca clinica ed è riferibile alla particolare intrinseca vulnerabilità della sostanza bianca del neonato. Recenti studi di immunocitochimica hanno suggerito che le cellule bersaglio dell'evento anossico sarebbero gli oligodendrociti immaturi, vale a dire quelle cellule gliali già differenziate in oligodendrociti, ma ancora incapaci di produrre mielina. Queste cellule sarebbero particolarmente sensibili all'azione dei radicali liberi e quindi particolarmente vulnerabili a seguito di un evento anossico [10].

Nella fase iniziale del danno da PVL l'ecografia è in genere l'unica tecnica utilizzabile. Il neonato prematuro con danno anossico è in genere un neonato difficilmente trasportabile e non può essere allontanato dalla culla. L'ecografia dimostra in fase acuta la presenza di lesioni iperecogene periventricolari, grossolanamente simmetriche, con prevalenza a livello delle regioni peritrigonali [4]. La sensibilità dell'ecografia nella fase acuta è tuttavia scarsa, è stato dimostrato che fino al 70% di casi con alterazioni della sostanza bianca di origine ipossico-ischemica possono sfuggire all'indagine ecografica [11]. D'altro canto aspetti di sfumata iperecogenicità periventricolare sono estremamente comuni anche in neonati prematuri senza alcun danno anossico determinando un elevato numero di potenziali falsi positivi [12, 13]. La diagnosi in fase acuta di LPV deve quindi essere sempre attentamente verificata nel tempo. Dopo un periodo variabile da 2 a 6 settimane, in seno ai focolai iperecogeni compaiono le caratteristiche cisti anecogene che tendono progressivamente a confluire fra loro e quindi con i ventricoli laterali [14]. La distruzione anossica della sostanza bianca periventricolare ne determina un assottigliamento con conseguente caratteristica deformazione del profilo ventricolare, ben dimostrabile anche dopo 1-2 mesi dalla fase iniziale. La de Vries *et al.* [15] ha proposto un semplice sistema di grading delle LPV mediante ecografia:

- *grado I*: aree di iperecogenicità periventricolare presenti per più di 7 giorni;
- *grado II*: aree di iperecogenicità periventricolare che evolvono in piccole cisti a sede frontoparietale;
- *grado III*: aree di iperecogenicità periventricolare che evolvono in grossolane cisti periventricolari a sviluppo sia frontoparietale che occipitale.

Nel caso sia possibile eseguire lo studio RM in fase relativamente precoce, può essere osservato un diffuso edema perilesionale che si può desumere da un relativo incremento della fisiologica iperintensità di segnale della sostanza bianca periventricolare non mielinizzata, con sequenze spin-echo o spin-echo veloci T2 dipendenti, e della ipointensità di segnale nelle sequenze spin-echo T1 dipendenti. In questa fase, con sequenze convenzionali, è pressoché impossibile distinguere l'edema dalle lesioni ischemiche della sostanza bianca.

Vi sono però dei risultati preliminari che dimostrerebbero una buona sensibilità delle immagini dipendenti dalla *diffusione*, in grado di differenziare nella fase acuta le lesioni ischemiche della sostanza bianca dall'edema [16].

A pochi giorni di distanza dall'evento anossico la RM è in grado di dimostrare, sempre in corrispondenza della sostanza bianca periventricolare, *piccole alterazioni nodulari* caratterizzate da segnale iperintenso nella sequenza spin-echo T1 dipendente e da segnale isointenso in quella spin-echo o spin-echo veloce T2-dipendente [17, 18]. Per un miglior contrasto con il segnale della sostanza bianca non mielinizzata tali

alterazioni risultano di più facile individuazione nella sequenza spin-echo T1-dipendente: è questa quindi l'acquisizione da eseguire prima di ogni altra (Fig. 1a). Tali alterazioni possono essere presenti assieme alle alterazioni cistiche oppure essere isolate, in quest'ultimo caso l'ecografia spesso risulta del tutto normale o dimostra solo transitorie iperecogenicità. Seguite nel tempo queste alterazioni si associano comunque ad un assottigliamento della sostanza bianca periventricolare [17]: non si hanno tuttavia ancora sufficienti dati clinici per stabilirne la reale importanza prognostica. Anche per quanto riguarda la base isto-patologica di questi reperti RM non esistono dati definitivi: l'ipotesi maggiormente accreditata è che siano correlabili alla presenza di accumuli di macrofagi accorsi nella sede del danno anossico; la presenza di un aumento focale della densità cellulare nel contesto della sostanza bianca non mielinizzata e ricca in acqua del neonato pretermine sarebbe sufficiente a determinare una relativa iperintensità nelle sequenze SE T1 dipendenti e un'ipointensità di segnale nelle sequenze T2-dipendenti [18].

La RM dimostra poi facilmente le *cisti periventricolari*: queste non sono altro che cavità malaciche con segnale simil-liquorale, destinate a confluire fra loro e quindi nei ventricoli laterali (Fig. 1b). La RM definisce con maggiore accuratezza dell'ecografia la sede e l'estensione di queste cisti e, già nella fase subacuta, può stabilire un bilancio prognostico più accurato [1].

Nei controlli a distanza, quando la sostanza bianca dell'encefalo è completamente mielinizzata, per la visualizzazione degli esiti non malacici a livello periventricolare, risultano più utili le sequenze spin-echo dipendenti dalla densità protonica e soprattutto le sequenze FLAIR, considerata la contiguità dei focolai con il liquor dei ventricoli laterali. In questa fase risultano particolarmente utili anche le sezioni sagittali spin-echo T1 dipendenti, per la valutazione dell'eventuale assottigliamento del corpo calloso [19].

Si sottolinea che in fase cronica o di danno stabilizzato, la RM è molto più accurata dell'ecografia nel definire l'entità del danno a carico della sostanza bianca periventricolare, non solo per l'evidente assottigliamento, ma anche per la presenza di alterazioni di segnale, di verosimile significato gliotico, nella sostanza bianca residua (Fig. 1c), ben visibili con sequenze FLAIR. Quando il danno anossico è limitato e la perdita di sostanza bianca è modesta, risulta prevalente l'alterazione di segnale periventricolare. Il riscontro di tali reperti nel giovane o nell'adulto, in assenza di dati anamnestici precisi, può porre problemi diagnostici differenziali con altre patologie della sostanza bianca, in particolare con la sclerosi multipla. In queste situazioni, può essere di aiuto il riconoscimento, nelle sezioni sagittali, del caratteristico assottigliamento del corpo calloso conseguente alla perdita di sostanza bianca (da non confondere con ipo-agenesie parziali, di tipo malformativo).

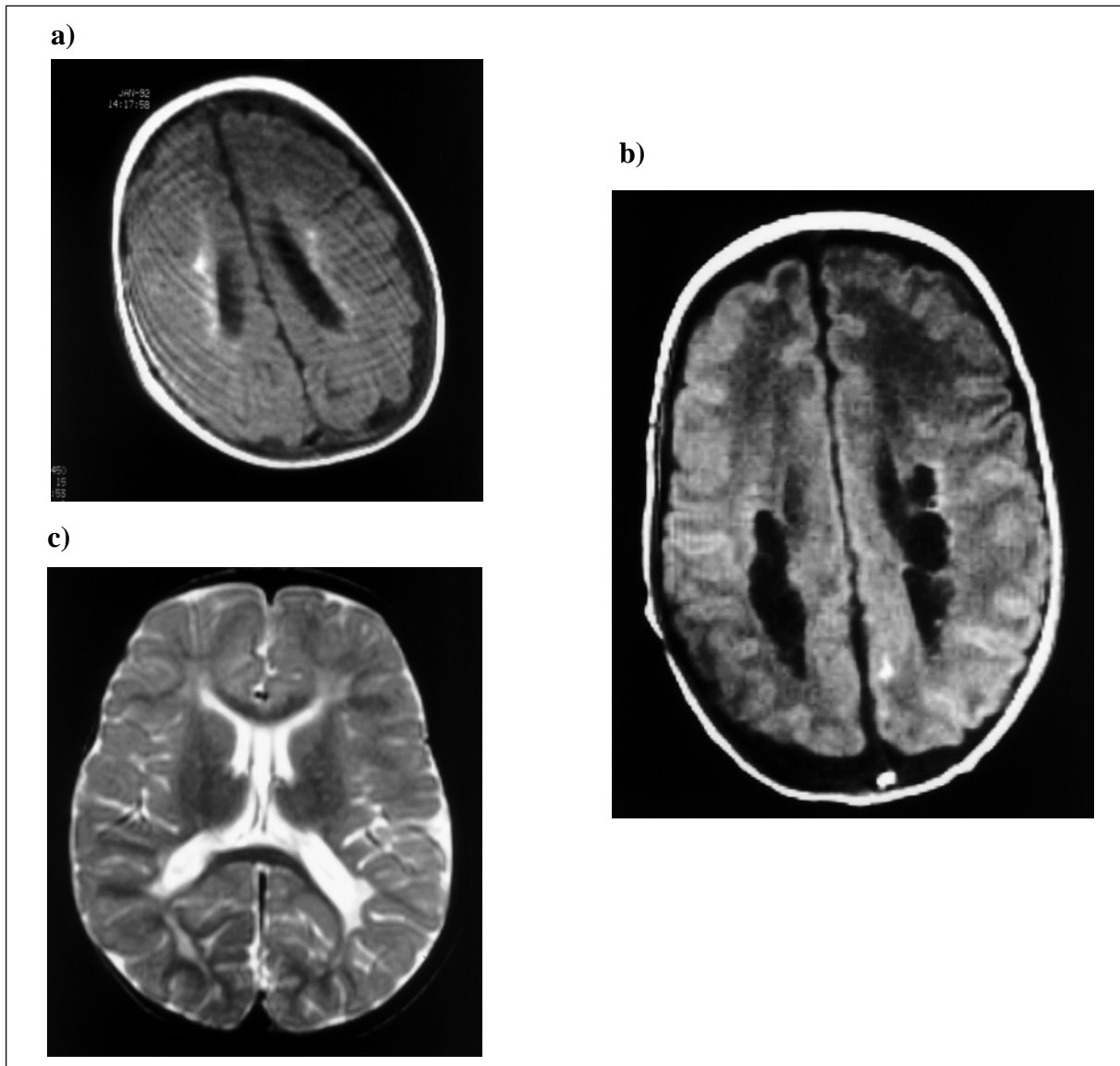


Fig. 1. - Anossia del pretermine (leucomalacia periventricolare, LPV). a) esame eseguito in fase subacuta stabilizzata disturbato da alcuni artefatti da movimento: è tuttavia possibile evidenziare nella immagine T1 dipendente delle aree di iperintensità periventricolare bilaterale; b) esame eseguito in fase subacuta-cronica. L'immagine T1 dipendente dimostra multiple alterazioni cistiche parzialmente confluenti fra loro e con i ventricoli; c) esame eseguito a 15 mesi. L'immagine T2 dipendente dimostra un ampliamento dei ventricoli laterali associato a un netta riduzione di spessore della sostanza bianca periventricolare. La sostanza bianca residua evidenzia inoltre una diffusa alterazione di segnale.

Patologia anossico-ischemica del nato a termine

Per quanto riguarda i bambini *nati a termine*, si stima che circa 2-4/1000 soffrano di asfissia legata al parto e che di questi dal 15 al 20% muoiano durante il periodo neonatale. Dei pazienti sopravvissuti circa 1/4 evidenzia deficit neurologici permanenti [4].

Seppur relativamente meno frequente che nel nato pretermine, anche nel nato a termine la patologia anossico-ischemica rappresenta uno dei principali problemi neurologici nel neonato.

Diversamente da quanto accade per il neonato pretermine, nel nato a termine lo studio RM può essere condotto anche in fase acuta. Infatti anche in presenza di una grave encefalopatia anossico-ischemica il quadro tende a stabilizzarsi e a migliorare dopo la terza giornata di vita. Nella maggior parte dei casi quindi a partire dalla seconda, terza giornata il bambino può essere sottoposto all'esame RM.

La RM presenta una sensibilità nettamente superiore alla ecografia nell'evidenziare sia lesioni anossiche diffuse che lesioni infartuali. In presenza di dubbia lesione

anossica o infartuale la RM risulta di conseguenza la tecnica di prima scelta in particolare se possono essere utilizzate tecniche di diffusione. Così come nel caso della leucomalacia periventricolare, le immagini pesate in diffusione possono, infatti, identificare e delimitare dall'edema perilesionale la lesione ischemica anche a poche ore di distanza dall'evento anossico.

Da un punto di vista eziopatogenetico, il parto ed in particolare il periodo del travaglio e la fase espulsiva terminale sono eventi potenzialmente correlabili ad un danno anossico diffuso cerebrale del neonato. Si ritiene tuttavia che in una parte di queste situazioni patologiche le cause siano in realtà da ricercare in eventi precedenti o immediatamente precedenti il parto, ancora oggi difficilmente documentabili con le comuni tecniche di monitoraggio quali ecografia e tracciato cardiocografico che valuta la frequenza cardiaca fetale assieme alle contrazioni uterine. E' dimostrato da tempo che non tutte le cellule del sistema nervoso hanno la medesima sensibilità al danno anossico: ad esempio, che i neuroni ippocampali sono probabilmente i più sensibili al danno anossico rispetto alle cellule nervose in altre sedi, sia nell'adulto che nel neonato di qualche mese. In altre parole, nel corso di un'anossia generalizzata i neuroni dell'ippocampo saranno i primi ad essere messi fuori uso e successivamente ad essere eliminati. Nel neonato queste differenze di sensibilità al danno ipossico dei neuroni cerebrali, sono ancora più rilevanti. Si è precedentemente visto come, nel caso della LPV del nato pretermine, siano gli oligodendrociti immaturi ancora più degli stessi neuroni a risentire dell'anossia, da qui il danno selettivo della sostanza bianca. Viceversa, nel nato a termine, sono alcune zone della corteccia cerebrale e dei nuclei della base, dove i neuroni dimostrano una maggior richiesta energetica che evidenziano una maggior sensibilità al danno anossico, unitamente a zone di sostanza bianca ad essi correlate, dove pure verosimilmente vi è un maggior consumo di energia dovuto al processo di mielinogenesi [5].

Nel nato a termine le sofferenze anossico-ischemiche, a seguito di varie cause, possono dare sostanzialmente luogo a tre tipi di danno a livello del tessuto cerebrale: lesioni selettive, lesioni parasagittali e malattia multicistica [1, 20].

Lesioni selettive

Sono caratterizzate da un coinvolgimento dei nuclei ventro-postero-laterali del talamo, della parte postero-laterale dei nuclei lenticolari, dell'ippocampo e para-ippocampo, della corteccia sensitivo-motoria e della corteccia uditiva primaria. Si ritiene che tali lesioni siano espressione di una anossia grave, ma limitata nel tempo.

La possibilità di individuare ischemie cerebrali selettive è prerogativa della RM. Le alterazioni sono visibili anche in fase acuta, quanto meno entro 3-4 giorni

dalla nascita. Esse presentano una caratteristica iperintensità nella sequenza T1 dipendente, particolarmente marcata a livello dei nuclei ventro-postero-laterali (VPL) talamici e della parte postero-laterale dei nuclei lenticolari [21]. Normalmente l'iperintensità di segnale nella sequenza spin-echo T1 dipendente dei VPL a seguito del danno anossico può essere differenziata dalla tenue iperintensità di segnale riscontrabile in condizioni fisiologiche in queste stesse sedi, ma riferibile al processo di mielinizzazione, perché più marcata (Fig. 2c). Inoltre nell'anossico si riscontra una relativa minor evidenza della normale iperintensità del braccio posteriore della capsula interna. Tali anomale iperintensità nelle sequenze T1 dipendenti possono essere rilevate anche a livello della corteccia sensitivo-motoria, della corteccia uditiva, nonché in corrispondenza delle regioni ippocampali e paraippocampali.

Con la sequenza spin-echo o spin-echo veloce T2 dipendente, le alterazioni sono meno caratteristiche e di più difficile valutazione: nella fase acuta prevale una relativa iperintensità di segnale in corrispondenza di talami e dei nuclei lenticolari, che può rapidamente trasformarsi in ipointensità soprattutto a livello della porzione postero-laterale dei nuclei lenticolari.

Così come per la LPV, non è ancora del tutto chiaro a cosa corrispondano sia le alterazioni iperintense nella sequenza spin-echo T1 dipendente, sia quelle ipointense in sequenze T2 dipendenti. Uno dei motivi potrebbe essere quello invocato per le LPV, cioè un aumento della densità cellulare per presenza di macrofagi o altre cellule in corrispondenza dei focolai ischemici [18]; in alternativa tale alterazione di segnale può essere in rapporto alla presenza di calcificazioni che, come è noto per altre situazioni patologiche, possono determinare un effetto paradossale sulle sequenze T1 dipendenti con accorciamento marcato del tempo di rilassamento T1. Una delle possibili reazioni neuropatologiche al danno anossico è infatti rappresentata dalla formazione, anche in tempi brevi, di depositi di calcio.

Recenti esperienze hanno dimostrato che le sequenze pesate in *diffusione* consentono un più precoce rilevamento delle aree di sofferenza anossica cerebrali, in particolare per quelle localizzate a livello sottocorticale, difficilmente valutabili in fase acuta con tecniche RM convenzionali o con altre metodiche (Fig. 2a,b). Robertson *et al.* [22] hanno potuto studiare mediante diffusione e tecniche convenzionali 12 neonati con sofferenza anossica moderata-severa alla nascita. Le immagini pesate in diffusione hanno potuto identificare alterazioni sottocorticali e profonde prima che queste fossero visibili con tecniche tradizionali anche se vi era una sottostima dell'estensione finale della lesione. Una spiegazione per la sottostima delle immagini pesate in diffusione nella fase acuta del danno potrebbe essere fornita dai processi di morte cellulare ritardata per apoptosi che vengono innescati dal danno anossico e

verso i quali si rivolgono in particolare le moderne terapie. Risulta quindi evidente l'importanza di questa nuova tecnica diagnostica anche nel monitoraggio dell'efficacia di nuove terapie neuroprotettive.

Anche nel nato a termine, la sofferenza ischemica del cervello è causa, oltre che della rapida formazione di depositi di calcio, di una risposta gliale attenuata con rapido instaurarsi di focolai malacici, sia a livello dei nuclei della base che in sede sottocorticale.

In fase stabilizzata o cronica, le ischemie cerebrali selettive presentano un pattern così tipico che è facilmente riconoscibile anche ad anni di distanza: i talami sono ipotrofici e, nelle sequenze spin-echo T2 dipendenti, si associa una persistente e tenue iperintensità di segnale in corrispondenza della regione dei nuclei VPL (Fig. 2d). Inoltre sono evidenti sfumate iperintensità di segnale anche a livello della parte posteriore del putamen. Permane una iperintensità anche in corrispondenza del fascio cortico-spinale, riconoscibile sino nella sostanza bianca sottocorticale (Fig. 2e). La corteccia pre e postrolandica è assottigliata o in alcune parti apparentemente interrotta (ulegria); tali reperti possono estendersi, anteriormente, alla circonvoluzione frontale superiore. L'alterazione di segnale della sostanza bianca, rilevabile con RM, non può correlarsi con una mancata mielinizzazione quanto piuttosto con un processo di distruzione selettiva di sostanza bianca, in parte già mielinizzata alla nascita.

Così come nella LPV, la porzione di corpo calloso corrispondente alle aree di distruzione di sostanza bianca appare nettamente assottigliata, reperto che è ben valutabile in proiezione sagittale.

Le alterazioni selettive encefaliche rilevabili con RM sono altamente caratteristiche sia per quanto riguarda il segnale che la sede, per cui in genere non vi sono sostanziali problemi di *diagnosi differenziale*. Tuttavia, alcune malattie metaboliche e infettive del sistema nervoso centrale possono talvolta determinare reperti RM che possono porre dei dubbi interpretativi, qualora non siano ben noti il contesto clinico ed i dati anamnestici.

La *malattia di Krabbe* presenta alterazioni focali cortico-sottocorticali rolandiche, che possono ricordare le anossie del neonato; tuttavia queste non sono mai così evidenti come negli esiti di anossia. Inoltre nella malattia di Krabbe non è di solito rilevabile un coinvolgimento dei talami.

Anche gli esiti di una grave infezione perinatale possono talvolta mimare una encefalopatia multicistica postanossica. Si ricordano, in questo senso, le due principali infezioni contratte dal neonato attraversando il canale del parto: l'*encefalite herpetica* e la *meningite o meningo-encefalite batterica neonatale*. Queste temibili infezioni possono infatti causare, attraverso una "mediazione" vascolare, un danno cerebrale così diffuso da essere potenzialmente confuso con una encefalopatia multicistica. In questi casi tuttavia il quadro clinico è

radicalmente differente da quello di una encefalopatia anossico-ischemica.

Ischemie selettive e lesioni parasagittali

Alle ischemie selettive sopradescritte, possono associarsi più lesioni cortico-sottocorticali localizzate nei territori vascolari di confine, preminentemente a livello parasagittale nei lobi frontale e parietale. Raramente le ischemie parasagittali possono essere isolate. Nella genesi delle lesioni parasagittali si ritiene importante l'instaurarsi di una marcata ipotensione arteriosa, con drastica riduzione dell'apporto ematico nei territori di confine.

I focolai ischemici sono localizzati tipicamente in sede cortico-sottocorticale parasagittale, a livello dei lobi frontali e parietali, e si presentano con caratteristiche di segnale simili alle ischemie corticali presenti nelle lesioni selettive. In fase stabilizzata o cronica si riscontrano nelle stesse sedi alterazioni di tipo ulegirico, caratterizzate da un marcato assottigliamento della corteccia anche con aspetti di apparente interruzione.

Encefalopatia multicistica

In questo caso, per gravi e prolungate anossie cerebrali, si realizza un coinvolgimento diffuso e non selettivo delle strutture sovratentoriali, con risparmio unicamente del bulbo, di parte del ponte, del mesencefalo e del cervelletto.

Quando il danno anossico oltre che profondo è anche sufficientemente prolungato nel tempo vengono coinvolti non solo i neuroni più sensibili al danno anossico, ma le lesioni riguardano virtualmente tutti i neuroni del telencefalo e del diencefalo. Il quadro risultante è drammatico con riscontro, in fase acuta, di edema cerebrale diffuso, caratterizzato da diffusa alterazione di segnale della sostanza bianca - iperintensa nella sequenza spin-echo T2 dipendenti e ipointensa in quelle T1 dipendenti - e da un diffuso coinvolgimento della corteccia e dei nuclei della base. In particolare si dimostrano delle alterazioni iperintense nella sequenza T1-dipendente nella profondità dei solchi, e dei nuclei della base. Nella sequenza spin-echo T2-dipendente i nuclei della base dopo una iniziale transitoria iperintensità dimostrano una progressiva marcata ipointensità di segnale, da possibile accumulo sia di ferro che di calcio. Rapidamente si realizzano alterazioni cistiche, a segnale simil-liquorale nelle varie sequenze, che coinvolgono diffusamente sia i nuclei della base che la sostanza bianca, determinando una repentina involuzione atrofica degli emisferi cerebrali. Tale processo è così clamoroso e rapido da associarsi frequentemente ad *igromi o ematomi sottodurali bilaterali* rispettivamente per fenomeni di *vacuum* o per stiramento eccessivo e rottura delle vene a ponte.

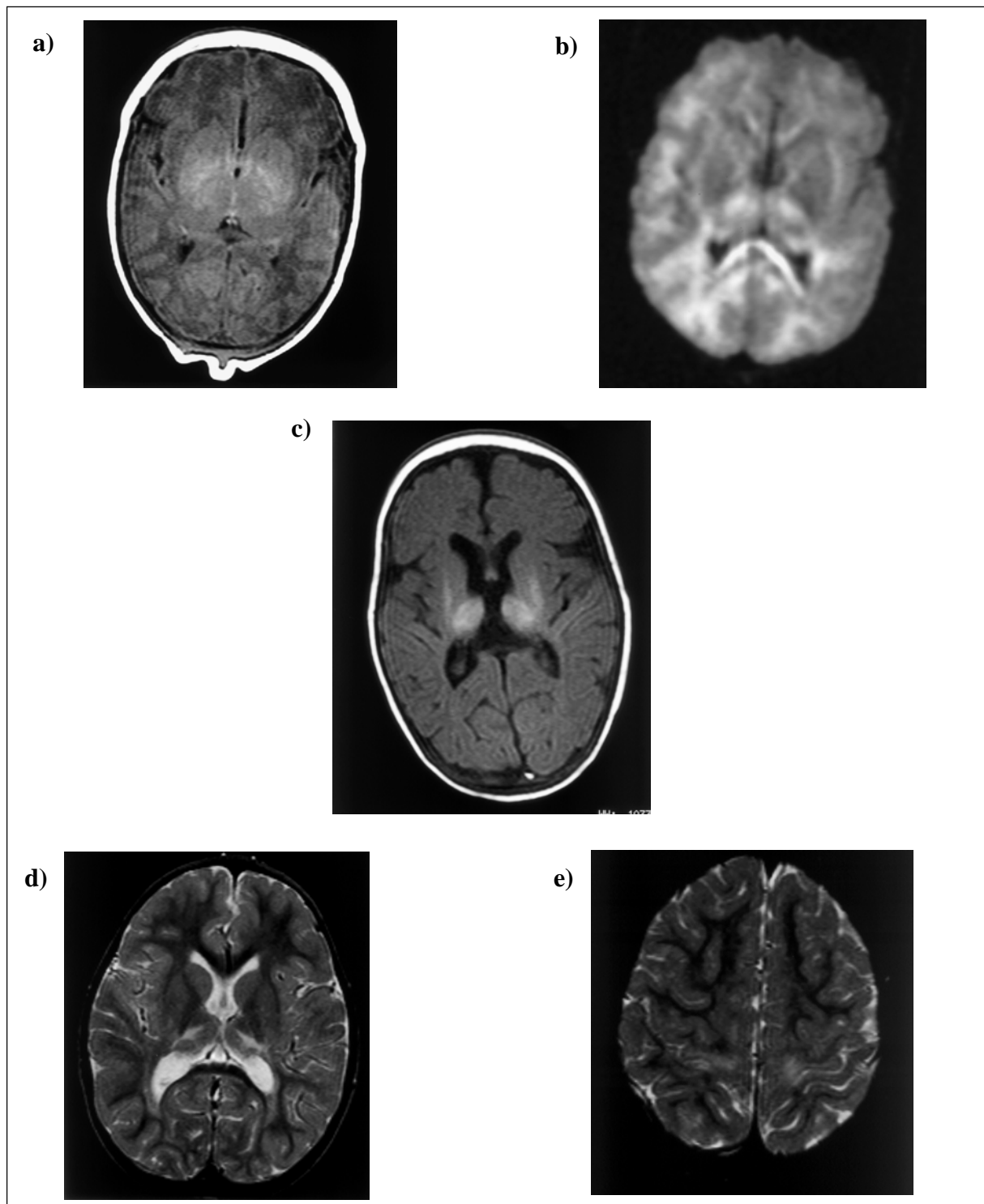


Fig. 2. - Anossia in nato a termine. *a, b) fase acuta (prime 72 ore):* a) sequenza T1 dipendente; b) sequenza dipendente dalla diffusione. Nella immagine T1 dipendente si osserva unicamente un diffuso edema senza evidenti alterazioni di segnale; nella immagine dipendente dalla diffusione le aree a segnale elevato (ad eccezione del corpo calloso per la presenza di gradiente unicamente in direzione z) rappresentano delle zone a restrizione della diffusione, in altri termini, delle aree di sofferenza parenchimale acuta secondaria al danno anossico. *c) fase subacuta cronica:* l'immagine T1 dipendente ben evidenzia le classiche alterazioni ipertense a carico dei nuclei della base bilateralmente. *d, e) fase cronica:* al termine del processo di mielinizzazione risultano evidenti nelle immagini T2 dipendenti gli esiti delle lesioni anossiche perinatali come alterazioni iperintense in corrispondenza di entrambi i talami (d) (che appaiono anche ipotrofici) ed in sede sottocorticale rolandica bilateralmente (e).

Le uniche strutture preservate dal danno anossico sono il bulbo, il tegmento pontino e mesencefalico e parte del cervelletto.

Lesioni ischemiche focali

Nelle prime 24-72 ore di vita, nel nato a termine, non sono del tutto infrequenti *infarti cerebrali arteriosi*. Nella maggioranza dei casi la causa dell'occlusione arteriosa rimane ignota; fra le cause accertate quella di maggior rilievo è costituita da difetti della coagulazione [4].

Sempre in fase perinatale, ma con apparente uguale incidenza per prematuri e nati a termine, è relativamente elevato il rischio di trombosi venose endocraniche con conseguente possibilità di *infarti cerebrali venosi*.

Anche per questi infarti l'etiopatogenesi rimane per lo più ignota, ma quando viene accertata è quasi sempre da riferirsi a disturbi della coagulazione.

La RM è più sensibile della ecografia nella valutazione degli infarti arteriosi in fase acuta, in particolare per quanto riguarda quelli localizzati al vertice, dove per la contiguità con la fontanella anteriore risulta spesso impossibile una soddisfacente valutazione tramite ultrasuoni.

All'esame RM, nella lesione infartuale arteriosa acuta, a seguito del relativo edema corticale, si dimostra un caratteristico appiattimento dei solchi corticali interessati e la scomparsa del normale contrasto tra sostanza grigia e sostanza bianca dovuta ad una relativa iperintensità T2 dipendente (Fig. 3) ed ipointensità T1 dipendente della corteccia infartuata. In altri termini la possibilità di identificare la lesione infartuale in fase acuta è dovuta alla precoce modificazione di segnale della corteccia che la rende differenziabile dalla corteccia sana. Così come per le lesioni diffuse anche nel sospetto di lesioni ischemiche focali la tecnica di prima scelta nella fase acuta del danno è tuttavia rappresentata dalla diffusione [1]. Prima della positività delle tecniche di acquisizione tradizionale le immagini dipendenti dalla diffusione dimostrano una importante restrizione della diffusione nell'area infartuale corrispondente ad un aumento di segnale. L'area infartuale dimostra una netta riduzione del coefficiente apparente di diffusione con una corrispondente netta riduzione di segnale nella immagine rappresentativa dell'ADC.

Negli infarti arteriosi del neonato frequentemente si osservano delle componenti emorragiche, anche in fase acuta. Così come le alterazioni cerebrali anossiche diffuse, anche gli infarti arteriosi evolvono rapidamente in focolai malacici.

Gli infarti venosi sono caratterizzati, come nell'adulto, da una importante componente emorragica già evidente in fase acuta; molto spesso vengono confusi con emorragie cerebrali. La trombosi venosa più tipica è quella profonda delle vene cerebrali interne, con

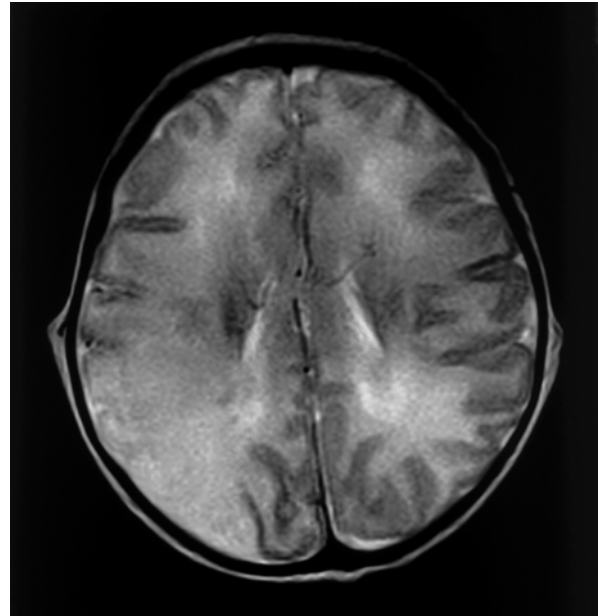


Fig. 3. - Infarto arterioso neonatale. Fase acuta (prime 48 ore). Nella immagine T2 si osserva in corrispondenza della regione rolandica e parietale sinistra (la destra nell'immagine) una sorta di "cancellazione" della normale immagine ipointensa della corteccia. Tale particolare aspetto è conseguente alla relativa transitoria iperintensità della corteccia infartuata.

conseguenti infarcimenti emorragici talamici e capsulo-lenticolari. In questi casi può essere utile eseguire un angio-RM, meglio con tecnica in contrasto di fase per la presenza di metemoglobina intraparenchimale, per documentare l'occlusione venosa.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 19 luglio 2001.

BIBLIOGRAFIA

1. Triulzi F, Baldoli C, Parazzini C. Neonatal MR imaging. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 2001;9(1):57-82.
2. Nowell MA, Hackney DB, Zimmerman RA, Bilaniuk LT, Grossman RI, Goldberg HI. Immature brain: spin-echo pulse sequence parameters for high-contrast MR imaging. *Radiology* 1987;162:272-3.
3. Barkovich AJ. MR of the normal neonatal brain: assessment of deep structures. *AJNR* 1998;19:1397-403.
4. Volpe JJ. *Neurology of the newborn*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 1995.
5. Chugani HT, Phelps ME, Mazziotta JC. Positron emission tomography study of human brain functional development. *Ann Neurol* 1987;22:487-97.
6. Banker BQ, Larroche JC. Periventricular leukomalacia of infancy: a form of neonatal anoxic encephalopathy. *Arch Neurol* 1962;7:386-410.

7. Kuban KCK, Gilles FH. Human telencephalic angiogenesis. *Ann Neurol* 1985;17:539-48.
8. Nelson MDJr, Gonzalez-Gomez I, Gilles FH. The search for human telencephalic ventriculofugal arteries. *AJNR* 1991;12:215-22.
9. Kennedy C, Grave GD, Jehle JW, Sokoloff L. Blood flow to white matter during maturation of the brain. *Neurology* 1970;20:613-8.
10. Volpe JJ. Brain injury in the premature infant. *Clin Perinatol* 1997;24:567-87.
11. Hope PL, Gould SJ, Howard S, Hamilton PA, Costello AM, Reynolds EO. Precision of ultrasound diagnosis of pathologically verified lesions in brain of very preterm infants. *Dev Med Child Neurol* 1988;30:457-71.
12. Grant EG, Schellinger D, Richardson JD, Coffey ML, Smirniotopoulos JG. Echogenic periventricular halo: normal sonographic finding or neonatal cerebral hemorrhage? *AJNR* 1983;4:43-6.
13. Laub MC, Ingrisch H. Increased periventricular echogenicity (periventricular halos) in neonatal brain; a sonographic study. *Neuropediatrics* 1986;17:39-43.
14. Dubowitz LMS, Bydder GM, Mushin J. Developmental sequence of periventricular leukomalacia: correlation of ultrasound, clinical, and nuclear magnetic resonance functions. *Arch Dis Child* 1985;60:349-55.
15. de Vries LS, Eken P, Dubowitz LMS. The spectrum of leukomalacia using cranial ultrasound. *Behav Brain Res* 1992;49:1-6.
16. Inder T, Huppi PS, Zientara GP, Maier SE, Jolesz FA, di Salvo D, Robertson R, Barnes PD, Volpe JJ. Early detection of periventricular leukomalacia by diffusion-weighted magnetic resonance imaging techniques. *J Pediatr* 1999;134:631-4.
17. Aida N, Nishimura G, Hachiya Y, Matsui K, Takeuchi M, Itani Y. MR imaging of perinatal brain damage: comparison of clinical outcome with initial and follow-up MR findings. *AJNR* 1998;19:1909-21.
18. Schouman-Clays E, Henry-Feugeas M-C, Roset F, Larroche JC, Hassine D, Sadik JC, Frija G, Gabilan JC. Periventricular leukomalacia: correlation between MR imaging and autopsy findings during the first 2 months of life. *Radiology* 1993;189:59-64.
19. Flodmark O, Roland EH, Hill A, Whitfield MF. Periventricular leukomalacia: radiologic diagnosis. *Radiology* 1987;162:119-24.
20. Barkovich AJ. *Pediatric neuroimaging*. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 3rd edition; 2000.
21. Barkovich AJ, Westmark K, Partridge C, Sola A, Ferriero DM. Perinatal asphyxia: MR findings in the first 10 days. *AJNR* 1995;16:427-38.
22. Robertson RL, Ben-Sira L, Barnes PD, Mulkern RV, Robson CD, Maier SE, Rivkin MJ, du Plessis A. MR line-scan diffusion-weighted imaging of term neonates with perinatal brain ischemia. *AJNR* 1999;20:1658-70.

Ruolo dei potenziali evocati nell'encefalopatia ipossico-ischemica neonatale: revisione della letteratura

Agnese SUPPIEJ

*Servizio di Neurofisiologia Clinica, Dipartimento di Pediatria,
Università degli Studi, Padova*

Riassunto. - I risultati degli studi sul ruolo dei potenziali evocati (PE) nell'encefalopatia ipossico-ischemica neonatale, uniti alla semplicità di esecuzione, ne incoraggiano l'applicazione nei reparti di terapia intensiva neonatale. Nel neonato a termine potenziali evocati visivi (PEV) e potenziali evocati somestesici (PES) in associazione sono la metodica di scelta per la prognosi neuropsichica a distanza, soprattutto utili nei casi di encefalopatia di grado moderato; nel pretermine essi sono complementari all'ecografia cerebrale, utili nelle fasi precoci quando le lesioni ecografiche sono ancora in evoluzione. I *brainstem auditory evoked potentials* (BAEP) sono la metodica di scelta per l'identificazione precoce dell'ipoacusia neurosensoriale che necessita di intervento. PEV e BAEP sono alla base della prognosi visiva e uditiva a lungo termine. Sono auspicabili studi volti alla definizione del ruolo dei PE nella selezione ed il monitoraggio dei casi da sottoporre a terapie neuroprotettive.

Parole chiave: potenziali evocati, neonato, asfissia.

Summary (*Evoked potentials in neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy: review of the literature*). - Results of the studies on evoked potentials (EP) in neonates with hypoxic-ischaemic encephalopathy and their technical feasibility support extensive application in neonatal intensive care units. The combined application of visual evoked potentials (VEP) and somesthetic evoked potentials (SEP) is the method of choice for neurodevelopmental prognostication in full-term neonate; especially useful in cases with moderate encephalopathy; in preterm neonates EP are complementary to head ultrasound scans, particularly early on when the findings are in the process of evolution. Brainstem auditory evoked potentials (BAEP) are the technique of choice for early identification of sensorineural hearing loss necessitating intervention. Long term prognosis on vision and audition is based on VEP and BAEP. Studies devoted to definition of the role of EP in selection of babies and monitoring neuroprotective intervention are warranted.

Key words: evoked potentials, new-born, asphyxia.

Introduzione

Le conseguenze dell'asfissia perinatale variano dal decesso a vari gradi di deficit sensoriale, motorio e cognitivo.

Dalla revisione della letteratura degli ultimi 20 anni risulta l'utilità dei potenziali evocati nel coadiuvare la formulazione di una prognosi neurologica e sensoriale a distanza, già prima della dimissione dai reparti di terapia intensiva neonatale. Ciò è di estrema importanza per programmare tempestivamente il tipo di monitoraggio e gli interventi terapeutico-riabilitativi.

Dagli studi sperimentali ed anatomo-patologici emerge che le vie visiva, uditiva e somestesica attraversano strutture selettivamente sensibili all'insulto ipossico-ischemico: nella necrosi neuronale selettiva vi è un interessamento particolare della corteccia calcarina, del giro post-centrale, dei corpi genicolati laterali, dei collicoli inferiori del mesencefalo e dei nuclei cocleari; nella leucomalacia periventricolare sono coinvolte particolarmente le radiazioni visive ed uditive [1].

I potenziali evocati (PE) visivi, uditivi e somestesici esplorano il funzionamento delle rispettive vie afferenti alla corteccia: le modificazioni di latenza, ampiezza e morfologia delle risposte possono essere quantificate e confrontate con le risposte normali per l'età e correlate con l'entità dell'asfissia, valutata in base ai parametri clinici, metabolici e neuroradiologici.

Per tali motivi il ruolo di queste metodiche nella valutazione della estensione del danno neuronale e nel monitoraggio della sua evoluzione e dell'eventuale recupero è stato estesamente studiato nel neonato asfittico e più in generale ad alto rischio.

I risultati dei primi studi, a partire dagli anni '70 hanno fornito risultati spesso contraddittori, che erano peraltro gravati da specifiche problematiche metodologiche. Per quanto riguarda le tecniche di stimolazione e registrazione, queste erano quelle derivate dall'adulto e non tenevano conto dell'imaturità neurologica e recettoriale dell'epoca neonatale, inoltre erano ancora scarse le conoscenze sulle caratteristiche della risposta normale alle diverse età concezionali. Per quanto

riguarda le casistiche, i pazienti non erano selezionati in base a specifici parametri suggestivi di asfissia ma per lo più in base ad un generico rischio neurologico, o non veniva operata una suddivisione fra i neonati a termine e quelli pretermine, e in molti studi i PE non venivano eseguiti precocemente, ossia entro la prima settimana di vita.

Gli studi più recenti hanno superato ed in gran parte risolto tali problematiche mettendo a fuoco il ruolo importante dei PE nella prognosi visiva uditiva e neurologica del neonato affetto da encefalopatia ipossico-ischemica (EII), e tali risultati sono particolarmente incoraggianti in particolare nel neonato a termine.

Questa rassegna illustra i dati della letteratura sull'applicazione dei potenziali evocati nelle modalità visiva uditiva e somestesica nel neonato affetto da EII distinguendo le applicazioni ormai consolidate da quelle ancora dibattute per la discordanza dei risultati. Si propone inoltre di individuare i tempi e le modalità ottimali di esecuzione dei potenziali evocati multimodali.

Studi sul ruolo dei potenziali evocati uditivi del tronco cerebrale (brainstem auditory evoked potentials-BAEP)

I BAEP sono una metodica elettrofisiologica che consente di documentare il funzionamento delle strutture del sistema uditivo dalla coclea al collicolo inferiore del mesencefalo, indipendentemente dalla collaborazione e dallo stato di vigilanza. Sono perciò particolarmente adatte a valutare precocemente la presenza di ipoacusia neurosensoriale e di disfunzioni del tronco cerebrale nella porzione attraversata dalla via uditiva centrale dall'emergenza dell'VIII nervo cranico in corrispondenza della giunzione bulbo-pontina fino al collicolo inferiore del mesencefalo. Per l'impiego neurologico della metodica è necessaria l'integrità uditiva, per l'impiego audiologico è necessaria l'integrità della via acustica centrale dove hanno sede i generatori della V onda, sull'identificazione della quale alle basse intensità si basa la determinazione della soglia uditiva.

Alterazioni dei BAEP nel neonato affetto da EII si possono osservare sia per una sofferenza della coclea, sia per la suscettibilità all'ipossia delle strutture uditive centrali (nuclei cocleari e olivari superiori, collicoli inferiori del mesencefalo [2]).

Gli studi istopatologici suggeriscono che il tronco cerebrale è vulnerabile all'ipossia [3], in particolare vengono segnalati perdita di cellule con gliosi e segni di sofferenza ischemica nei nuclei cocleari.

Il ruolo dei BAEP nella prognosi audiologica e neurologica è ben documentato nei neonati ricoverati nelle unità di terapia intensiva neonatale (UTIN), purtroppo la maggioranza degli studi si riferisce a casistiche genericamente ad alto rischio in cui rientrano

anche, ma non solo, neonati asfittici [4-8]. La sofferenza cocleare in tali soggetti è documentata molto più frequentemente di quella della via uditiva centrale. Sono minori invece gli studi che valutano i BAEP in popolazioni di neonati selezionati per asfissia perinatale.

Il significato fisiopatologico e prognostico di alterazioni delle componenti troncoencefaliche dei BAEP è diverso nel neonato a termine e pretermine e a seconda del tipo di alterazioni e della loro persistenza nel tempo.

Alterazioni delle componenti centrali dei BAEP, compromissione in ampiezza (valutabile con il rapporto di ampiezza V/I) e del tempo di conduzione centrale (valutato in base all'intervallo di latenza (IPL) I-V), osservate nel periodo neonatale sono potenzialmente reversibili entro 3-4 settimane secondo alcuni autori [9] entro 6 mesi-1 anno secondo altri [10].

Anomalie delle componenti centrali della risposta che persistano oltre l'età neonatale, con un pattern di importante compromissione in ampiezza (ampiezza V/I), indicano, per lo più una prognosi neurologica severa.

Già negli anni '80 Hecox *et al.* [11] riportano alterazioni centrali dei BAEP (15 % anomalie dell'IPL I-V, 17% ampiezza V/I) in un gruppo di 126 bambini con pregressa asfissia ad esordio perinatale e nei primi 18 mesi di vita; dei 21 soggetti che presentavano un'alterazione del rapporto di ampiezza V/I persistente, 13 avevano sofferto di asfissia perinatale, di essi 4 sono morti e gli altri presentano quadriplegia spastica ad un follow up medio di 2 anni. Tali neonati erano a termine ed i BAEP erano stati eseguiti fra il 3° e il 14° giorno di vita.

Anche Stockard *et al.* [9] hanno osservato che le alterazioni centrali dei BAEPs, con pattern di assenza o importante decremento di ampiezza delle componenti centrali, tende a persistere e si associa ad una prognosi severa con pesanti sequele neurologiche o decesso.

Jiang *et al.* [10] in uno studio sulla maturazione dei BAEPs dopo asfissia perinatale hanno osservato che alterazioni di ampiezza della V onda alla nascita, valutata con criteri meno severi rispetto a Stockard ed Hecox, sono più frequenti in neonati con asfissia severa e che tali alterazioni persistono dopo un anno in circa la metà dei pazienti, negli altri vi è un miglioramento con tendenza a restare ai valori inferiori della norma. Sfortunatamente in tale lavoro non viene valutato il significato prognostico, il riscontro di tali alterazioni impone un monitoraggio.

Dal punto di vista metodologico va rilevato che in particolare in età neonatale, il rapporto d'ampiezza V/I può essere ridotto anche per elevate intensità di stimolazione che aumentano l'ampiezza del I picco rispetto a quella del V e da filtri per le basse frequenze troppo alti che riducono l'ampiezza del V picco, perciò per una corretta valutazione si devono tenere sotto controllo tali variabili.

A differenza di quanto sopra esposto, quando l'alterazione delle componenti centrali dei BAEP concerne il tempo di conduzione centrale, nel neonato a termine, un aumento transiente dell'IPL I-V si riscontra spesso ed è compatibile con una prognosi a breve termine priva di sequele [12]. Alterazioni del tempo di conduzione centrale, nel neonato nato > 35 SG, sono state associate da Jiang ad asfissia severa e tendono a normalizzarsi intorno al sesto mese [10], tale aumento transitorio degli IPL è stato attribuito ad ipertensione endocranica da edema cerebrale conseguente all'asfissia, documentata con la tomografia assiale computerizzata [13]; questa ipotesi sarebbe avvalorata anche dal riscontro di normalizzazione dei BAEP dopo terapia antiedemigena con glicerolo [14]. Quanto detto fa riflettere anche sul possibile ruolo dei potenziali evocati oltre che nella prognosi anche nel monitoraggio terapeutico e nel coadiuvare la comprensione di alcuni meccanismi fisiopatologici.

Anormalità transitorie dei BAEP, più frequentemente a livello del tempo di conduzione centrale, si osservano spesso nel neonato asfittico pretermine e tendono a normalizzarsi al termine parallelamente alla normalizzazione del quadro neurologico; in alcuni casi alterazioni anche molto marcate possono associarsi ad uno sviluppo neurologico normale nonostante la persistenza di BAEP patologici [9, 15].

La recente osservazione che le anomalie transitorie dell'IPL I-V dei BAEP nel periodo perinatale sono frequentemente associate ad alterazioni neuromotorie lievi ed intellettive in età prescolare [16] e scolare [17], sembrerebbe riproporre il ruolo anche di tali alterazioni nella prognosi neurologica del neonato asfittico.

In seguito a quanto detto va sottolineato che perché i BAEP siano utilizzabili a fini prognostici non ci si può limitare ad una sola registrazione nella fase acuta, infatti risposte alterate devono essere ricontrollate nel tempo finché non si stabilizzano [18].

E' inoltre importante sottolineare che la normalità dei BAEP non garantisce una prognosi neurologica normale, la presenza di falsi negativi emerge concordemente in tutti gli studi ed è supportata dal riscontro che nelle paralisi cerebrali infantili (PCI) raramente i BAEP risultano alterati.

Tali dati possono trovare spiegazione nell'ipotesi che la sede del danno in questi pazienti potrebbe coinvolgere prevalentemente la corteccia o i gangli della base, oppure che la metodica non è in grado di cogliere, se non in casi estremi, la sofferenza troncoencefalica.

Quest'ultima ipotesi sembrerebbe avvalorata da un recente studio [19] in cui i BAEP vengono evocati da stimoli costituiti da treni di impulsi pseudo-random in sequenze binarie (*maximum length sequence* BAEP) che permettono di utilizzare una elevata frequenza di stimolazione andando a valutare l'efficienza sinaptica ed il periodo refrattario. Lo studio con tale metodica di

neonati asfittici a termine, entro la prima settimana di vita, documenta alterazioni in una percentuale di neonati più elevata rispetto alla metodica tradizionale, tali alterazioni sembrano correlare con la gravità dell'asfissia (Sarnat 2-3, acidosi metabolica con $\text{pH} < 7,10$, ipossia ed ipercapnia), e sembrano risolversi in qualche settimana. Il significato di tali alterazioni non è ancora chiaro ma potrà delinarsi con studi di follow up a medio e lungo termine.

Fin dalla loro scoperta i BAEP sono la metodica di scelta per l'identificazione precoce di ipoacusia neurosensoriale, attualmente vengono anche impiegate a tale scopo le emissioni otoacustiche evocate da transienti (EOA), metodica più veloce ma gravata da maggiori falsi positivi. Spesso si utilizzano protocolli in due fasi che prevedono una iniziale valutazione con EOA seguita da BAEP nei neonati con test EOA patologico [20].

L'ipoacusia moderata-grave si osserva nel 2-5% dei neonati ad alto rischio, l'ipossia è il più importante dei fattori perinatali responsabili di alterazioni di soglia documentabili con i BAEP. L'ipossia può danneggiare infatti la coclea, è stato dimostrato che essa comporta depressione del potenziale endococleare generato a livello della scala media della coclea nell'orecchio interno [21]. Galambos ha osservato che solo i neonati asfittici in cui era documentato ripetutamente un $\text{pH} < 7,25$ avevano una soglia elevata, perciò essa sarebbe più propriamente imputabile all'acidosi conseguente all'ipossia [4].

Sembra esistere un periodo critico nel corso dello sviluppo in cui la coclea è particolarmente vulnerabile all'ipossia, tale periodo è compreso fra l'epoca prenatale ed il terzo mese circa di vita post-natale [22]. Ciò spiega perché l'ipoacusia neurosensoriale è una complicanza dell'ipossia perinatale ma non di quella post-natale [23].

L'ipoacusia neurosensoriale conseguente ad anossia può causare sia perdite uditive profonde, che perdite moderate con reclutamento, dal punto di vista metodologico sarà perciò importante la scelta dell'intensità di stimolo, si dovrà considerare cioè la necessità di utilizzare anche stimoli ad intensità vicine alla soglia acustica, perché le risposte ad elevate intensità potrebbero essere normali.

Stockard *et al.* [9] identificano due pattern di alterazioni periferiche dei BAEP, il primo consiste in un aumento di latenza del I picco ed un innalzamento da lieve a moderato della soglia uditiva, denominato pattern trasmissivo, generalmente transitorio ma associato ad un maggior rischio di otiti ricorrenti nei primi mesi di vita. Il secondo pattern è caratterizzato da marcato aumento di soglia del I e V picco, e da una curva intensità-latenza alterata, tale pattern può essere transitorio, evolvendo verso la normalizzazione o nel pattern di primo tipo, e se persiste può preludere ad ipoacusia neurosensoriale.

Un aspetto importante da considerare nello screening audiologico del neonato asfittico, è l'età più opportuna per eseguire il test. Si è, infatti, osservato che quando lo screening audiologico mediante BAEP è effettuato prima della dimissione dall'UTIN la percentuale di fallimenti al test è molto maggiore (10-20% secondo le casistiche) di quando essa è eseguita dopo i primi tre mesi (2-5%) [4-8, 17, 24]. Tale riscontro è probabilmente conseguente al sovrapporsi di due ordini di fattori: la presenza d'ipoacusia trasmissiva transitoria, in alcuni casi favorita dall'intubazione [25] e, particolarmente nel neonato asfittico, una sofferenza transitoria della via acustica centrale dove hanno sede i generatori della V onda [9], sull'identificazione della quale alle basse intensità si basa la determinazione della soglia uditiva.

In conclusione: componenti centrali assenti o marcatamente depresse sono predittive di sequele neurologiche a lungo termine, alterazioni anche transitorie dell'IPL I-V si associano ad uno sviluppo neurologico normale nei primi anni di vita ma possono predire deficit neurocognitivi in età scolare, alterazioni transitorie della soglia nell'immediato periodo post-natale sono frequenti, spesso riflettono ipoacusia trasmissiva e possono associarsi ad un maggior rischio d'infezioni ricorrenti dell'orecchio medio nella prima infanzia. E' più opportuno perciò effettuare lo screening dell'ipoacusia neurosensoriale dopo il primo mese di vita per evitare eccessivi falsi positivi.

La scelta del "timing" per l'esecuzione dei BAEP andrà perciò ponderata in base all'obiettivo da raggiungere.

Per l'identificazione dell'ipoacusia neurosensoriale nel neonato asfittico sarà opportuno eseguire il test dopo il primo mese quando è meno gravato da falsi positivi e prima del sesto mese quando, per consentire il miglior recupero del linguaggio, deve iniziare il trattamento protesico-riabilitativo.

Per valutare il rischio neurologico andranno eseguiti nel periodo perinatale, e ripetuti fino a stabilizzazione, potendo così identificare le alterazioni transitorie, predittive di sequele neurocognitive in età scolare e le alterazioni persistenti, predittive di prognosi severa a breve termine.

Studi sul ruolo dei potenziali evocati somestesi (PES)

I PES riflettono il funzionamento di strutture ai diversi livelli del sistema nervoso: nervo periferico, midollo spinale, tronco cerebrale, talamo e corteccia cerebrale.

Nel neonato asfittico a termine sono elettivamente coinvolte la corteccia e la sostanza bianca sotto-corticale in sede parietale dove si trovano i generatori dei PES; infatti, il pattern di alterazione più frequente è l'insulto parasagittale [26]. Nel neonato asfittico pretermine è

coinvolta la sostanza bianca periventricolare attraversata dalle afferenze somestesi talamo-corticali sede della leucomalacia periventricolare.

Nonostante queste valide premesse, negli studi meno recenti, problematiche quali l'eterogeneità delle casistiche (neonati con diversi fattori di rischio neurologico, mancanza di suddivisione dei dati ottenuti nel neonato a termine e pretermine) e l'eterogeneità di distanza fra l'esecuzione dei PES rispetto all'insulto anossico-ischemico rendono difficile delineare il ruolo diagnostico/prognostico della metodica. Inoltre in epoca neonatale le risposte corticali risultavano troppo variabili e talora assenti anche nel neonato sano. Studi più recenti hanno evidenziato la necessità di adattare le tecniche di stimolazione e registrazione all'imaturità neurologica e chiarito le caratteristiche della risposta normale alle diverse età aprendo la strada alle applicazioni cliniche [27, 28].

Hrbek *et al.* [29] per primi hanno utilizzato i PES insieme ai PEV nella valutazione di 57 neonati asfittici riscontrando PES alterati nei primi giorni di vita nel 65% dei casi, ma l'interpretazione di tali dati è difficile perché non sono riportati età gestazionale, metodi e follow up.

Lutschg *et al.* [30] hanno riscontrato PES assenti alla nascita in sei neonati affetti da leucomalacia periventricolare che a tre mesi presentavano paralisi cerebrale ed epilessia. Gorke *et al.* [31] hanno osservato PES alterati in 19/73 neonati ad alto rischio con esame neurologico patologico entro 10 mesi di vita. Majnemer *et al.* [32] in 42 neonati affetti da asfissia, peso molto basso e piccoli per età gestazionale (di cui 29 a termine), studiati anche con BAEP, documentano una sensibilità del 79% e specificità dell'88% nel predire lo sviluppo psicomotorio a 12 mesi, ma l'aggiunta dei BAEP, non sembra migliorare il valore predittivo; interessante è il riscontro di quadriparesi spastica nei quattro soggetti con risposta corticale persistentemente assente e di lieve ritardo nello sviluppo psicomotorio e anomalie del tono muscolare in quattro neonati pretermine asfittici con PES corticali di latenza aumentata in epoca neonatale normalizzata a due mesi. Pierrat *et al.* [33], a differenza degli autori precedenti, hanno ristretto la valutazione a 33 neonati pretermine con leucomalacia periventricolare cistica ed osservato che tutti i pazienti avevano un esame neurologico alterato al follow up, indipendentemente dal riscontro di PES normali o con aumento di latenza della N1, dimostrando così che, in tale sottopopolazione di pazienti, i PES non aggiungono informazioni prognostiche

I PES sono stati utilizzati con successo nella valutazione diagnostica in epoca neonatale solo recentemente, i risultati riflettono il miglioramento metodologico, la selezione dei pazienti in base agli indicatori di asfissia più accreditati e l'analisi dei risultati in base alla nascita a termine/pretermine.

Studi nel neonato a termine

Numerosi studi in cinque diversi laboratori hanno dimostrato il ruolo fondamentale dei PES nella prognosi neurologica del neonato a termine.

Willis *et al.* [34] studiano i PES dal secondo mese di vita in 10 soggetti nati a termine con precedente asfissia perinatale: la risposta risulta normale in quattro in cui si osserva uno sviluppo neuromotorio normale, alterata in sei con PCI. Nonostante l'ottimo ruolo prognostico dei PES osservato in questo studio, mancano informazioni sul loro valore prognostico nelle fasi precoci dell'insulto ipossico-ischemico. De Vries *et al.* [35] hanno confrontato i risultati dei PES eseguiti in 34 neonati a termine entro 24 ore di vita e ripetuti due volte la settimana fino alla dimissione, con lo sviluppo psicomotorio a 9 e 18 mesi: tutti i pazienti con risposta normale alla 2° settimana di vita erano normali al follow up, fra quelli con PES alterati, quando la risposta era assente il rischio di sequele neurologiche era del 100%, quando la risposta era presente ma di latenza aumentata era del 73%. Inoltre mentre nei pazienti con encefalopatia severa (grado III di Sarnat) e modesta (grado I) la prognosi poteva essere formulata anche in base al dato clinico ed ecografico, nei casi con encefalopatia di grado II la distinzione fra neonati con prognosi favorevole e sfavorevole poteva essere formulata solo sulla base dei PES. In tale studio si documenta anche l'utilità dei PES; nel discriminare i pazienti a rischio neurologico, fra quelli con ipercogenicità transitorie documentate con l'ecografia transfontanellare. Gli stessi autori in uno studio successivo [28] su 73 neonati hanno approfondito il problema del momento migliore per eseguire i PES; da tale studio risulta che già entro le 24 ore di vita il riscontro di PES normali garantisce una buona prognosi con una sensibilità del 94% (valore predittivo negativo del 92,8%); una risposta assente garantisce una prognosi severa, mentre una risposta di latenza aumentata impone la ripetizione dei PES nella seconda metà della prima settimana di vita (valore predittivo positivo dal 65,3% in prima giornata di vita al 91,8% prima della dimissione). Gibson *et al.* [36] hanno registrato i PES dal nervo mediano nei primi giorni di vita e valutato l'esame neurologico e lo sviluppo psicomotorio ad un anno in 30 neonati. Dei 13 neonati con valutazione neurologica e scala di sviluppo normale tutti avevano PES normali dopo il quarto giorno di vita, dei sette neonati con quadro neurologico alterato (4 paralisi cerebrali e tre con distonie e basso *score* di sviluppo) tutti avevano PES alterati, 10 neonati sono deceduti, tutti presentavano PES assenti. Taylor *et al.* [37] invece, in uno studio su 57 neonati a termine studiati anche con PEV, hanno osservato che alterazioni dei PES nei primi giorni di vita non sono un segno prognostico negativo, e che la presenza di PES normali o normalizzati entro la prima settimana si associa quasi costantemente con uno

sviluppo normale al follow up di 18-24 mesi (sensibilità del 96%); dei 26 neonati con PES alterati al termine della 1° settimana di vita 22 hanno dimostrato uno sviluppo neuromotorio alterato, gli altri normale. Gli autori sottolineano che la contemporanea esecuzione dei PEV migliora sensibilmente la predittività. Harbord e Weston [38] in uno studio di nove pazienti confermano l'elevato valore dei PES eseguiti nella prima settimana di vita per la prognosi neurologica a 9 e 36 mesi e ne dimostrano la superiorità rispetto all'EEG ed all'ecografia transfontanellare.

Studi nel neonato pretermine

Sono numerosi gli studi con potenziali evocati nei neonati ad alto rischio. La difficoltà di separare il contributo dei diversi fattori di rischio in tale popolazione è probabilmente responsabile dell'assenza di pubblicazioni dedicate specificamente al ruolo dei PES nel neonato asfittico.

Con i progressi nel campo dell'ostetricia e della neonatologia, d'altro canto, si assiste ad una riduzione dei casi di asfissia nel neonato a termine e all'aumento della sopravvivenza dei neonati pretermine in cui spesso si riscontra anche un quadro di asfissia.

A differenza di quanto riportato per il neonato a termine, la letteratura non è concorde sul ruolo dei PES nel neonato pretermine. Va premesso che mentre nel neonato a termine la sede più a rischio di danno ipossico-ischemico è localizzata in regioni di non facile esplorazione con l'ecografia transfontanellare (sede cortico-sottocorticale parasagittale), invece nel neonato pretermine le regioni più coinvolte sono quelle periventricolari, molto ben visualizzate con gli ultrasuoni. Per tali ragioni il ruolo prognostico dei PES è stato spesso confrontato, in tale popolazione, con il ruolo dell'ecografia cerebrale.

Klimak e Cooke [39] su 30 neonati pretermine con anomalie ecografiche di vario grado hanno osservato una buona correlazione con la prognosi in particolare nei test eseguiti intorno alla 40 SC: tutti quelli con PES normali presentavano esame neurologico normale a 6-18 mesi nonostante la presenza di anomalie ecografiche, tutti quelli con PES alterati (aumento di latenza N1) avevano un esame neurologico alterato o un ritardo nello sviluppo psicomotorio, il valore predittivo positivo relativo a paralisi cerebrale era 83%, le alterazioni ecografiche erano in questo studio meno predittive dei PES. Lo stesso gruppo ha successivamente studiato i PES dal nervo tibiale posteriore in 50 neonati con alterazioni ecografiche, dimostrando una sensibilità per paralisi cerebrale del 77,4%, ed una specificità (assenza di paralisi cerebrale) nel 94% sovrapponibile a quanto riscontrato dagli stessi autori in precedenza con PES dal nervo mediano. La combinazione di ecografia di

controllo e PES migliorava la predittività: quando vi era concordanza fra PES normali e normalizzazione ecografica si poteva prevedere una normalità neuromotoria a 3 anni nel 100% dei casi, quando vi era una concordanza fra alterazioni dei PES ed ecografia un quadro neurologico alterato era correttamente previsto nel 91% dei casi, in caso di discordanza erano più veritieri i PES [40]. Willis *et al.* [41] hanno studiato i PES a due, quattro e sei mesi in 39 neonati pretermine di peso molto basso con emorragia periventricolare documentata ecograficamente: i 12 soggetti con PES alterati (assenza unilaterale o aumento latenza N1), presentavano alterazioni motorie a 22 mesi di vita (valore predittivo positivo 100%), 19/36 soggetti con PES normali al primo controllo erano normali al follow up (valore predittivo negativo 53%) se la normalità persisteva al controllo dei sei mesi il valore predittivo negativo raggiungeva l'86%. Non è chiaro in questo studio il confronto fra il ruolo prognostico dei PES e quello dell'ecografia transfontanellare.

De Vries *et al.* [42] in 126 neonati pretermine di età gestazionale < 35 settimane osservano una sensibilità del 44% per paralisi cerebrale a 18 mesi ed una specificità del 92%, l'ecografia ha una sensibilità superiore (73,6%) ed una specificità inferiore (83%). Quando la normalità dell'ecografia concorda con quella dei PES la normalità neurologica si osserva in tutti i 35 neonati con peso appropriato per età gestazionale meno uno affetto da distonia transiente, invece è frequente un aumento di latenza dell'N1 in neonati piccoli per età gestazionale clinicamente normali, con ecografia normale. Quando si associano anomalie dei PES con alterazioni importanti dell'ecografia il valore predittivo positivo arriva al 100%.

Ekert *et al.* [43] in 88 neonati < 32 settimane gestazionali privi di anomalie congenite ed infezioni pre e post-natali documentano una significativa associazione fra alterazioni dei PES entro la terza settimana di vita e la presenza di leucomalacia periventricolare, ma il potere predittivo di paralisi cerebrale è migliore con l'ecografia (93%) che con i PES (69%). I PES si rivelano complementari, in particolare se normali, suggerendo una buona prognosi pur in presenza di alterazioni ecografiche.

Pierrat *et al.* [44] dall'analisi di PES dal nervo mediano e tibiale posteriore in 39 neonati < 37 SG, confrontati con ecografie normali o con vari gradi di leucomalacia o emorragia periventricolare, rilevano che lesioni parenchimali conseguenti a leucomalacia cistica o emorragica rilevata ecograficamente, costituiscono un criterio prognostico migliore (sensibilità 95,6%, specificità 68,5%) dei PES dal nervo tibiale (sensibilità 95,6%, specificità 50%); le due metodiche risultano complementari anche in questo studio (sensibilità 91,3%, 81,2%). La prognosi è meno accurata con i PES dal nervo mediano rispetto ai PES dal nervo tibiale posteriore (specificità del 100%, sensibilità 13%). Gli studi citati

hanno valutato il ruolo prognostico dei PES in base allo sviluppo neuromotorio nei primi anni di vita.

Recentemente è stato approfondito il ruolo della metodica nella prognosi neuro-cognitiva in età prescolare e scolare, però sono stati valutati neonati ricoverati in UTIN senza suddividerli in base all'età gestazionale e, oltre agli asfittici, sono stati anche reclutati neonati di peso molto basso appropriati e piccoli per età gestazionale. I PES risultavano molto accurati nella valutazione prognostica con una specificità dall'86 al 100% nei diversi settori esplorati (QI, abilità motorie, integrazione sensori-motoria), il valore predittivo negativo andava dall'86 al 100%, nelle funzioni intellettive, comunicazione, performances motorie ed abilità sensori-motorie mentre era peggiore (57-71%) per lo stato neurologico, la qualità di vita e la socializzazione [16, 17].

In conclusione, dalla letteratura emerge il ruolo prognostico fondamentale dei PES AS nella prognosi neuropsichica ai 2-3 anni di età del neonato asfittico a termine con risposte normali associate a sviluppo normale nel 96-100% dei casi e risposte patologiche associate ad alterazioni psicomotorie nel l'87-92% (in particolare con pattern di assenza persistente della risposta corticale), se anche i PEV sono alterati l'accuratezza prognostica raggiunge il 100%. I potenziali evocati risultano particolarmente utili soprattutto nei quadri di encefalopatia moderata (grado II di Sarnat) in cui l'esame clinico, l'EEG e le neuroimmagini non consentono una precisa valutazione prognostica.

Nel neonato pretermine è più difficile effettuare una prognosi accurata, poiché risulta problematico scorporare i diversi fattori di rischio, e il test diagnostico la cui utilità prognostica è maggiormente riconosciuta e consolidata è l'ecografia transfontanellare. La letteratura è concorde nel rilevare che il valore predittivo di paralisi cerebrale aumenta nei neonati con leucomalacia cistica o emorragica se vi è concordanza fra ecografia cerebrale e PES. I PES sono più precoci, perciò utili soprattutto nella prima settimana di vita quando i riscontri ecografici sono ancora in evoluzione; inoltre la normalità dei PES aiuta a individuare fra i neonati affetti da emorragia periventricolare quelli a prognosi favorevole. I PES dal nervo tibiale posteriore sembrano essere più sensibili di quelli dal nervo mediano, la metodica è però più lunga e laboriosa e gravata da maggiori falsi positivi.

Studi recenti sulle sequele neurocognitive in età pre e scolare nel neonato ad alto rischio valorizzano il ruolo predittivo di pregresse alterazioni dei PES in epoca neonatale.

Studi sul ruolo dei potenziali evocati visivi (PEV)

Nell'asfissia perinatale si possono osservare alterazioni ai vari livelli del sistema visivo: retinopatia del prematuro, otticopatia ischemica di diversa severità

evidente all'esame del *fundus oculi* solo dopo diversi mesi, esiti d'insulto alle vie retrochiasmatiche.

Nel neonato pretermine l'asfissia comporta emorragia nella matrice germinale più o meno associata ad estensione al sistema ventricolare o al parenchima cerebrale e/o sofferenza ischemica in corrispondenza della sostanza bianca periventricolare, nel neonato a termine si ha invece un coinvolgimento della corteccia e della sostanza bianca sottocorticale che primariamente coinvolge le regioni parasagittali e che nei casi più gravi si estende alla corteccia calcarina sede delle aree visive primarie o alla corteccia parieto-temporale sede delle aree visive associative [1].

Il ruolo dei PEV in tali pazienti è duplice, da un lato assistere la diagnosi precoce di disfunzione ai vari livelli del sistema visivo, dall'altro coadiuvare la prognosi visiva e neurologica.

Il ruolo dei PEV nella diagnosi e prognosi visiva del neonato a rischio è ben documentato in letteratura. PEV normali si associano in genere ad un buon recupero delle capacità visive: Kurtzberg [45] in un gruppo di 79 neonati di basso peso studiati alla 40 SG osservano PEV-flash normali nel 51% dei casi, di questi il 97% aveva un follow up visivo (*eye movement potentials*, PEV da stimolo strutturato) normale ad un anno d'età; nei neonati con PEV alterati persistevano alterazioni al follow up in più del 75%. Mc Culloch *et al.* [46] in 25 neonati a termine asfittici osservano che tutti i neonati con PEV normali o con alterazioni transitorie erano esenti da ipovisione al follow up all'età 2,5-4 anni; PEV persistentemente anormali o assenti hanno identificato i soggetti a rischio d'ipovisione (valutata con PEV da stimolo strutturato, visita oculistica e, nei soggetti collaboranti, test di visione preferenziale) con una sensibilità del 100% ed una specificità dell'84%, un valore predittivo positivo del 67% ed un valore predittivo negativo del 100%; invece grado d'encefalopatia, indice d'Apgar e pH arterioso non erano predittivi d'ipovisione.

E' peraltro importante considerare che in rari casi i PEV sono normali alla presenza di cecità corticale, ciò ha fatto considerare l'ipotesi che i PEV siano generati a livello sottocorticale [47] anche se tale riscontro potrebbe anche dipendere dalla normalità della corteccia visiva primaria con presenza di un danno alle aree associative.

Il ruolo dei PEV nella *prognosi neurologica* è controverso, si osservano casistiche, metodologie e intervalli fra il test e l'insulto neurologico, eterogenei.

Hrbek *et al.* [29] in 57 neonati asfittici classificati in base al punteggio di Apgar hanno osservato che PEV gravemente e persistentemente alterati sono predittivi di sequele neurologiche a distanza mentre quelli con alterazioni lievi o normali di un quadro neurologico normale. Gli autori hanno inoltre osservato, nei 72 pazienti che avevano eseguito anche i PES, che la combinazione dei due esami migliorava l'accuratezza della prognosi, ma lo studio non specifica i tempi di

esecuzione e le età gestazionali. Gambi *et al.* [48] descrivono 18 neonati a termine e pretermine, affetti da *distress* respiratorio, e osservano che solo quelli con forme moderate o severe hanno PEV statisticamente diversi dai controlli; questo studio non dimostra una chiara correlazione dei PEV con la prognosi neurologica. Hakamada *et al.* [49] in uno studio su PEV e BAEP in neonati a rischio osservano che tutti i pazienti con PEV alterati oltre le due settimane sono patologici al follow up a sei mesi, le sequele sono più severe quanto più a lungo persistono le alterazioni dei PE, e una risposta assente è caratteristica dei pazienti con quadro neurologico più grave. Il 28,6% dei neonati con PEV normali presentavano sequele neurologiche e il 30% di quelli con PEV alterati erano normali al follow up. Questa inaccettabile proporzione di falsi positivi e negativi potrebbe dipendere da casistiche non selezionate, dall'analisi cumulata dei due diversi tipi di PE e dal campione normativo probabilmente costituito da soggetti non completamente normali. Häkkinen *et al.* [50] in uno studio su 109 neonati pretermine ed a termine a rischio, di cui il 42% asfittici, osservano che nell'80% il quadro clinico neurologico è normale all'età di un anno e si associa a PEV normali entro i sei mesi di vita. I restanti soggetti sono stati suddivisi in base all'evoluzione in due gruppi: nel primo con quadro neurologico severo all'età di un anno i PEV eseguiti prima dei tre mesi risultavano alterati in 6/7 (86%), nel secondo con quadro neurologico moderatamente alterato solo il 54% (7/13) aveva PEV alterati; l'assenza dei PEV sembra essere accurata nel predire una prognosi severa ma non moderata. Eken *et al.* [51] riportano nove neonati fra 35 e 40 SG con evoluzione in ipovisione centrale dopo 18 mesi da insulto ipossico-ischemico, tutti dimostravano leucomalacia cistica periventricolare e avevano una compromissione neuromotoria grave; nei cinque neonati a termine i PEV erano marcatamente alterati, nei quattro pretermine si è osservata un'alterazione (in tre è migliorata, in uno peggiorata). In conclusione negli studi in cui si analizzano separatamente casistiche di neonati a termine e pretermine il ruolo dei PEV nella prognosi neurologica è più chiaro.

Studi nel neonato a termine

Un unico gruppo in tre lavori successivi valuta il ruolo dei PEV nella prognosi neurologica del neonato a termine asfittico [52-54] dimostrando che i PEV sono utili nella prognosi neurologica a lungo termine con accuratezza del 94%.

Sono stati studiati complessivamente 93 neonati a termine selezionati con criteri di inclusione molto precisi (assenza di anomalie congenite, parto distocico, disordini neuromuscolari), i PEV erano eseguiti entro tre giorni di vita, al settimo giorno e poi settimanalmente, e il

follow up proseguiva fino al secondo anno di vita. Dei 54 neonati con PEV normali 48 avevano uno sviluppo neuromotorio normale (sensibilità 89%), tutti i 39 neonati con PEV persistentemente alterati o assenti nel corso della prima settimana di vita sono deceduti o sopravvissuti con sequele neurologiche (specificità 100%). E' importante rilevare che questi risultati sono applicabili con maggiore confidenza soprattutto in quei neonati con encefalopatia moderata (grado II di Sarnat) in cui la clinica, l'EEG e l'ecografia cerebrale sono meno utili nella prognosi.

Lo stesso gruppo [37] ha inoltre studiato i PES dal nervo mediano in 57 degli stessi pazienti sottoposti a PEV per vedere se l'accuratezza prognostica poteva essere migliorata. Dallo studio emerge che i PES sono più difficili da registrare in modo accurato nella prima settimana di vita, sia per problemi tecnici di interferenze elettromagnetiche che di salute del neonato, risultando quindi indicatori prognostici meno accurati rispetto ai PEV. I PES però dimostrano una elevata sensibilità (96%) ed un valore predittivo negativo elevato (97%). Da questi risultati gli autori suggeriscono di eseguire prima i PEV, se essi sono persistentemente alterati, (visto l'elevato valore predittivo positivo (100%), i PES non aggiungono ulteriori informazioni) se invece i PEV sono normali l'accuratezza prognostica può essere aumentata eseguendo i PES, perché la loro normalità praticamente garantisce uno sviluppo neurologico normale.

Studi nel neonato pretermine

Placzek *et al.* [55] in 26/70 neonati pretermine affetti da emorragia intraventricolare riscontrano PEV normali in più del 90% dei pazienti con quadro normale al termine, ma la maggioranza dei neonati presentava un PEV con morfologia immatura. De Vries *et al.* [56] documentano una chiara correlazione fra l'assenza dei PEV in neonati di EG<34 settimane con cisti sottocorticali persistenti oltre le 40 SC documentate ecograficamente, e sviluppo di ipovisione, paralisi cerebrale e ritardo mentale; invece nei pazienti con leucomalacia cistica periventricolare spesso si osservano PEV con morfologia alterata che si associa ad un quadro neurologico normale e visione normale ed alla presenza di strabismo. L'ecografia si normalizza dopo la 40^a settimana concezionale. Ekert *et al.* [57] osservano che in 123 neonati di EG<32 settimane, valutati prevalentemente entro la prima settimana con PEV ed ecografia cerebrale, 76/89 con PEV normali avevano uno sviluppo normale a 24 mesi, e dei 15/89 con PEV alterati in cinque erano presenti sequele neurologiche ed in 10 assenti.

Recentemente Shepherd *et al.* [58] hanno studiato 81 neonati pretermine al terzo giorno di vita ed a 40 settimane concezionali, escludendo sindromi genetiche e malformative e suddividendoli in alto e basso rischio e in base all'età gestazionale. Gli autori dimostrano che

se i PEV vengono eseguiti precocemente, ripetuti nel tempo, confrontati con adeguati parametri normativi, alterazioni (aumento di latenza, perdita di componenti proprie dell'età concezionale, assenza componente P2 nel neonato a termine e aumentata latenza N3 nel pretermine) sono utili nella previsione di morte (sensibilità 86%, specificità 89%, valore predittivo positivo 43%) e di paralisi cerebrale (sensibilità 60%, specificità 92%, valore predittivo positivo 43%); la normalità dei PEV avrebbe invece un valore predittivo negativo di morte del 99% e di PCI nel 96%. Questo studio fornisce risultati molto incoraggianti che però necessitano di essere confermati in studi che valutino un maggior numero di neonati patologici e con un follow up più lungo.

In conclusione, i PEV sono utili nella valutazione diagnostica dei deficit visivi e nella prognosi visiva a distanza sia nel neonato a termine che pretermine, con risultati migliori nel neonato a termine. Nel neonato a termine l'assenza di PEV oltre la prima settimana di vita è predittiva di sequele neurologiche a distanza con una specificità del 100%. Nel neonato pretermine invece il ruolo prognostico dei PEV è discusso, anche se una migliore selezione delle casistiche, l'esecuzione a breve distanza di tempo dall'insulto ipossico-ischemico, la ripetizione nelle fasi di stabilizzazione ed il confronto con adeguati dati normativi sembrano fornire risultati incoraggianti.

Vi sono dati a supporto dell'ipotesi che i generatori dei PEV abbiano dei buoni meccanismi di compenso, e, infatti, sono invariati durante episodi di ipoperfusione fintanto che la PaO₂ resta superiore a cinque Kpascal ma si attenuano rapidamente in corso di ipossia con PaO₂<3 Kpascal [59, 60].

Studi sul ruolo dei potenziali evocati multimodali

La maggior parte degli studi ha valutato il ruolo di PEV, PES e BAEP separatamente, altri studi hanno utilizzato invece più modalità.

Majnemer *et al.* [32] hanno documentato in 42 neonati studiati anche con BAEP (di cui 29 a termine) una buona correlazione dei PES con la prognosi neurologica, con sensibilità del 79% e specificità dell'88%, ma l'aggiunta dei BAEP non sembra migliorare il valore predittivo.

Scalais *et al.* [61] su 40 neonati a termine studiati con potenziali evocati multimodali confermano uno sviluppo neurologico normale a 24 mesi nel 100% dei casi con PES e PEV normali ed una migliore predittività dei potenziali evocati rispetto al punteggio clinico di Sarnat. Relativamente ai PES patologici, questo studio enfatizza l'utilità di graduare le alterazioni in quanto la predittività di alterazioni neurologiche al follow up è elevata nei PES di grado II e III (risposta poco riproducibile o assente). Gli autori sottolineano

l'importanza di ottenere tracciati privi di artefatti e di utilizzare una referenza biauricolare per distinguere le componenti pre e post-centrali. In tale studio viene anche confermata l'utilità di abbinare PEV ai PES per migliorare la predittività, invece i BAEP non sembrano aggiungere qualità al bilancio prognostico.

Conclusioni

Dalla presente rassegna della letteratura emerge che i potenziali evocati hanno un ruolo ben preciso nell'iter diagnostico e prognostico del neonato affetto da EII.

I BAEP, in associazione con il test delle otoemissioni acustiche, sono l'esame di scelta per l'individuazione precoce dell'ipoacusia neurosensoriale. E' preferibile eseguirli dopo il mese di età corretta per evitare i falsi positivi legati ad ipoacusia trasmissiva intercorrente o ad alterazioni transitorie delle componenti centrali, e prima del quarto mese per potere, in caso di positività, instaurare con tempestività (entro il sesto mese) gli interventi protesico-riabilitativi.

I PEV sono molto utili nella individuazione di alterazioni del sistema visivo a rischio di ipovisione nelle età successive: deficit visivi si osservano nel 100% dei bambini nati a termine o ex prematuri con PEV assenti alla nascita.

Nel neonato a termine l'esecuzione di PEV e PES dal nervo mediano alla fine della prima settimana di vita è in grado di predire se vi saranno sequele neurologiche a distanza, e tale informazione è particolarmente importante soprattutto nei quadri di encefalopatia moderata in cui la prognosi non è chiara in base a quadro clinico, metabolico, EEG e neuroradiologico.

Nel neonato pretermine il ruolo dei potenziali evocati nella prognosi dell'EII non è stato ancora del tutto delineato. Essi costituiscono nel neonato a rischio un valido supporto all'ecografia transfontanellare nelle fasi precoci del danno quando le alterazioni strutturali sono ancora in evoluzione, la normalità dei PES (in particolare da stimolo del nervo tibiale posteriore) associata alla normalizzazione dell'ecografia aumenta notevolmente il valore predittivo negativo nella leucomalacia periventricolare. Alterazioni dei PEV nelle fasi precoci dell'insulto hanno una prognosi a breve termine severa con elevato rischio di paralisi cerebrale (92%) e di decesso (89%) ma mancano dati sull'evoluzione a lungo termine.

I risultati dei potenziali evocati sono stati scarsamente correlati ed integrati con l'EEG, i parametri clinici, metabolici e le metodiche per immagini [62, 63]. Sarebbe invece importante approfondire questi aspetti perché ciò consentirebbe di definire il campo di applicazione delle diverse metodiche nei diversi quadri clinico-patologici ed ottimizzare l'approccio clinico.

Vi sono attualmente molte aspettative sulle possibilità di interventi terapeutici neuroprotettivi nelle fasi precoci dell'ipossia, ischemia e riperfusione ed è stato dimostrato che la finestra temporale utile per l'intervento sono le prime sei ore. Le metodiche neurofisiologiche, in particolare le tecniche di monitoraggio EEG continuo ed i potenziali evocati, essendo in grado di valutare precocemente la severità dell'insulto ipossico ischemico avranno in futuro un ruolo in questo importante settore [64-66].

Lavoro presentato su invito.

Accettato il 19 luglio 2001.

BIBLIOGRAFIA

1. Volpe JJ. Hypoxic-ischemic encephalopathy: neuropathology and pathogenesis. In: Volpe JJ (Ed.). *Neurology of the newborn*. Philadelphia:WB Saunders C;1995. p. 279-313.
2. Hall JG. On neuropathologic changes in the central Nervous system following neonatal asphyxia- with special reference to auditory system in man. *Acta Otolaryngol* 1964;188 (suppl 33):1-9.
3. Leech RW, Alvord EC. Anoxic-ischemic encephalopathy in the human neonatal period. *Arch Neurol* 1977; 34:109-13.
4. Galambos R, Despland PA. The auditory brainstem response (ABR) evaluates risk factors for hearing loss in the newborn. *Pediatr Res* 1980;14:159-63.
5. Duara S, Suter CM, Bessard KK, Gutberlet RL. Neonatal screening with auditory brainstem responses: results of follow-up audiometry and risk factor evaluation. *J Pediatr* 1986;108:276-81.
6. Kramer S J, Vertes DR, Condon M. Auditory brainstem responses and clinical follow-up of high-risk infants. *Pediatrics* 1989;83: 385-92.
7. Stapells DR, Kurtzberg. Evoked potential assessment of auditory system integrity in infants. *Clin Perinatol* 1991;18:497-518.
8. Salamy A, Eldredge L, Tooley WH. Neonatal status and hearing loss in high-risk infants. *J Pediatr* 114:847-52.
9. Stockard JE, Stockard JJ, Kleinberg F, Westmoreland BF. Prognostic value of brainstem auditory evoked potentials in neonates. *Arch Neurol* 1983;40:360-5.
10. Jiang ZD, Tierney TS. Long-term effect of perinatal and postnatal asphyxia on developing human auditory brainstem responses: brainstem impairment. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1996;34: 111-27.
11. Hecox KE, Cone B. Prognostic importance of brainstem auditory evoked responses after asphyxia. *Neurology* 1981;31:1429-33.
12. Kitamoto I, Kukita J, Kurokawa T, Chen YJ, Minami T, Ueda K. Transient neurologic abnormalities and BAEPs in high risk infants. *Pediatr Neurol* 1990;6:319-25.
13. Majnemer A, Rosenblatt B, Riley P. Prognostic significance of the auditory evoked response in high-risk neonates. *Dev Med Child Neurol* 1988;30:26-35.
14. Yasuhara A, Kinoshita Y, Hori A, Iwase S, Kobayashi Y. Auditory brainstem response in neonates with asphyxia and intracranial haemorrhage. *Eur J Pediatr* 1986;145:347-50.

15. Kileny P, Connelly C, Robertson C. auditory brainstem responses in perinatal asphyxia. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1980; 2:147-59.
16. Majnemer A, Rosenblatt B. Prediction of outcome a school entry in neonatal intensive care unit survivors, with use of clinical and electrophysiologic techniques. *J Pediatrics* 1995;127:823-30.
17. Majnemer A, Rosenblatt B. Prediction of outcome at school age in neonatal intensive care unit graduates using neonatal neurologic tools. *J Child Neurol* 2000;15(10):645-51.
18. Jang ZD. Maturation of peripheral and brainstem auditory function in the first year following perinatal asphyxia: a longitudinal study. *J Speech Language Hearing Res* 1998;41:83-93.
19. Jiang ZD, Brosi DM, Shao XM, Wilkinson AR. Maximum length sequence brainstem auditory evoked responses in term neonates who have perinatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res* 2000; 48:639-45.
20. Task force on newborn and infant hearing American Academy of Pediatrics. Newborn and infant hearing loss: detection and intervention. *Pediatrics* 1999;103:527-30.
21. Gafni M, Shomer H. Intermediate endocochlear potential levels induced by hypoxia. *Acta Otolaryngol* 1976;82:345-8.
22. Sohmer H, Freeman S, Gafni M, Goitein K. The depression of the auditory nerve-brainstem evoked response in hypoxaemia - mechanism and site of effect. *Electroencephalography Clin Neurophysiol* 1986;64:334-8.
23. Jiang ZD. Long-term effect of perinatal and postnatal asphyxia on developing human auditory brainstem responses: peripheral hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1995;33:225-38.
24. Stein L., Ozdamar O., Kraus N., Paton J. Follow-up of infants screened by auditory brainstem response in the neonatal intensive care unit. *J Pediatr* 1983;103:447-53.
25. Marsh RR, Handler SD. Hearing impairment in ventilator-dependent infants and children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1990; 20:213-7.
26. Rivkin MJ. Hypoxic-ischemic brain injury in the term born. *Clin Perinatol* 1997;24:607-25.
27. Bongers-Schokking CD, Colon EJ, Hoogland RA, van den Brande JL, de Groot KJ. The somatosensory evoked potentials of normal infants: influence of filter band-pass, arousal state and number of stimuli. *Brain Dev* 1989;11:33-9.
28. De Vries LS. Somatosensory evoked potentials in term neonates with postasphyxial encephalopathy. *Clin Perinatol* 1993;20(2):463-82.
29. Hrbek A, Karlberg P, Kjellmer I. Clinical application of evoked electroencephalographic responses in newborn infants I. Perinatal asphyxia. *Dev Med Child Neurol* 1977;19:34-44.
30. Lutschg J, Pfenninger J, Ludin HP, Vassella F. Brainstem auditory evoked potentials and early somatosensory evoked potentials in neurointensively treated comatose children. *Am J Dis Child* 1983;137:421-6.
31. Gorke W. Somatosensory evoked cortical potentials indicating impaired motor development in infancy. *Dev Med Child Neurol* 1986;28:633-41.
32. Majnemer A, Rosenblatt B, Riley PS *et al.* Prognostic significance of multimodality evoked response testing in high-risk newborns. *Pediatr Neurol* 1990;6:367-74.
33. Pierrat V, Eken P, De Vries LS, Duquennoy C., Rousseau S. Prognostic value of early somatosensory evoked potentials in neonates with cystic leukomalacia. *Dev Med Child Neurol* 1993;35:683-90.
34. Willis J, Duncan C, Bell R. Pappas F, Moniz M. Short latency somatosensory evoked potentials in perinatal asphyxia. *Pediatr Neurol* 1987;3:203-7.
35. De Vries LS, Pierrat V, Eken P, Minami T, Daniels H, Casaer P. Prognostic value of early somatosensory evoked potentials for adverse outcome in full-term infants with birth asphyxia. *Brain Dev* 1991;13:320-5.
36. Gibson NA, Graham M, Levene MI. Somatosensory evoked potentials and outcome in perinatal asphyxia. *Arch Dis Child* 1992; 67:393-8.
37. Taylor MJ, Murphy WJ, Whyte HE. Prognostic reliability of somatosensory and visual evoked potentials of asphyxiated term infants. *Dev Med Child Neurol* 1992;34:507-15.
38. Harbord MG, Weston PF. somatosensory evoked potentials predict neurologic outcome in full-term neonates with asphyxia. *J Paediatr Child Health* 1995;31(2):148-51.
39. Klimach VJ, Cooke RWI. Short-latency cortical somatosensory evoked responses of preterm infants with ultrasound abnormality of the brain. *Dev Med Child Neurol* 1988;30:222-6.
40. White CP, Cooke RWI. Somatosensory evoked potentials following posterior tibial nerve stimulation predict later motor outcome. *Dev Med Child Neurol* 1994;36:34-40.
41. Willis J, Duncan MC, Bell R *et al.* Somatosensory evoked potentials predict neuromotor outcome after periventricular haemorrhage. *Dev Med Child Neurol* 1989;31:435-9.
42. De Vries LS, Eken P, Pierrat W, Daniels H, Casaer P. Prediction of neurodevelopmental outcome in the preterm infant: short latency cortical somatosensory evoked potentials compared with cranial ultrasounds. *Arch Dis Child* 1992;67:1177-81.
43. Ekert PG, Taylor MJ, Keenan NK, Boulton J, Whyte HE. Early somatosensory evoked potentials in preterm infants: their prognostic utility. *Biol Neonate* 1997;71:83-91.
44. Pierrat V, Eken P, De Vries LS. The predictive value of cranial ultrasound and of somatosensory evoked potentials after nerve stimulation for adverse neurological outcome in preterm. *Dev Med Child Neurol* 1997;39:398-403.
45. Kurtzberg D. Event related potentials in the evaluation of high risk infants. *Ann NY Acad Sci* 1982;388:557-71.
46. McCulloch DL, Taylor M, Whyte H. Visual evoked potentials and visual prognosis following perinatal asphyxia. *Arch Ophthalmol* 1991;109:299-33.
47. Dubovitz LMS, De Vries L, Mushin J, Arden GB. Visual function in the newborn infant: is it cortically mediated? *Lancet* 1986; 17:1139-41.
48. Gambi D, Rossini PM, Albertini G, Sollazzo D, Torrioli MG, Polidori GC. Follow-up of visual evoked potentials in full-term and pre-term control newborns and in subjects who suffered from perinatal respiratory distress. *Electroencephal Clin Neurophysiol* 1980; 48:509-16.

49. Hakamada S, Watanabe K, Hara K *et al.* The evolution of visual and auditory evoked potentials in infants with perinatal disorder. *Brain Dev* 1981;3:339-44.
50. Häkkinen VK, Ignatius J, Koskinen M, Koivikko MJ, Ikonen RS, Janas M. Visual evoked potentials in high-risk infants. *Neuropediatrics* 1987;18:70-4.
51. Eken P, De Vries LS, Van Nieuwenhuizen O, Schalijs-Delfos E, Reits D, Spekrijse. Early predictors of cerebral visual impairment in infants with cystic leukomalacia. *Neuropediatrics* 1996;27:16-25.
52. Whyte H, Taylor MJ, Menzies R *et al.* Prognostic utility of visual evoked potentials in full term asphyxiated neonates. *Pediatr Neurol* 1986;2:220-3.
53. Muttitt SC, Taylor MJ, Kobayashi JS, MacMillan L, Whyte HE. Serial visual evoked potentials and outcome in term birth asphyxia. *Pediatric Neurol* 1990;7:86-90.
54. Whyte HE. Visual evoked potentials in neonates following asphyxia. *Clin Perinatol* 1993;20(2):451-61.
55. Placzek M, Mushin J, Dubowitz LMS. Maturation of the visual evoked response and its correlation with visual acuity in preterm infants. *Dev Med Child Neurol* 1985;27:448-54.
56. De Vries LS, Connell JA, Dubowitz LMS, Oozeer RC, Dubowitz V. Neurological, electrophysiological and MRI abnormalities in infants with extensive cystic leukomalacia. *Neuropediatrics* 1987;18:61-6.
57. Ekert PG, Keenan NK, Whyte HE, Boulton J, Taylor MJ. Visual evoked potentials for prediction of neurodevelopmental outcome in preterm infants. *Biol Neonate* 1997;71:148-55.
58. Shepherd AJ, Saunders KJ, McCulloch DL, Dutton GN. Prognostic value of flash visual evoked potentials in preterm infants. *Dev Med Child Neurol* 1999;41:9-15.
59. Pryds O, Greisein G, Trojaborg W. Visual evoked potentials in preterm infants during the first hours of life electroenceph. *Clin Neurophysiol* 1988;71:257-65.
60. Pryds O, Greisen G. Preservation of single flash visual evoked potentials at very low cerebral oxygen delivery in preterm infants. *Pediatr Neurol* 1990;6:151-8.
61. Scalais E, Adant AF, Nuttin C, Bachy A, Guérit JM. Multimodality evoked potentials as a prognostic tool in term asphyxiated newborns. *Electroencephal Clin Neurophysiol* 1998;108:199-207.
62. Shevell MI, Majnemer A, Miller ST. Neonatal neurologic prognosis: the asphyxiated term newborn. *Pediatr Neurol* 1999;21:776-84.
63. Majnemer A, Rosenblatt B. Evoked potentials as predictors of outcome in neonatal intensive care unit survivors: review of the literature. *Pediatric Neurol* 1996;14:189-95.
64. Groenendaal F, De Vries LS. Selection of babies for intervention after birth asphyxia. *Semin Neonatol* 2000;5:17-32.
65. Abdel-Rahman AM, Spitz M, Chang Y, Rosenberg AA. Effects of combined superoxide dismutase and catalase on somatosensory evoked potentials and neuropathologic changes in asphyxiated newborn lambs. *Biol Neonate* 2000;77:115-22.
66. Leven MI, Evans DJ, Mason S, Brown J. An international network for evaluating neuroprotective therapy after severe birth asphyxia. *Semin Perinatol* 1999;23:226-33.

Radicali liberi e danno cerebrale nel neonato con insulto ipossico-ischemico

Giuseppe BUONOCORE, Serafina PERRONE e Maria Carmela MURACA

*Dipartimento di Pediatria, Ostetricia e Medicina della Riproduzione,
Università degli Studi, Siena*

Riassunto. - I radicali liberi (RL), molecole instabili e altamente reattive per la presenza di elettroni spaiati sull'orbitale esterno, si formano normalmente in qualsiasi cellula vivente poiché sovrintendono alle reazioni di ossidoriduzione utili alla sua sopravvivenza. Quando prodotti in quantità eccessive diventano importanti mediatori di danno cellulare e tissutale. L'eccesso di produzione di RL è evenienza frequente nel neonato e può essere provocata in diverse condizioni metaboliche. Il sistema nervoso centrale del neonato è particolarmente a rischio di danno mediato dai RL per l'elevato contenuto nelle membrane neuronali di acidi grassi poliinsaturi, l'alto "uptake" di ossigeno e i relativamente bassi livelli di difese antiossidanti. Il metabolismo ossidativo mitocondriale e fosfolipidico, l'ossido nitrico, la flogosi, la disponibilità di ferro libero, l'attivazione di enzimi proteolitici sono potenziali sorgenti di RL durante un evento asfittico.

Parole chiave: ipossia-ischemia, danno cerebrale, radicali liberi, neonato.

Summary (*Free radicals and brain damage during hypoxia-ischaemia in newborns*). - Free radicals (FR) are highly reactive chemical molecules containing one or more unpaired electrons. Oxygen-derived free radicals, collectively termed reactive oxygen species (ROS), are normally produced in living organisms. When over produced, they are major mediators of cell and tissue injury. There is a critical balance between free radical generation and antioxidant defenses. Oxidative stress *in vivo* is a degenerative process due to the over production and propagation of FR reactions. FR reactions lead to oxidation of lipids, proteins, polysaccharides and to DNA damage. Newborns and particularly preterm infants are very susceptible to FR oxidative damage. In these subjects, there is evidence of an imbalance between antioxidant and oxidant-generating systems enhancing oxidant injury.

Key words: hypoxia-ischaemia, brain injury, free radicals, newborn.

Introduzione

Il danno cerebrale ipossico-ischemico è la principale causa di mortalità perinatale acuta e di morbidità neurologica dell'infanzia [1]. Le statistiche evidenziano in Europa un'incidenza di asfissia perinatale pari al 2-6% nuovi nati, di cui il 20-50% muore entro le prime settimane di vita [2-4]. Tra i sopravvissuti, più del 25% presenta sequele di ordine neuropsicologico in forma di ritardo mentale, paralisi cerebrale, anomalie del linguaggio, epilessia [5].

I notevoli progressi conseguiti nell'assistenza del neonato ad alto rischio hanno consentito una drastica riduzione della mortalità neonatale e del numero di handicap neurologici secondari a sofferenza perinatale. Ciò nonostante ancor oggi permangono evenienze patologiche pre e postnatali di difficile controllo, in quanto poco indagate. Tra gli aspetti di fisiopatologia perinatale ancora da chiarire vi sono tutte quelle condizioni in cui si può inaspettatamente verificare un danno da produzione di specie tossiche dell'ossigeno.

Biologia dello stress ossidativo

L'ossigeno, elemento fondamentale per la vita degli organismi eucarioti, è paradossalmente una sostanza tossica. La tossicità dell'ossigeno è principalmente legata alla possibilità di generare radicali liberi (RL): una serie di composti che contengono almeno un elettrone spaiato sull'orbitale esterno: O_2^- (anione superossido), HO^* (radicale idrossilico) e H_2O_2 (perossido d'idrogeno) [6-8]. La condizione di intrinseca instabilità rende ragione della fortissima reattività chimica posseduta da queste sostanze. Per raggiungere uno stato energetico più stabile, esse tendono a cedere il proprio elettrone o ad acquistarne uno dalla molecola con cui reagiscono la quale si ritroverà elettricamente instabile e nella necessità di cedere o assumere a sua volta un elettrone. Avvengono così una serie di reazioni autopropagantesi che portano alla formazione ulteriore di metaboliti tossici e a profonde modificazioni del substrato di partenza [9]. Le reazioni terminano allorché i RL incontrano una molecola simile o una sostanza "scavenger" oppure un sistema enzimatico in grado di metabolizzarle.

Numerosi studi sperimentali e clinici hanno ampiamente dimostrato come l'azione tossica dell'ossigeno e gli effetti dannosi dei RL svolgano un ruolo di primo piano nella patogenesi di molte malattie neonatali tra le quali la retinopatia della prematurità, la displasia broncopulmonare, l'enterocolite necrotizzante, l'insufficienza renale, la persistenza del dotto arterioso di Botallo, l'emorragia intraventricolare, la leucomalacia periventricolare [10-12]. E' verosimile che tali patologie non siano entità differenti ma aspetti diversi di un'unica, più ampia condizione definita come "malattia da radicali liberi nel neonato" [13]. I primi bersagli dei radicali liberi sono i fosfolipidi delle membrane biologiche che vanno incontro alla formazione di ulteriori radicali: lipoperossi (LOO^{*}), lipidi idroperossi (LOOH), lipidi alcossi (LO^{*}) e prodotti di frammentazione come la malondialdeide (MDA), alcani, ecc. Tutte queste sostanze possono esercitare la loro azione lesiva sul DNA e sulle strutture cellulari, mitocondriali e lisosomiali, con fuoriuscita di enzimi proteolitici, autodigestione della cellula, innesco dei processi di morte cellulare programmata.

Le specie reattive dell'ossigeno si formano normalmente in qualsiasi cellula vivente poiché sovrintendono a tutte le reazioni di ossidoriduzione utili alla sua sopravvivenza. Gli effetti biologici di modeste quantità di radicali dell'O₂, hanno talora estrema rilevanza, come la funzione *killling* del fagocita e la modulazione delle sostanze vasoattive rilasciate dall'endotelio, fondamentale per il mantenimento del circolo [14].

Quando *in vivo* si verifica una produzione continua di RL, tale da soverchiare la capacità antiossidante dell'organismo, si viene a creare una condizione di stress ossidativo, in cui non sono più garantiti il mantenimento del patrimonio antiossidante e il contenimento della produzione di RL [7].

Normalmente lo stress ossidativo è modesto e le difese della cellula possono aumentare tramite un complesso meccanismo che può coinvolgere l'espressione genica delle attività cosiddette *scavengers* [15]. Gli *scavengers* sono molecole che possono eliminare i RL e preservare i target molecolari cellulari potendo accettare e cedere elettroni mediante interconversione da uno stato ossidato ad uno ridotto. L' α -tocoferolo, la bilirubina, la cerulo-plasmina, l'acido urico, la transferrina, la vitamina C, i gruppi sulfidrilici del glutatone sono esempi di *scavengers* naturali. Un altro meccanismo di cui dispone l'organismo umano per la difesa del danno da RL è costituito dalle attività enzimatiche antiossidanti superossido-dismutasi, glutatone perossidasi, glutatone reduttasi e catalasi [16].

Patologia da radicali liberi

Il neonato è particolarmente predisposto al rischio di danno ossidativo, in conseguenza sia della maggiore produzione postnatale di radicali dell'O₂ (Fig. 1), sia

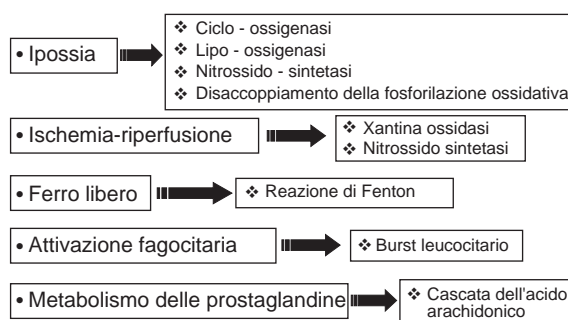


Fig. 1. - Meccanismi di produzione dei radicali liberi.

dell'incapacità dei sistemi di protezione di limitare le reazioni da loro indotte (Tab. 1). La nascita, comportando il passaggio da uno stato di ossigenazione fetale (PaO₂ 30-40 torr) ad una di tipo adulto (PaO₂ 60-70 torr), favorisce la formazione di RL in quantità tali da sovrastare le capacità di detossificazione ancora immature. La ipovalidità dei sistemi antiossidanti rende ancora più vulnerabile il neonato pretermine per l'accentuata povertà di sistemi di protezione enzimatica che giungono fisiologicamente a maturazione con il procedere della gestazione [17]. La maggiore disponibilità di substrati perossidabili nel SNC (acidi grassi insaturi) espone in egual misura i neonati a termine al danno da RL [18]. Il cervello del feto a termine è altresì a rischio perché possiede oligodendrociti con sistemi di valida captazione del ferro e recettori NMDA sufficientemente maturi per agevolare la progressione della catena di eventi metabolici che portano alla generazione e al danno da RL [19, 20].

La responsabilità della tossicità dei RL nel neonato coinvolge meccanismi complessi caratterizzati da una serie di reazioni, che, una volta innescate, si propagano a catena, potendosi amplificare attraverso circoli viziosi difficilmente arrestabili [21, 22]. E' pertanto estremamente difficile predire l'entità clinica e la presenza stessa del danno, la latenza rispetto al momento in cui l'insulto si è realizzato, la suscettibilità individuale del neonato, i tempi e i modi per eventuali interventi terapeutici.

Radicali liberi e meccanismi di danno cerebrale

L'encefalopatia ipossico-ischemica consegue ad un insulto asfittico che nella quasi totalità dei casi è subordinato alla interruzione del flusso utero-placentare e dello scambio O₂/CO₂. Il momento eziologico più spesso in causa è rappresentato dalla patologia del travaglio di parto ma l'evento precipitante spesso si è già realizzato in utero, prima ancora che il parto sia iniziato [23-25]. Gli eventi fondamentali determinanti il danno cerebrale da asfissia sono l'ipossiemia e l'ischemia; esse sono di regola associate, essendo l'una causa dell'altra, e sono in grado di innescare una catena di eventi di ordine me-

Tabella 1. - Difese antiossidanti nel neonato

↓ GSH-PX	↓ α-Proteinasi
↓ SOD	↓ Vit. E
↓ β-Carotene	↓ Selenio
↓ Riboflavina	↓ Rame
↓ Transferrina	↓ Zinco
↓ Ceruloplasmina	↓ Altri fattori plasmatici

GSH-PX: glutatione perossidasi; SOD: superossido dismutasi;
↓ : riduzione rispetto all'età successiva.

tabolico che costituiscono la via finale comune all'insulto ipossico-ischemico qualunque sia stato il fattore precipitante o determinante. La cronobiologia della sindrome ipossico-ischemica è bifasica contemplando due momenti fisiopatologicamente importanti [26]:

- insulto neuronale primario, determinato dal deficit di ossigeno e substrati energetici;
- insulto neuronale secondario, caratteristico della fase di ri-perfusione cerebrale.

E' recente l'acquisizione che la stessa ipossia, indipendentemente dalla fase di ri-perfusione, sia responsabile della sovrapproduzione di RL. Nostri studi hanno dimostrato come nel neonato la formazione di RL comporti un danno ossidativo alle lipoproteine plasmatiche in corso di ipossia [27, 28].

I meccanismi patogenetici del danno molecolare, cellulare e tissutale che consegue ad un insulto ipossico, coinvolgono una serie di eventi a cascata. Nelle fasi iniziali dell'ipossia il metabolismo anaerobio determina la progressiva deplezione delle riserve dei fosfati ad alta energia generando notevoli quantità di ADP, xantina, ipoxantina, NADH, FADH, acido lattico e ioni H^+ [29, 30]. Alla riduzione delle riserve energetiche intracellulari segue:

- diminuzione dell'attività enzimatica delle pompe di membrana ATP-asi dipendenti;
- riduzione del potenziale di membrana;
- aumento del flusso intracellulare di Na^{++}/K^+ , Cl^- e Ca^{2+} ;
- produzione di radicali liberi, danno perossidativo proteico e lipidico;
- edema citotossico [31-33].

L'aumento delle concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} fa sì che si attivino numerosi enzimi calcio-dipendenti, quali fosfolipasi, endonucleasi, proteasi. L'attivazione delle fosfolipasi A_2 e C rilasciano acido arachidonico dal bilayer lipidico con contemporanea produzione di RL [34]. La fosfolipasi C catalizza inoltre la reazione che porta alla formazione di inositolo 3-fosfato, un secondo messaggero che induce il rilascio di Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico [35]. Il Ca^{2+} può attivare anche la nitrossido sintetasi che porta alla formazione di ossido nitrico e radicale idrossile [36]. Il Ca^{2+} , in corso di ipossia, entra nella cellula attraverso diversi meccanismi:

- attivazione di canali voltaggio dipendenti, e agonista-dipendenti quali i recettori per amino-idrossilmetil-isossazolo propionato (AMPA), kainato (KA), e N-metil D aspartato (NMDA);

- rilascio da parte dei mitocondri e del reticolo endoplasmatico [22, 37]. Il progressivo aumento delle concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} ne amplifica gli effetti devastanti determinando un circolo vizioso che esita inevitabilmente nei meccanismi di apoptosi e necrosi neuronale.

Nei neuroni l'afflusso unidirezionale di ioni interferisce con i sistemi di rilascio dei neuromediatrici a livello dei sinaptosomi corticali, e favorisce, in ultima analisi, l'accumulo extracitosolico del glutammato [38]. Il glutammato, interagendo con i recettori NMDA, contribuisce all'ulteriore corrente intracellulare di Ca^{2+} .

L'eccesso di glutammato può, nelle cellule gliali ancora funzionanti, interscambiarsi con la cisteina del pool intracellulare, depauperando la riserva di antiossidanti quali il glutatione, di cui la cisteina è componente essenziale [26].

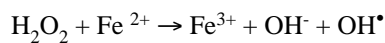
Il danno perossidativo endoteliale ha molteplici effetti: compromissione dell'autoregolazione del flusso cerebrale, aumento dell'espressione di molecole d'adesione per i PMN, loro marginazione, accumulo e attivazione intratissutale [39, 40]. Il *burst* leucocitario, che in condizioni di infezione si rivela meccanismo favorevole accelerando la *clearance* dei patogeni, in corso di insulto ipossico-ischemico diventa sorgente additiva di RL contribuendo all'intensificazione del danno cerebrale.

D'altra parte è noto che le infezioni neonatali precoci (associate a corioamniositi) sono condizioni favorevoli alla genesi dell'encefalopatia ipossico-ischemica, sia attraverso meccanismi diretti di processi flogistici vascolari o polmonari, sia attraverso un'incrementata produzione di RL da parte dei polimorfonucleati attivati dal gradiente locale di citochine [41-43]. Numerose cellule del SNC, tra cui microglia, astrociti e neuroni, sintetizzano e secernono in seguito a stimoli specifici e aspecifici (ad esempio in caso di danno tissutale) IL-1 β e TNF α , citochine multifunzionali, direttamente implicate nello sviluppo del sistema nervoso centrale e nella patogenesi del danno cerebrale ipossico-ischemico [44, 45].

Ruolo del ferro libero

Elemento 26 nella tabella periodica, il ferro è indispensabile per la crescita e il benessere di tutti gli organismi viventi [46]. E' il metallo di transizione presente in quantità maggiore nel cervello ed è essenziale per il normale sviluppo neurologico del neonato [47]. L'essenzialità del ferro dipende dal suo coinvolgimento in un gran numero di processi metabolici quali reazioni di

sintesi, detossificazione difese antibatteriche, trasporto e utilizzazione dell'ossigeno [48, 49]. E' stato infatti dimostrato che la carenza di ferro durante i primi stadi di sviluppo del sistema nervoso centrale si associa ad alterazioni comportamentali, quali deficit della concentrazione e della memorizzazione mediati dall'ippocampo [50]. La carenza di ferro in altri distretti influenza negativamente la produzione di energia cellulare con compromissione della funzionalità dell'organo interessato [51]. Il ferro, però, si comporta come una lama a doppio taglio, potendo risultare altamente tossico quando presente in elevate quantità e non legato alle proteine [52]. In virtù della sua capacità di passare rapidamente dallo stato ferroso allo stato ferrico (da Fe^{2+} a Fe^{3+}), a seconda delle molecole con cui interagisce, il ferro diventa alternativamente ossidante o riducente [53]. La sua azione tossica si esplica mediante la reazione di Fenton, un processo di ossido riduzione in cui il ferro ferroso reagisce con il perossido di idrogeno generando radicale ossidrilico, il più potente agente ossidante di un sistema biologico [54]:



Normalmente il ferro è sequestrato da proteine di trasporto, quali la transferrina (Tf) e la lattoferrina, o immagazzinato in proteine di deposito quali la ferritina e l'emosiderina [55]. La ceruloplasmina agisce in sinergia con le proteine suddette, catalizzando l'ossidazione dello ione ferroso al meno reattivo ione ferrico, che si lega alla Tf [56]. E' noto che per essere *redox-cycling* attivo il Fe deve essere rilasciato dalle proteine di deposito e ridotto a Fe^{2+} . Condizioni come acidosi, ischemia, sovraccarico di ferro, attivazione dell'enzima emossigenasi, sono in grado di accelerare i processi di compartimentalizzazione del Fe [57-59]. Dal momento che il ferro non può esistere nel plasma come ione, il termine ferro libero è stato coniato ad indicare il ferro a basso peso molecolare, privo di alta affinità di legame con la transferrina, e debolmente legato a citrati, lattati, fosfati, albumina o ad altre proteine plasmatiche [60, 61].

Il ferro può essere rilasciato all'interno dell'eritrocita dall'emoglobina come effetto del danno ossidativo e può innescare la perossidazione lipidica anche in assenza di HO^\bullet , reagendo direttamente con gli acidi grassi della membrana cellulare [57, 62, 63]. L'eritrocita può essere coinvolto direttamente nel danno cellulare mediato da radicali liberi sia come bersaglio che come sorgente dei RL. La predisposizione all'emolisi ossidativa dell'eritrocita del neonato è conosciuta da molto tempo essendo stata osservata da quasi mezzo secolo la bassa soglia del globulo rosso del neonato alla formazione di corpi di Heinz in incubazioni con farmaci e sostanze ossidanti. Basso contenuto di vitamina E, alta percentuale di acidi grassi insaturi di membrana e basse attivi-

tà enzimatiche antiossidanti avevano fatto ritenere la membrana del GR peculiarmente vulnerabile alla perossidazione lipidica mentre le pressioni parziali di ossigeno, più elevate nel neonato rispetto al feto, e la presenza di molecole di provenienza varia (tossine batteriche, farmaci) erano state considerate fattori scatenanti [64]. Indagini successive hanno dimostrato che la patogenesi dello stress ossidativo eritrocitario coinvolge la molecola dell'emoglobina (ed in particolare l'emoglobina fetale che più facilmente rilascia superossido) e le proteine di membrana prima ancora della componente lipidica [65, 66].

Agenti ossidanti provocano una rapida deplezione delle riserve di glutatione ed un aumento delle concentrazioni citosoliche di ferro libero [62]. Recenti indagini dimostrano che lo stress ossidativo eritrocitario è ancora più evidente in corso di ipossia analogamente a quanto accade durante l'incubazione di eritrociti *in vitro* con sostanze ossidanti e quanto accade *in vivo* nell'eritrocita del neonato gravemente asfittico [67, 68]. Precedenti nostri studi hanno segnalato che lo stress ossidativo alla nascita induce rilascio di ferro libero all'interno dell'eritrocita e aumentata produzione di RL nel plasma [27]. Gli idroperossidi totali e i prodotti avanzati di ossidazione proteica sono più elevati nel plasma dei neonati ipossici rispetto ai neonati sani [28]. Tanto maggiore è l'ipossia, valutabile in termini di diminuzione del pH ed aumento dell'ipoxantina, tanto maggiori sono i livelli di idroperossidi totali riscontrabili nel plasma e le concentrazioni intraeritrocitarie di ferro libero.

L'eritrocita è uno *scavenger* di RL e lo stress ossidativo può conseguire al metabolismo intraeritrocitario di xenobiotici, secondo il modello classico della fenilidralazina, oppure può avere origine da RL extraeritrocitari di varia provenienza (ischemia-riperfusion, *burst* leucocitario, metabolismo ossidativo fosfolipidico e mitocondriale) [69, 70]. E' probabile, per quanto non ancora dimostrato, che il ferro libero intraeritrocitario sia responsabile della ridotta emivita del globulo rosso e che l'eritrocita possa essere insieme bersaglio dei RL e possibile sorgente degli stessi in quanto fonte principale di ferro libero nell'organismo [71]. La concentrazione intraeritrocitaria di ferro libero sembra pertanto rappresentare un *marker* concreto dello stress ossidativo dell'eritrocita ed un indicatore del rischio di danno ossidativo in altri tessuti.

Il neonato è estremamente suscettibile al danno ossidativo indotto dal ferro libero per la fisiologica carenza dei sistemi antiossidanti alla nascita, per la diminuzione dei livelli di transferrina ormai già saturata dal ferro nel plasma e per le basse concentrazioni di ceruloplasmina nel liquido cerebrospinale [72, 73].

Nel neonato, in corso di asfissia, all'aumento del ferro libero plasmatico ed intraeritrocitario può seguire il rilascio di ferro libero nel parenchima cerebrale a causa

del danneggiamento della barriera emato-encefalica [74]. Addizionali sorgenti di Fe sono l'aumentato catabolismo dell'eme e la disfunzione del normale trasporto assonale di ferro cerebrale [75, 76].

Due ulteriori sorgenti di radicali dell' O_2 in corso di ipossia sono il processo di fosforilazione ossidativa mitocondriale e l'attivazione dell'enzima nitrossido sintetasi (NOS).

Le specie reattive dell' O_2 sono continuamente generate all'interno dei mitocondri [77]. A livello della catena respiratoria, l'ossigeno viene ridotto ad H_2O dall'enzima citocromo ossidasi attraverso l'intermedia produzione di anione superossido [78]. L' $O_2^{\cdot-}$ si forma nel corso delle operazioni del complesso I e III della catena respiratoria mediante la conversione del coenzima Q o ubiquinone in semiquinone in seguito alla perdita di un elettrone [79, 80]. I mitocondri sono dotati di un efficiente sistema antiossidante composto da superossido dismutasi, glutatione perossidasi, glutatione reduttasi, catalasi, NAD(P) transidrogenasi, vitamina A e C, e tiolo perossidasi SP-22 [81-83]. Pertanto il radicale superossido viene rapidamente dismutato ad acqua ossigenata [84]. In condizioni di sovrapproduzione o di deplezione del sistema antiossidante, l' H_2O_2 non viene eliminata creando una situazione di stress mitocondriale in cui l' H_2O_2 accumulata reagisce con il Fe e produce il metabolita idrossiradicale altamente reattivo [85].

Danno mitocondriale

Diverse condizioni fisiologiche e patologiche possono alterare la velocità basale di formazione di anione superossido all'interno del mitocondrio. Una di queste è l'accumulo di calcio che determina il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa con conseguente produzione mitocondriale di radicali [86]. Nelle fasi precoci dell'ipossia-ischemia il normale *uptake* del Ca nella membrana interna del mitocondrio, peraltro necessario per la regolazione degli enzimi piruvato deidrogenasi e α -ossiglutarato deidrogenasi, aumenta favorendo alterazioni della struttura e del potenziale di membrana, inibizione della sintesi di ATP, disorganizzazione della catena respiratoria e generazione di radicali [87]. In condizioni di diminuita disponibilità di ossigeno al sito di riduzione energetica ove è posta la citocromo ossidasi, aumentano le forme ridotte degli enzimi componenti la catena di trasporto degli elettroni [88]. Uno di questi, la forma ridotta dell'ubiquinone, va incontro ad auto-ossidazione producendo RL. I mitocondri sono particolarmente sensibili al danno ipossico e svolgono un ruolo centrale nei processi di apoptosi e necrosi [89]. Una loro disfunzione porta al rilascio intracellulare di notevoli quantità di Ca e di specie reattive dell'ossigeno, responsabili a loro volta di ulteriore danno cellulare [87].

Ruolo dell'ossido nitrico

L'ossido nitrico (NO) è un radicale libero sintetizzato dall'enzima nitrossido sintetasi (NOS) nelle cellule endoteliali e neuronali in risposta all'incremento delle concentrazioni intracellulari di Ca^{++} [90]. La NOS forma NO, citrullina ed H_2O_2 da arginina, NADPH e ossigeno [91]. Il NO reagisce con il radicale superossido e genera perossinitrite, che spontaneamente si decompone a formare metaboliti altamente reattivi, quali il radicale idrossile, il diossido d'azoto e il suo ione (NO_2^+) [92]. Attualmente si conoscono tre isoforme di NOS: endoteliale (eNOS, Ca^{2+} -dipendente, o NOS3), neuronale-gliale (nNOS o NOS1) e inducibile (iNOS, Ca^{2+} -indipendente o NOS2) [93, 94]. L'enzima è ubiquitario. L'attività di tutte e tre le forme aumenta durante l'ischemia: la nNOS e l'eNOS entro pochi minuti e la iNOS dopo diverse ore [95]. Dal momento che in corso di ischemia non c'è disponibilità di ossigeno, il NO non può essere sintetizzato in questa fase nella quale però a livello mitocondriale si generano una notevole quantità di ioni superossido. La riperfusione consente la produzione di NO il quale, reagendo con gli ioni superossidi, conduce alla formazione del perossinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), molecola altamente instabile che spontaneamente si scinde nei radicali perossinitrile (NO_2^{\cdot}) e idrossile (OH^{\cdot}) [96-98]. Il NO_2^{\cdot} interagisce con molte molecole biologiche provocando perossidazione lipidica e nitrosilazione di tirosina e cisteina su enzimi intracellulari [92, 99]. Un altro metabolita del NO, potenzialmente nocivo, è il nitrite cloruro (NO_2Cl), che si forma dalla reazione del nitrite, un prodotto terminale del metabolismo dell'ossido nitrico, con l'acido ipocloroso ($HOCl$), prodotto dall'enzima mieloperossidasi dei neutrofili attivati [100]. Studi sperimentali hanno dimostrato che l'iniziale effetto vasodilatatorio del NO con l'aumento della perfusione cerebrale che segue all'attivazione della eNOS è neuroprotettivo almeno durante le prime due ore dell'insulto ischemico [101]. Tuttavia, gli effetti globali e definitivi dell'attivazione delle tre forme di NOS in corso di ischemia rimangono deleteri per la cellula [102].

Il danno cellulare

Durante la fase di ipossia-ischemia il deficit di O_2 e di ATP innesca gli eventi metabolici responsabili della produzione di RL che procedono poi autonomamente mediante reazioni di amplificazione. Nella fase di riperfusione l'endotelio danneggiato non garantisce l'autoregolazione del flusso e i sistemi enzimatici cellulari non riescono a produrre energia perché ulteriormente compromessi dalla massiccia produzione

di RL amplificata dalla maggiore disponibilità di O₂. Nelle ore che seguono all'evento ipossico-ischemico l'attivazione dei programmi di apoptosi cellulare può comportare la perdita degli elementi cellulari apparentemente indenni [103].

I fattori che inducono apoptosi o morte cellulare programmata dopo la sequenza ipossia-ischemia-riperfusion sono noti solo in parte. Un ruolo di primo piano è svolto dalle caspasi [104]. Membri di una famiglia di cisteina-proteasi, le caspasi sono sintetizzate e secrete come precursori inattivi [105]. L'evento ipossico-ischemico e il conseguente danno mitocondriale comportano la loro attivazione mediante una sequenza di eventi a cascata [106]. E' possibile classificare le caspasi in tre gruppi funzionali principali: caspasi di regolazione (caspasi 2-8-9), caspasi effettrici (caspasi 3-6-7) caspasi pro-infiammatorie (caspasi -1 o *interleukin-1 β -converting enzyme*).

Le caspasi 3 e 9 sono direttamente coinvolte nei meccanismi di apoptosi. L'aumento della permeabilità delle membrane mitocondriali che consegue al danno ossidativo favorisce l'inibizione del sistema antiapoptotico Bcl-2 (proteina associata alla membrana esterna) e la traslocazione citosolica di alcuni sistemi proteici normalmente segregati nell'ambiente mitocondriale: la proteina Bax, il citocromo c, il fattore Apaf-1 e l'*apoptosis inducing factor* (AIF) [86, 103, 107]. Nel citoplasma la formazione del complesso trimolecolare citocromo c-Apaf-1-caspasi 9 è l'elemento critico per la conversione della caspasi 3 in forma attiva. Quest'ultima riconosce almeno tre substrati intracellulari: la ADP-ribosio-polimerasi (PARP), l'*inhibitor of caspase-activated Dnase* (ICAD/DFP) e la fodrina [108-111]. Il ruolo della PARP nel processo di apoptosi è controverso [112, 113]. L'enzima è deputato alla riparazione del DNA danneggiato, ma la reazione avviene a spese delle già scarse riserve di NAD⁺ e di ATP in corso di ischemia [97]. La PARP è attivata dall'interazione dei RL con i gruppi elettrofili della catena del DNA. La caspasi ne determina il clivaggio e l'inattivazione. L'ICAD è un enzima responsabile dei fenomeni di frammentazione del DNA nucleosomale e di condensazione della cromatina caratteristici del processo di apoptosi [110].

La fodrina è un componente chiave del citoscheletro, ovvero una proteina spectrina-simile non eritrocitaria che lega l'actina cellulare [111]. Il processo di apoptosi ha la caratteristica di essere energeticamente dispendioso perché richiede una vivace neosintesi proteica e la caspasi 3 è un sistema prezioso per portare a termine l'intero processo. Essa infatti proteolizza i propri substrati determinando il blocco della PARP al fine di preservare le molecole di ATP richieste dal processo di apoptosi, il danneggiamento del citoscheletro tramite la degradazione della fodrina e la frammentazione del DNA che andrà irrimediabilmente perduto.

Conclusioni

Le relazioni che intercorrono tra produzione di FR e danno cerebrale nel periodo perinatale sono molto complesse. L'origine dei FR è varia e sembra dipendere sia da alterazioni del metabolismo purinico, fosfolipidico, mitocondriale, sia dalla reazione di Fenton e dall'attivazione fagocitaria in corso di ipossia e/o di ischemia-riperfusion. Altre vie importanti che possono condizionare il rilascio di FR comprendono la degradazione di alcuni enzimi proteici o l'attivazione di altri quali la xantina ossidasi, la nitrossido sintetasi e le prostaciclina-sintetasi. Ciascuna delle molecole reattive prodotte da questi differenti meccanismi contribuisce in modo peculiare alla patogenesi del danno cerebrale perinatale, ma ciascun meccanismo è solo uno dei fattori coinvolti. La molteplicità dei processi implicati nella cascata ossidativa suggerisce che solo terapie combinate che agiscano in sinergia contro bersagli multipli possono costituire nuove strategie per la prevenzione del danno cerebrale nel neonato clinicamente compromesso.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 19 luglio 2001.

BIBLIOGRAFIA

1. Vannucci RC. Hypoxia-ischemia: clinical aspects. In: Fanaroff AA, Martin RJ (Ed.). *Neonatal-perinatal medicine IV*. Philadelphia: Mosby-Yearbook, Inc. 1997. p. 877-91.
2. Mulligan JC, Painter MJ, O'Donoghue PA, MacDonald HM, Allen AC, Taylor PM. Neonatal asphyxia. II. Neonatal mortality and long-term sequelae. *J Pediatr* 1980;96:903-7.
3. World Health Organization. *Child health and development: health of the newborn*. Geneva: World Health Organization; 1991.
4. Levene ML, Kornberg J, Williams THC. The incidence and severity of post-asphyxial encephalopathy in full-term infants. *Early Hum Dev* 1985;11:21-6.
5. Volpe JJ. Brain injury in the premature infant. Neuropathology, clinical aspects, pathogenesis and prevention. *Clin Perinatol* 1997;24:567-87.
6. Halliwell B: Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991;91(suppl 3C):14-22.
7. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994;344:721-4.
8. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995;41:1819-28.
9. Del Maestro R. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand* 1992;492:153-68.
10. Mark JL. Oxygen free radicals linked to many diseases. *Science* 1987;235:529-31.
11. Warner BB, Wispe JR. Free radical-mediated diseases in pediatrics. *Semin Perinatol* 1992;16(1):47-57.

12. Saugstad OD. Mechanisms of tissue injury by oxygen radicals: Implications for neonatal disease. *Acta Paediatr* 1996;85:1-4.
13. Saugstad OD. Oxygen toxicity in the neonatal period. *Acta Paediatr Scand* 1990;79:881-92.
14. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119:598-620.
15. Wiese AG, Pacifici RE, Davies KJA. Transient adaptation to oxidative stress in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 1995; 318:231-40.
16. Jacob RA. The integrated antioxidant system. *Nutr Res* 1995; 15:755-66.
17. Frank L, Sosenko IRS. Development of lung antioxidant enzyme system in late gestation: possible implications for the prematurely born infant. *J Pediatr* 1987;110:9-14.
18. Torbati D, Wafapoor H, Peyman GA. Hyperbaric oxygen tolerance in newborn mammals-hypothesis on mechanism and outcome. *Free Radic Biol Med* 1993;14:695-703.
19. Ozawa H, Nishida A, Mito T, Takashima S. Development of ferritin-positive cells in cerebrum of human brain. *Pediatr Neurol* 1994;10:44-8.
20. Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. NMDA receptor modification in the fetal guinea pig brain during hypoxia. *Neurochem Res* 1992;17:1211-6.
21. Inder TE, Volpe JJ. Mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol* 2000;5:3-16.
22. Delivoria-Papadopoulos M, Mishra OP. Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. *J Pediatr* 1998;132:S30-4.
23. Bejar R, Wozniak P, Allard M, Benirschke K, Vaucher Y, Coen R *et al*. Antenatal origin of neurologic damage in newborn infant I. Preterm infant. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:357-63.
24. Grant A, O'Brien N, Joy M, Hennessy E, Macdonald D. Cerebral palsy among children born during the Dublin randomised trial of intrapartum monitoring. *Lancet* 1989;2:1233-6.
25. Buonocore G, Perrone S, Gioia D, Gatti MG, Massafra C, Agosta R *et al*. The nucleated red blood cell count at birth as index of perinatal brain damage. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:1500-5.
26. Palmer C. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Clin Perinat* 1995; 22:481-517.
27. Buonocore G, Zani S, Perrone S, Caciotti B, Bracci B. Intraerythrocyte nonprotein-bound iron and plasma malondialdehyde in the hypoxic newborn. *Free Rad Biol Med* 1998;25:766-70.
28. Buonocore G, Perrone S, Longini M, Terzuoli L, Bracci R. Total hydroperoxide and advanced oxidation protein products in preterm hypoxic babies. *Pediatr Res* 2000;47:221-4.
29. Maulik D, Numagami Y, Ohnishi ST, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Direct detection of oxygen free radical generation during in utero hypoxia in the fetal guinea pig brain. *Brain Res* 1998;798:166-72.
30. Hagberg H, Andersson P, Lacarewicz J, Butcher S, Sandberg M. Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia. *J Neurochem* 1987;49:227-31.
31. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985;312:159-63.
32. Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Lipid peroxidation in developing fetal guinea pig brain during normoxia and hypoxia. *Dev Brain Res* 1989;45:129-35.
33. Buonocore G, Perrone S. Free radicals and brain damage. *Biol Neonate* 2001;79:180-6.
34. Wolfe LS. Eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes and other derivatives of carbon-20 unsaturated fatty acid. *J Neurochem* 1982;38:1-14.
35. Huang H-M, Gibson GE. Phosphatidylinositol metabolism during *in vitro* hypoxia. *J Neurochem* 1989;52:830-5.
36. De Courten-Myers GM, Folgeson HM, Kleinholz M, Myers RE. Hypoxic brain and heart injury thresholds in piglets. *Biomed Biochem* 1989;48:S143-8.
37. Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1989;29:365-402.
38. Radzan B, Marro PJ, Tammela O, Goel R, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Selective sensitivity of synaptosomal membrane function to cerebral cortical hypoxia in newborn piglets. *Brain Res* 1994;600:308-14.
39. Haught WH, Mansour M, Rothlein R, Kishimoto TK, Mainolfi EA, Hendricks JB *et al*. Alterations in circulating intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin: further evidence for chronic inflammation in ischemic heart disease. *Am Heart J* 1996;132:1-8.
40. Crockett-Torabi E, Sulenbarger B, Smith CW, Fantone JC. Activation of human neutrophils through L-selectin and Mac-1 molecules. *J Immunol* 1995;154:2291-302.
41. Toti P, De Felice C. Chorioamnionitis and fetal/neonatal brain injury. *Biol Neonate* 2001;79:180-6.
42. Yoon BH, Kim CJ, Romero R, Jun JK, Park KH, Choi ST *et al*. Experimentally induced intrauterine infection causes fetal brain white matter lesions in rabbit. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177: 797-802.
43. Rothwell NJ, Hopkins SJ. Cytokines and the nervous system. II. Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci* 1995; 18:130-6.
44. Yoon BH, Romero R, Kim CJ, Koo JN, Choe G, Syn HC *et al*. High expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177: 406-11.
45. Baud O, Ville Y, Zupan V, Boithias C, Lacaze-Masmonteil T, Gabilan JC *et al*. Are neonatal brain lesions due to intrauterine infarction related to mode of delivery? *Br J Obstet Gynaecol* 1998; 105:121-4.
46. Crichton RR, Ward RJ. Iron species in iron homeostasis and toxicity. *Analyst* 1995;120:693-7.

47. Ponka P, Beaumont C, Richardson DR. Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol* 1998;35:35-54.
48. Youdim MB, Ben-Shachar D, Riederer P. Iron in brain function and dysfunction with emphasis on Parkinson's disease. *Eur Neurol* 1991;31:34-40.
49. Touati D. Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys* 2000;1:1-6.
50. Felt BT, Lozoff B. Brain iron and behavior of rats are not normalized by treatment of iron deficiency anemia during early development. *J Nutr* 1996;126:693-701.
51. Rao R, de Ungria M, Sullivan D, Wu P, Wobken JD, Nelson CA *et al*. Perinatal brain iron deficiency increases the vulnerability of rat hippocampus to hypoxic ischemic insult *J Nutr* 1999;129:199-200.
52. Gutteridge JMC, Quinlan GJ. Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins. *Biochim Biophys Acta* 1993;1156:144-50.
53. Crichton RR, Ward RJ. Iron metabolism-new perspectives in view. *Biochemistry* 1992;31:11255-64.
54. Berger HM, Mumby S, Gutteridge JMC. Ferrous ions detected in iron-overloaded cord blood plasma from preterm and term babies: implications for oxidative stress. *Free Radical Res* 1995;22:555-9.
55. O'Connell M, Halliwell B, Moorhouse CP, Aruoma OI, Baum H, Peters TJ. Formation of hydroxyl radicals in the presence of ferritin and haemosiderin. Is haemosiderin formation a biological protective mechanism? *Biochem J* 1986;234:727-31.
56. Gutteridge JMC. Inhibition of the Fenton reaction by the protein caeruloplasmin and other copper complexes. Assessment of ferroxidase and radical scavenging activities. *Chem Biol Interact* 1985;56:113-20.
57. Halliwell B. Iron and damage to biomolecules. In: Lauffer RB (Ed.). *Iron and human disease*. Boca Raton: CRC Press;1992. p. 210.
58. Lefnesky EJ. Tissue iron overload and mechanisms of iron-catalyzed oxidative injury. *Adv Exp Med Biol* 1994;366:129-46.
59. Ying W, Han S-K, Miller JW, Swanson RA. Acidosis potentiates oxidative neuronal death by multiple mechanisms. *J Neurochem* 1999;73:1549-56.
60. Grootveld M, Bell JD, Halliwell B, Aruoma OI, Bomford A, Sadler PJ. Non-transferrin-bound iron in plasma or serum from patients with idiopathic hemochromatosis. Characterization by high performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem* 1989;264:4417-22.
61. Weinberg ED. The iron-with-holding defense system. *Am Soc Microbiol News* 1993;59:559-62.
62. Ferrali M, Signorini C, Ciccoli L, Comporti M. Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and isouramil. *Biochem J* 1992;285:295-301.
63. Buonocore G, Zani S, Sargentini I, Gioia D, Signorini C, Bracci R. Hypoxia-induced free iron released in the red cells of newborn infants. *Acta Paediatr* 1998;87:77-81.
64. Bracci R, Benedetti PA, Ciambellotti V. Hydrogen peroxide generation in the erythrocytes of newborn infants. *Biol Neonate* 1970;15:135-41.
65. Bracci R, Buonocore G, Talluri B, Berni S. Neonatal hyperbilirubinemia. Evidence for a role of the erythrocyte enzyme activities involved in the detoxification of oxygen radicals. *Acta Paediatr Scand* 1988;77:349-56.
66. Signorini C, Ferrali M, Ciccoli L, Sugherini L, Magnani A, Comporti M. Iron release, membrane protein oxidation and erythrocyte ageing. *FEBS Lett* 1995;362:165-70.
67. Vives Corrons JL, Puyades MA, Colomer D. Increase of enzyme activities following the *in vitro* peroxidation of normal human red blood cells. *Enzyme* 1998;39:1-7.
68. Buonocore G, Berni S, Gioia D, Bracci R. Characteristics and functional properties of red cells during the first days of life. *Biol Neonate* 1991;60:137-43.
69. Reuter A, Klinger W. The influence of systemic hypoxia and reoxygenation of the glutathione redox system of brain, liver, lung and plasma in newborn rats. *Exp Toxicol Pathol* 1992;44:339-43.
70. Ciccoli L, Signorini C, Alessandrini C, Ferrali M, Comporti M. Iron release, lipid peroxidation and morphological alterations of erythrocytes exposed to acrolein and phenylhydrazine. *Exp Mol Pat* 1994;60:108-18.
71. Hwang J, Krebs C, Huynh BH, Edmondson DE, Theil EC, Penner-Hahn JE. A short Fe-Fe distance in peroxodiferric ferritin: control of Fe substrate versus cofactor decay? *Science* 2000;287:122-5.
72. Gutteridge JMC. Ferrous ions detected in cerebrospinal fluid by using bleomycin and DNA damage. *Clin Sci* 1992;82:315-20.
73. Bracci R, Buonocore G. The antioxidant status of erythrocytes in preterm and term infants. *Semin Neonatol* 1998;3:191-7.
74. Ivacko JA, Sun R, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic brain injury induces an acute microglial reaction in perinatal rats. *Pediatr Res* 1996;39:39-47.
75. Dietrich RB, Bradley WG. Iron accumulation in the basal ganglia following severe ischemic-anoxic insults in children. *Radiology* 1998;68:203-6.
76. Kaur C, Ling EA. Increased expression of transferrin receptors and iron in amoeboid microglial cells in postnatal rats following an exposure to hypoxia. *Neurosci Lett* 1999;262:183-6.
77. Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 1997;17:3-8.
78. Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1999;26:463-71.
79. Crofts AR, Barquera B, Gennis RB, Kuras R, Guergova-Kuras M, Berry EA. Mechanisms of ubiquinol oxidation by the bc(1) complex: different domains of the quinol binding pocket and their role in the mechanism and binding of inhibitors. *Biochemistry* 1999;38:15807-26.
80. Demin OV, Kholodenko BN, Skulachev VP. A model of O₂⁻ generation in the complex III of the electron transport chain. *Mol Cell Biochem* 1998;184:21-33.

81. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 1991;266:22028-34.
82. Guidot DM, Repine JE, Kitlowski AD, Flores SC, Nelsol SK, Wright RM *et al*. Mitochondrial respiratory scavengers extramitochondrial superoxide anion via a nonenzymatic mechanism. *J Clin Invest* 1995;96:1131-6.
83. Watabe S, Hiroi T, Yamamoto Y, Fujioka Y, Hasegawa H, Yago N *et al*. SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxide reductase in mitochondria. *Eur J Biochem* 1997;249:52-60.
84. Fridovich I. Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot -}$), superoxide dismutases and related matters. *J Biol Chem* 1997;272:18515-7.
85. Sutton HC, Winterbourn CC. On the participation of higher oxidative states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Radic Biol Med* 1989; 6:53-60.
86. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca^{2+} is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. *FEBS Lett* 1996;378:150-2.
87. Taylor DL, Edwards AD, Mehemet H. Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Patol* 1999;9:93-117.
88. Turrens JG, Alexandre A, Lehninger AL. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1985;237:408-14.
89. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998;60:619-42.
90. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci* 1991;14:60-7.
91. East SJ, Garthwaite J. NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cGMP formation through the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci Lett* 1991;123:17-9.
92. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271:C1424-37.
93. Doyle CA, Slater P. Localization of neuronal and endothelial nitric oxide synthase isoforms in human hippocampus. *Neuroscience* 1997;76:387-95.
94. Merrill JE, Murphy SP, Mitrovic B, Mackenzie-Graham A, Dopp JC, Ding M *et al*. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production by oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 1997;48:372-84.
95. Dalkara T, Moskowitz MA. Neurotoxic and neuroprotective roles of nitric oxide in cerebral ischemia. *Int Rev Neurobiol* 1997; 40:319-36.
96. Crow JP, Beckman JS. The importance of superoxide in nitric-oxide-dependent toxicity: evidence for peroxynitrite-mediated injury. *Adv Exp Med Biol* 1996;387:147-61.
97. Szabó C, Ohshima H. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide* 1997;1:373-85.
98. Ullrich V, Bachschmid M. Superoxide as a messenger of endothelial function. *Biochem Biophys Res Comm* 2000;278:1-8.
99. Brune B, Dimmeler S, Molina Y, Vedia L, Lapetina EG. Nitric oxide: a signal for ADP-ribosylation of proteins. *Life Sci* 1994; 54:61-70.
100. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitric oxide derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998; 91:393-7.
101. Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 1997;20:132-9.
102. Dalkara T, Moskowitz MA. The complex role of nitric oxide in the pathophysiology of focal cerebral ischemia. *Brain Pathol* 1994;4:49-57.
103. Saikumar P, Dong Z, Patel Y, Hall K, Hopfer U, Weinberg JM *et al*. Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene* 1998;17:3341-9.
104. Wang X, Karlsson JO, Zhu C, Bahr BA, Hagberg H, Blomgren K. Caspase-3 activation after neonatal rat cerebral hypoxia-ischemia. *Biol Neonate* 2001;79:172-9.
105. Stennicke HR, Slavesen GS. Caspases-controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochem Biophys Acta* 2000;1477:299-306.
106. Cohen GM. Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16.
107. Sastre J, Pallardo F, Asuncion JG, Vina J. Mitochondrial oxidative stress and aging. *Free Radicals Res* 2000;32:189-98.
108. Liu X, Zou H, Wang W. DFF a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997;89:175-84.
109. Lazebnik YA, Kauffman SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 1994;371:346-7.
110. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391:43-50.
111. Blomgren K, Kawashima S, Saido T, Karlsson J, Elmered A, Hagberg H. Fodrin degradation and subcellular distribution of colpains after neonatal rat cerebral hypoxic-ischemia. *Brain Res* 1995;684:143-9.
112. Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol* 1999; 9:119-31.
113. Leist M, Single B, Kunstle G, Volbracht C, Hentze H, Nicotera P. Apoptosis in the absence of poly-(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Biophys Res Comm* 1997;233:518-22.

Isoprostani e stress ossidativo nel danno cerebrale del neonato

Luisa MINGHETTI, Antonietta BERNARDO e Anita GRECO

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

Riassunto. - Gli isoprostani sono una famiglia di lipidi biologicamente attivi recentemente identificata come una nuova classe di indici specifici e affidabili di perossidazione lipidica e di danno ossidativo *in vivo* e *ex vivo*. Queste molecole sono stabili, relativamente abbondanti e misurabili mediante tecniche analitiche sensibili e di facile impiego. In questi ultimi anni la determinazione dei livelli di isoprostani nei tessuti e nei liquidi biologici ha significativamente migliorato la nostra conoscenza sul ruolo svolto dallo stress ossidativo in molte patologie neurologiche. Sebbene l'utilizzo di queste molecole nell'ambito delle patologie neonatali sia ancora limitato, l'analisi dei loro livelli e delle loro funzioni può rappresentare un valido strumento per migliorare la comprensione dei meccanismi coinvolti nel danno cerebrale in seguito a eventi ipossico-ischemici o infiammatori durante il periodo fetale e perinatale.

Parole chiave: isoprostani, danno cerebrale, radicali liberi, oligodendrociti.

Summary (*Isoprostanes and oxidative stress in brain damage of the newborn*). - Isoprostanes are a family of biologically active molecules recently characterized, which is emerging as a new class of specific and reliable markers of *in vivo* and *ex vivo* lipid peroxidation and oxidative damage. These molecules are stable, relatively abundant and easily detectable by sensitive and specific analytical methods. In the last years, the measurement of their levels in tissue homogenates or biological fluids has significantly improved our knowledge on the involvement of oxidative stress in several neurological diseases. Here we present evidence indicating that isoprostanes can be successfully used also to study the mechanisms involved in free radical brain damage following hypoxic-ischaemic or inflammatory conditions in newborns and preterm infants.

Key words: isoprostanes, brain damage, free radicals, oligodendrocytes.

Introduzione

Durante lo sviluppo fetale molti fattori esterni possono indurre stati di ipossia o di infiammazione e mettere a rischio l'integrità funzionale del sistema nervoso centrale (SNC). Indipendentemente dal tipo di evento patologico specifico (infezioni uterine, diminuito scambio materno-fetale, ipossia perinatale), l'eccessiva formazione di radicali liberi da parte di cellule che risiedono nel SNC (neuroni, cellule gliali attivate, cellule endoteliali), o da parte di cellule infiammatorie ematiche (granulociti e monociti/macrofagi) infiltrate nel tessuto cerebrale danneggiato, costituisce uno dei principali meccanismi di danno cerebrale fetale e perinatale [1, 2].

I radicali liberi sono molecole altamente reattive e instabili, a causa della presenza di un elettrone spaiato sull'orbitale esterno. La loro tossicità è dovuta alla capacità di cedere (radicali riducenti) o di catturare (radicali ossidanti) elettroni da altre molecole, come lipidi, proteine e acidi nucleici, modificandone struttura e funzioni. La formazione di radicali liberi è un evento fisiologico - essendo parte di tutte le reazioni di ossidoriduzione del metabolismo cellulare - e la cellula è in grado di difendersi dall'azione di queste molecole

attraverso una batteria di sistemi anti-ossidanti enzimatici (superossido dismutasi, catalasi, glutazione perossidasi) e chimici (glutazione ridotto e vitamine antiossidanti quali C, E, retinolo). Nel corso di eventi patologici, quali ad esempio eventi ipossico-ischemici o infiammatori, i sistemi di produzione di radicali liberi ($O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , NO^{\bullet} , $ONOO^-$) possono superare i sistemi di neutralizzazione di tali radicali, instaurando una condizione di stress ossidativo (si veda per maggior dettaglio Buonocore *et al.*, in questo stesso fascicolo).

Radicali liberi, perossidazione lipidica e danno cerebrale

Il cervello è un organo particolarmente suscettibile al danno ossidativo a causa dell'elevato consumo di ossigeno, dell'alto contenuto di ferro (un potente catalizzatore delle reazioni che portano alla formazione di radicali) e di lipidi poli-insaturi (substrati facilmente ossidabili) e dei limitati sistemi endogeni anti-ossidanti. Numerosi studi clinici e sperimentali hanno dimostrato il ruolo dello stress ossidativo nelle patologie neurologiche. Tuttavia questi studi sono stati in parte osta-

colati da una serie di difficoltà tecniche dovute all'elevata reattività ed instabilità delle specie radicaliche. La risonanza elettronica paramagnetica (EPR) è attualmente l'unica tecnica in grado di misurare in modo diretto i radicali liberi, ma purtroppo le concentrazioni di queste specie *in vivo* non sono sufficienti per ottenere un segnale efficacemente rilevabile. Per ovviare a questo problema vengono generalmente utilizzate come indicatori di avvenuto stress ossidativo alcune molecole che derivano dalla reazione dei radicali con molecole bersaglio quali DNA, proteine e lipidi poli-insaturi [3]. L'abbondante presenza di acidi grassi poli-insaturi esterificati nei fosfolipidi di membrana (tra i quali l'acido arachidonico, precursore di mediatori lipidici quali prostaglandine, trombossano e leucotrieni) fa sì che la perossidazione lipidica sia l'evento di maggiore entità nel danno ossidativo cerebrale. Da queste reazioni originano una serie di derivati, tra cui malondialdeide e dieni coniugati ampiamente utilizzati come indicatori di stress ossidativo. La loro determinazione presenta però delle limitazioni che devono essere tenute in considerazione per una corretta valutazione dell'entità del danno ossidativo. Ad esempio, la malondialdeide è soggetta a metabolismo *in vivo* e sintesi *ex vivo* e il metodo impiegato per il suo dosaggio non è specifico, in quanto il reagente su cui si basa (l'acido tiobarbiturico) può reagire con altre sostanze e dare falsi positivi. Anche la determinazione dei dieni coniugati presenta problemi di specificità a causa di possibili interferenze di composti che non derivano da perossidazione lipidica [4, 5].

Recentemente è stata caratterizzata un'altra classe di prodotti derivati dalla perossidazione lipidica, gli isoprostani, che presentano alcuni importanti vantaggi rispetto agli indicatori di stress ossidativo classicamente utilizzati. Tali vantaggi sono prevalentemente associati alla loro stabilità, relativa abbondanza e disponibilità di metodi analitici specifici e sensibili per la loro misurazione in tessuti e liquidi biologici [6].

Isoprostani

Gli isoprostani sono composti strutturalmente simili alle prostaglandine, sintetizzati *in vivo* in seguito a perossidazione lipidica dell'acido arachidonico da parte di radicali liberi dell'ossigeno [7]. L'azione dei radicali sull'acido arachidonico avviene quando l'acido grasso è esterificato nei fosfolipidi di membrana, dando luogo a fosfolipidi contenenti isoprostani in posizione sn₂. Questi nuovi fosfolipidi, più polari e meno flessibili, possono contribuire a determinare la profonda alterazione delle caratteristiche chimico-fisiche delle membrane che consegue al danno ossidativo [8]. I modelli molecolari di fosfolipidi contenenti isoprostani ne mostrano infatti la struttura "distorta" rispetto al fosfolipide nativo (Fig. 1). L'enzima maggiormente coinvolto nella

liberazione dell'acido arachidonico esterificato in posizione sn₂ è la fosfolipasi A₂ di cui sono state identificate numerose isoforme, classificabili sommariamente in due gruppi, citosoliche e secretorie, sulla base della selettività per l'acido grasso esterificato, dipendenza dal Ca²⁺, e sensibilità ad inibitori specifici. Si ritiene che queste stesse fosfolipasi siano coinvolte nel rilascio degli isoprostani dagli "iso-fosfolipidi" di membrana, e che alcune isoforme abbiano una maggiore affinità per questi fosfolipidi modificati. La liberazione degli isoprostani dagli iso-fosfolipidi contribuirebbe al recupero della struttura nativa e spiegherebbe il ruolo protettivo della fosfolipasi A₂ sulle membrane danneggiate dai radicali dell'ossigeno [9].

Una volta liberati dalle membrane gli isoprostani raggiungono diversi liquidi biologici (liquor, plasma), dove persistono grazie alla loro stabilità chimica e all'abbondanza relativa rispetto agli altri prodotti di perossidazione lipidica (oltre 10 volte) [10], e successivamente eliminati nelle urine. In modelli animali di stress ossidativo, gli isoprostani esterificati nei tessuti bersaglio ed i livelli circolanti e urinari di isoprostani liberi risultano notevolmente aumentati, indicando che queste molecole sono indici d'elezione dello stress ossidativo *in vivo* [11].

Per le caratteristiche di stabilità e abbondanza, e grazie alle tecniche analitiche semplici ed affidabili che sono state sviluppate ed affinate nell'ultimo decennio, gli isoprostani sono stati impiegati con successo come indicatori clinici del danno ossidativo associato a varie patologie e per valutare l'efficacia di farmaci antiossidanti [12, 13].

Oltre a rappresentare un importante indice di perossidazione lipidica *in vivo*, gli isoprostani possono anche svolgere un ruolo di mediatori lipidici con specifica attività biologica [14, 15]. Analogamente ai derivati enzimatici dell'acido arachidonico (prostaglandine, trombossano e leucotrieni) che regolano le funzioni cellulari attraverso l'attivazione di recettori di membrana [16], gli isoprostani sono in grado di legare in modo specifico e di saturare alcuni di questi stessi recettori, in particolare il recettore del trombossano A₂ (TXA₂). Al contrario di TXA₂ caratterizzato da un tempo di emivita estremamente breve [17, 18], l'8-epi-PGF_{2α}, uno dei più abbondanti isoprostani sintetizzati *in vivo*, è estremamente stabile e attraverso l'interazione con il recettore del TXA₂ potrebbe esercitare effetti biologici prolungati e potenzialmente patologici. In accordo con questa ipotesi, è stato osservato che l'8-epi-PGF_{2α} modula la funzione piastrinica e l'adesione delle piastrine alle cellule endoteliali [19, 20], è un potente vasocostrittore sia *in vitro* che *in vivo* [21] e che tali funzioni sono mediate dal recettore per il TXA₂ in quanto prevenute da antagonisti specifici per questo recettore.

Alcuni studi suggeriscono inoltre l'esistenza di un recettore specifico per l'8-epi-PGF_{2α} sebbene non siano state ancora fornite evidenze molecolari dell'esistenza di due recettori distinti [22, 23].

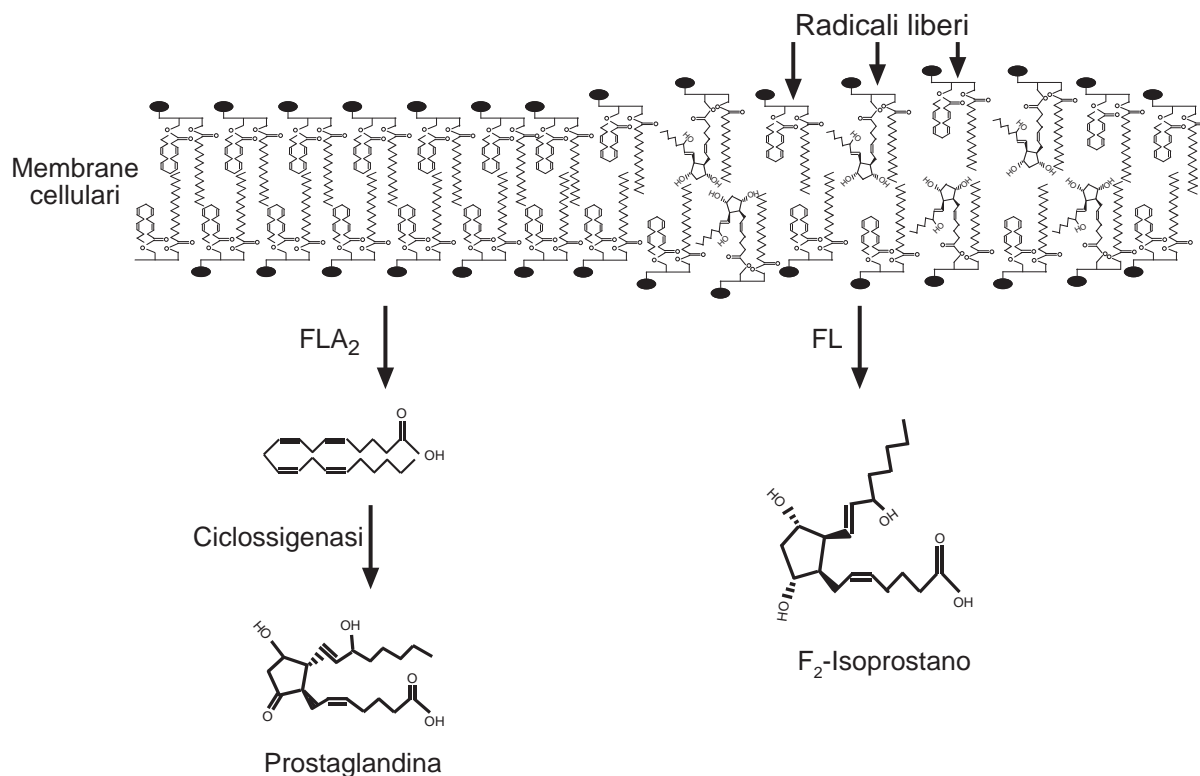


Fig. 1. - Rappresentazione schematica della formazione di isoprostani e per confronto delle prostaglandine. Gli isoprostani (F₂-isoprostani) vengono sintetizzati attraverso l'azione dei radicali liberi sull'acido arachidonico esterificato nei fosfolipidi di membrana. Una volta formati, vengono liberati dall'azione delle fosfolipasi (FL). Al contrario, la sintesi di prostaglandine avviene per opera dell'enzima ciclossigenasi sull'acido arachidonico già in forma libera. La figura mostra inoltre l'analogia strutturale tra isoprostani e prostaglandine dovuta alla presenza di un anello ciclopentanico. Nel caso dell'isoprostano, le due catene laterali sono in posizione *cis* rispetto all'anello, mentre nel caso della prostaglandina sono in forma *trans*. Questa diversità strutturale spiegherebbe il loro differente comportamento biologico.

Isoprostani e patologie neurologiche

La disponibilità di tecniche di misurazione sensibili, specifiche e di facile utilizzo, ha consentito in questi ultimi anni un rapido sviluppo delle conoscenze sugli isoprostani e sul loro impiego come indici della formazione di radicali liberi in molte patologie [3, 12, 24]. La possibilità di misurare questi marcatori della perossidazione lipidica in liquidi biologici, quali ad esempio plasma, urina e saliva, fornisce infatti un metodo affidabile e non invasivo per determinare, *in vivo* o *ex vivo*, l'instaurarsi di una condizione di stress ossidativo, di seguirne l'evoluzione e di verificare l'efficacia di eventuali interventi farmacologici. La determinazione dei livelli di isoprostano nel liquido cerebrospinale ha fornito una evidenza diretta ed inequivocabile della presenza di un danno ossidativo in diverse patologie neurologiche dell'adulto (recentemente passate in rassegna da Greco *et al.* [25]). Ad esempio, ricerche condotte dal nostro gruppo hanno dimostrato la presenza di livelli aumentati di isoprostano in una malattia

neurodegenerativa quale la malattia di Creutzfeldt-Jakob [26] ed in una malattia su base autoimmune, quale la sclerosi multipla [27]. Nell'ambito delle patologie materno-fetali e neonatali, sono stati condotti, ad oggi, alcuni interessanti studi che riportano la presenza di livelli alterati di isoprostano in patologie della gravidanza caratterizzate da grave sofferenza fetale, quali la pre-eclampsia e il diabete.

La pre-eclampsia è una delle principali cause di ritardo della crescita del feto, di nascita prematura e di basso peso alla nascita. Questa patologia della gravidanza è caratterizzata da una aumentata vasocostrizione che genera ipertensione nella madre e un diminuito apporto di sangue e ossigeno a vari organi e tessuti, inclusi reni, utero e placenta. Altre anomalie associate alla pre-eclampsia sono l'aumentata aggregazione piastrinica con coagulazione intravasale disseminata, disfunzioni dell'endotelio, proteinuria ed edema. Nonostante gli intensi studi, la causa della patologia è ancora sconosciuta e l'unica strategia di intervento al momento disponibile è la rimozione del feto e della placenta. La presenza nel

plasma di donne affette da pre-eclampsia di lipidi perossidi e di anticorpi contro forme ossidate di lipoproteine a bassa densità [28, 29], suggerisce che anche in questa patologia si verifichi una condizione di stress ossidativo. Recentemente questa ipotesi è stata confermata da uno studio clinico in cui sono stati misurati i livelli plasmatici, urinari e salivari di 8-epi-PGF_{2α}. In questo studio [30] è stato dimostrato che i livelli plasmatici di 8-epi-PGF_{2α} sono significativamente aumentati in gravi forme di pre-eclampsia o di eclampsia. Al contrario, i livelli urinari risultano diminuiti rispetto a quelli di donne con forme meno gravi di pre-eclampsia o con gravidanze normotensive, probabilmente a causa della ridotta funzionalità renale delle pazienti affette da pre-eclampsia in forma grave. È stato inoltre dimostrato che la concentrazione tissutale e la capacità di sintesi di 8-epi-PGF_{2α} della placenta sono fortemente aumentate nel caso di pre-eclampsia rispetto a gravidanze normali [31]. Gli autori suggeriscono inoltre che l'aumentata produzione di 8-epi-PGF_{2α} nei tessuti ottenuti da placente di pazienti affette da pre-eclampsia e eclampsia rappresenti non solo un indice diretto del danno ossidativo che si verifica in questa condizione, ma anche un possibile meccanismo patogenetico mediante l'azione che 8-epi-PGF_{2α} può esercitare sui recettori per il TXA₂ presenti a livello delle cellule endoteliali materne e fetali, provocando o amplificando la vasocostrizione, il danno endoteliale e la sofferenza materno-fetale.

La presenza di diabete in corso di gravidanza è un'altra condizione patologica che può risultare in importanti malformazioni fetali. Circa il 25% delle gravidanze in presenza di diabete evolvono in pre-eclampsia. Nonostante il ruolo dello stress ossidativo nelle complicanze da diabete e nella pre-eclampsia siano note, non sono ad oggi disponibili studi clinici che confermino un ruolo dei danni da radicali nel corso di gravidanze diabetiche. In uno studio recente su un modello di diabete sperimentale murino sono stati riportati livelli plasmatici di 8-epi-PGF_{2α} più elevati nelle femmine affette di diabete rispetto al gruppo di controllo. I livelli di 8-epi-PGF_{2α} non erano ulteriormente alterati nel corso della gravidanza. Allo stesso tempo, i livelli plasmatici fetali di 8-epi-PGF_{2α} erano notevolmente più alti nei feti nati da madri diabetiche rispetto a quelli nati da madri non diabetiche [32]. In un altro studio, l'aumento dei livelli fetali di 8-epi-PGF_{2α} e le evidenti anomalie morfologiche fetale venivano ridotti dalla somministrazione *in vivo* ed *in vitro* di un anti-ossidante quale la N-acetil-cisteina [33]. Questi studi indicano che l'induzione di diabete sperimentale genera stress ossidativo sia nelle madri che nel feto e suggeriscono che il danno ossidativo o gli stessi isoprostani possano essere implicati nelle malformazioni embrionali associate al diabete [34, 35].

Oligodendrociti e leucomalacia periventricolare

La leucomalacia periventricolare (LPV) è una patologia caratterizzata da gliosi e necrosi focale della sostanza bianca cerebrale adiacente agli angoli esterni dei ventricoli, che colpisce prevalentemente bambini prematuri con peso alla nascita molto basso (< 1500 g) ed è una delle più comuni cause di paresi cerebrali, danni cognitivi e motori nei bambini che sopravvivono. Il rischio di LPV è particolarmente elevato in un determinato periodo dello sviluppo del cervello umano, compreso tra la 23 e 32 settimana di gestazione. Questa finestra di elevata suscettibilità è probabilmente dovuta alla immaturità cerebro-vascolare che rende la sostanza bianca cerebrale particolarmente sensibile al danno ipossico ischemico [36]. Le evidenti anomalie dei processi di mielinizzazione, caratteristiche della LPV suggeriscono che il principale bersaglio cellulare in questa patologia siano gli oligodendrociti, le cellule responsabili della formazione di mielina nel SNC [37, 38]. Durante lo sviluppo ed i processi riparativi, gli oligodendrociti estendono i loro processi formando guaine multilamellari che circondano l'assone neuronale, aumentando la velocità di conduzione nervosa. La formazione, la crescita e il mantenimento della guaina mielinica sono fondamentali per lo sviluppo e l'integrità funzionale del SNC. Tra le cellule del cervello, gli oligodendrociti hanno l'attività metabolica ossidativa più elevata [39] e segnali ambientali avversi o situazioni di stress che riducano tale metabolismo possono ritardare o inibire la corretta formazione della guaina mielinica.

Studi *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che gli oligodendrociti maturi derivano da cellule progenitrici attraverso un numero di stadi distinti (pre-oligodendrociti, oligodendrociti immaturi, e oligodendrociti maturi) definiti dall'espressione di molecole di superficie e rispondenti a specifici fattori di crescita [40]. La mancanza di modelli sperimentali che riproducano nella loro interezza i processi di demielinizzazione osservabili nella LPV ha reso difficile lo studio *in vivo* dei meccanismi alla base dei disturbi al processo di differenziamento della linea oligodendrocitaria e di formazione di mielina. Recentemente, uno studio autoptico [41], eseguito su 26 cervelli umani di età compresa tra 18 e 41 settimane di gestazione con cause di decesso non imputabili a LPV, ha dimostrato che durante il periodo di maggiore vulnerabilità, i pre-oligodendrociti (caratterizzati dalla positività per gli anticorpi NG2 e O4, specifici rispettivamente per un proteoglicano e un sulfatide di membrana [42], ma negativi all'anticorpo O1 che riconosce un ganglioside di membrana espresso in tempi successivi del differenziamento) sono gli elementi predominanti, corrispondendo a circa il 90% delle cellule totali derivate dalla linea oligodendrocitaria. Gli oligodendrociti immaturi (identificati dalla marcatura per anticorpo O4 e O1) rappre-

sentano una esigua popolazione tra la 18^a e 27^a settimana, per aumentare significativamente di numero a partire dalla 30^a settimana in coincidenza con una ristretta localizzazione nella materia bianca periventricolare di guaine mieliniche positive per la proteina basica della mielina, caratteristica degli oligodendrociti maturi.

La maggior vulnerabilità delle forme immature al danno ipossico-ischemico è suggerita anche da studi *in vitro* che utilizzano colture altamente purificate di precursori di oligodendrociti di ratto in grado di differenziarsi *in vitro* in presenza di fattori di crescita specifici [38, 43-46]. In particolare, studi condotti nel nostro laboratorio hanno evidenziato che i precursori degli oligodendrociti sono i più vulnerabili a qualsiasi tipo di insulto da radicali liberi, mentre popolazioni più differenziate (oligodendrociti immaturi) presentano una maggiore resistenza. Popolazioni di oligodendrociti maturi (con > 95% di cellule positive per la proteina basica della mielina), mostrano invece una resistenza intermedia rispetto agli altri stadi meno differenziati (perioligodendrociti e oligodendrociti maturi). In accordo con questi risultati, abbiamo osservato una maggiore produzione di 8-epi-PGF_{2α} in seguito ad esposizione a donatori di O₂[•], NO[•], ONOO⁻ in colture immature o più differenziate rispetto alle forme maturative intermedie. Alla base della diversa vulnerabilità al danno ossidativo dei vari stadi di maturazione oligodendrocitaria potrebbero essere sia la composizione lipidica della membrana, che viene modificata nel corso del differenziamento, sia il differente corredo di enzimi capaci di eliminare o ridurre l'accumulo dei radicali liberi (catalasi, superossido dismutasi Cu/Zn, superossido dismutasi Mn, glutatione perossidasi) [47].

Infine, è interessante ricordare il potenziale ruolo gli isoprostani nei meccanismi di danno oligodendrocitario da stress ossidativo. Come accennato precedentemente, gli isoprostani possono svolgere una azione biologica attraverso il riconoscimento del recettore per il TXA₂, recentemente identificato e caratterizzato in colture miste di oligodendrociti immaturi [48]. Altri autori [49] hanno dimostrato che gli oligodendrociti sono più sensibili agli effetti di un aumento di calcio intracellulare rispetto ad altre cellule gliali, ad esempio gli astrociti. L'attivazione del recettore TP da parte di 8-epi-PGF_{2α} potrebbe contribuire attraverso questa via al danno a carico degli oligodendrociti. Sarà quindi importante in futuro stabilire se il recettore per TXA₂ o il recettore specifico per 8-epi-PGF_{2α} siano espressi dagli oligodendrociti anche *in vivo* ed in maniera dipendente dal loro stadio maturativo.

Conclusioni

Le conoscenze sugli isoprostani come indici affidabili di perossidazione lipidica endogena sono di recente acquisizione [7], tuttavia gli studi di questi ultimi anni

forniscono prove convincenti sull'utilità di queste molecole nello studio dello stress ossidativo in molte importanti patologie umane. La misurazione dei livelli di isoprostani in liquidi biologici, come plasma urina e liquido cerebrospinale fornisce infatti un valido strumento per valutare la presenza di una condizione di stress ossidativo *in vivo* o *ex vivo* e soprattutto per seguire con metodi non invasivi la progressione dei fenomeni di danno ossidativo. Sebbene utilizzo di questi marcatori si sia rapidamente diffuso nell'ambito delle neuropatologie dell'adulto [25], il loro impiego nelle patologie fetali e neonatali è ancora limitato. Gli esempi riassunti in questo articolo indicano che lo studio di queste molecole può essere di grande aiuto anche in questo tipo di patologie. L'interesse per questa classe di lipidi è inoltre rafforzato dall'azione biologica che gli isoprostani possono svolgere in molte condizioni patologiche. Una migliore conoscenza delle loro funzioni e la caratterizzazione del loro recettore potrà contribuire alla definizione di nuovi potenziali meccanismi patogenetici del danno da radicali.

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.
- Taylor DL, Edwards AD, Mehmet H. Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Pathol* 1999;9:93-117.
- Rimbach G, Hohler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J *et al.* Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch Tierernahr* 1999;52:203-22.
- Halliwell B, Gutteridge MC. The measurement of free radical reactions in human. *FEBS Lett* 1987;213:9-14.
- Halliwell B, Gutteridge MC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human diseases: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119:598-618.
- Sodergren E, Vessby B, Basu S. Radioimmunological measurement of F₂-isoprostanines after hydrolysis of lipids in tissues. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000;63(3):149-52.
- Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced *in vivo* in humans by a non-cyclooxygenase, free radical catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9383-7.
- Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanines) are formed *in situ* on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10721-5.

9. Sevanian A, Kim E. Phospholipase A₂ dependent release of fatty acids from peroxidized membranes. *J Free Radic Biol Med* 1985; 1:263-71.
10. Longmire AW, Swift LL, Roberts LJ 2nd, Awad JA, Burk RF, Morrow JD. Effect of oxygen tension on the generation of F₂-isoprostanes and malondialdehyde in peroxidizing rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 1994;47(7):1173-7.
11. Liu T, Stern A, Roberts LJ, Morrow JD. The isoprostanes: novel prostaglandin-like products of the free radical-catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *J Biomed Sci* 1999;6:226-35.
12. Awad JA, Roberts II LJ, Burk RF, Morrow JD. Isoprostanes: prostaglandin-like compounds formed *in vivo* independently of cyclooxygenase: use as clinical indicators of oxidant damage. *Gastroenterol Clin North Am* 1996;25:409-17.
13. Souvignet C, Cracowski JL, Stanke-Labesque F, Bessard G. Are isoprostanes a clinical marker for antioxidant drug investigation? *Fundam Clin Pharmacol* 2000;14:1-10.
14. Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res* 1997;36:1-21.
15. Roberts II LJ, Morrow JD. The generation and actions of isoprostanes. *Biochem Biophys Acta* 1997;1345:121-35.
16. Narumiya S. Prostanoid receptors and signal transduction. *Prog Brain Res* 1996;113:231-41.
17. Takabashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ *et al*. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F₂α in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A₂ receptors. *J Clin Invest* 1992; 90(1):136-41.
18. Kinsella BT, O'Mahony DJ, FitzGerald GA. The human thromboxane A₂ receptor a isoform (TPa) functionally couples to the G-proteins Gq and G11 *in vivo* and is activated by the isoprostane 8-epi prostaglandin F₂α. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;281:957-64.
19. Yin K, Halushka PV, Yan YT, Wong PY. Antiaggregatory activity of 8-epi-prostaglandin F₂α and other F-series prostanoids and their binding to thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptors in human platelets. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270:1192-6.
20. Leitinger N, Blazek I, Sinzinger H. The influence of isoprostanes on ADP-induced platelet aggregation and cyclic AMP-generation in human platelets. *Thromb Res* 1997;86:337-42.
21. Hill AA, Coleman RA, Taylor GW, Moore KP, Taylor IK. Effect of the isoprostanes, 8-iso prostaglandin E₂ and 8-iso prostaglandin F₂α, on the rabbit lung *in vivo*. *Prostaglandins* 1997;53:69-82.
22. Fukunaga M, Makita N, Roberts LJ, Morrow JD, Takahashi K, Badr KF. Evidence for the existence of F₂-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993;264(6 Pt 1):C16,19-24.
23. Praticò D, Smyth E, Violi F, FitzGerald G A. Local amplification of platelet function by 8-epi-prostaglandin F₂α is not mediated by thromboxane receptor isoforms. *J Biol Chem* 1996; 271:14916-24.
24. Patrono C, Fitzgerald GA. Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2309-15.
25. Greco A, Minghetti L, Levi G. Isoprostanes, novel markers of oxidative injury, help understanding the pathogenesis of neurodegenerative disease. *Neurochem Res* 2000;25 (9/10):1357-64.
26. Minghetti L, Greco A, Cardone F, Puopolo M, Ladogana A, Almonti S *et al*. Increased brain synthesis of prostaglandin E₂ and F₂-isoprostane in human and experimental transmissible spongiform encephalopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59(10):866-71.
27. Greco A, Minghetti L, Sette G, Fieschi C, Levi G. Cerebrospinal fluid isoprostane shows oxidative stress in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 1999;53(8):1876-9.
28. Wickens D, Wilkins MH, Lunec J, Ball G, Dormandy TL. Free radical oxidation (peroxidation) products in plasma in normal and abnormal pregnancy. *Ann Clin Biochem* 1981;18(Pt 3):158-62.
29. Wang Y, Walsh SW, Guo J, Zhang J. The imbalance between thromboxane and prostacyclin in preeclampsia is associated with and imbalance between lipid peroxides and vitamin E in maternal blood. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1695-700.
30. McKinney ET, Shouri R, Hunt RS, Ahokas RA, Sibai BM. Plasma, urinary and salivary 8-epi-prostaglandin F₂α levels in normotensive and preeclamptic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183(4):874-7.
31. Walsh SW, Vaughan JE, Wang Y, Roberts II KJ. Placental isoprostane is significantly increased in preeclampsia. *Faseb J* 2000;14:1289-96.
32. Gerber RT, Holemans K, O'Brien-Coker I, Mallet AI, Van Bree R, Van Assche A *et al*. Increase of isoprostane 8-isoprostaglandin F₂α in maternal and fetal blood of rats with streptozotocin-induced diabetes: evidence of lipid peroxidation. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1035-40.
33. Wentzel P, Welsh N, Eriksson UJ. Developmental damage, increased lipid peroxidation, diminished cyclooxygenase-2 gene expression, and lowered prostaglandin E₂ levels in rat embryos exposed to a diabetic environment. *Diabetes* 1999;48(4):813-20.
34. Eriksson UJ. Oxidative DNA damage and embryo development. *Nat Med* 1999;5(7):715.
35. Eriksson UJ, Borg LA, Cederberg J, Nordstrand H, Siman CM, Wentzel C *et al*. Pathogenesis of diabetes-induced congenital malformations. *Ups J Med Sci* 2000;105(2):53-84.
36. Volpe JJ. Brain injury in the premature infant: overview of clinical aspects, neuropathology and pathogenesis. *Semin Pediatr Neurol* 1998;5:135-51.
37. Back SA, Volpe JJ. Cellular and molecular pathogenesis of periventricular white matter injury. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 1997;3:96-107.
38. Fern R, Moller T. Rapid ischemic cell death in immature oligodendrocytes: a fatal glutamate release feedback loop. *J Neurosci* 2000;20:34-42.
39. Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansa RB. The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol* 1993;3:191-7.
40. Miller RH. Oligodendrocyte origins. *Trends Neurosci* 1996;19: 92-6.

41. Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ, Kinney HC. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J Neurosci* 2001;21:1302-12.
42. Gard AL, Williams WC, Burrell MR. Oligodendroblasts distinguished from O-2A glial progenitors by surface phenotype (O4(+)/GalC(-)) and response to cytokines using signal transducer LIFR beta. *Dev Biol* 1995;167:596-608.
43. Juurlink BHJ, Thorburne SK, Hertz L. Peroxide-scavenging deficit underlies oligodendrocyte susceptibility to oxidative stress. *Glia* 1998;22:371-8.
44. Back SA, Gan X-D, Li Y, Rosenberg PA, Volpe JJ. Maturation - dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *J Neurosci* 1998; 18:6241-53.
45. Jelinski SE, Yager JY, Juurlink BHJ. Preferential injury of oligodendroblasts by a short hypoxic-ischemic insult. *Brain Res* 1999;815:150-3.
46. Skoff RP, Bessert DA, Barks JDE, Song D, Cerghet M, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic injury results in acute disruption of myelin gene expression and death of oligodendroglial precursors in neonatal mice. *Int J Devl Neurosci* 2001;19:197-208.
47. Bernardo A, Greco A, Ajmone-Cat MA, Levi G, Minghetti L. *In vitro* studies on oligodendrocyte vulnerability to oxidative stress. *J Neurochem* 2001;76 (suppl. 1):36(P04-02).
48. Blackman SC, Dawson G, Antonakis K, Le Breton GC. The identification and characterization of oligodendrocyte thromboxane A₂ receptors. *J Biol Chem* 1998;273:475-83.
49. Smith KJ, Hall SM. Central demyelination induced *in vivo* by the calcium ionophore ionomycin. *Brain* 1994;117:1351-6.

Indici di sviluppo cognitivo e linguistico in bambini con lesione emisferica precoce

STEFANO VICARI

*Servizio di Neurologia e Riabilitazione, Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù",
Santa Marinella, Roma*

Riassunto. - Numerose osservazioni riportate in letteratura hanno evidenziato come lesioni congenite o acquisite entro i primi mesi di vita a carico di uno dei due emisferi cerebrali, possano esitare in deficit cognitivi "fini" evidenziabili solo mediante l'uso di strumenti raffinati di valutazione neuropsicologica. Questi studi non si limitano a fornire utili informazioni circa le tappe relative allo sviluppo neuropsicologico del bambino ma, soprattutto, aggiungono importanti elementi di conoscenza nella controversia "plasticità cerebrale - specializzazione emisferica precoce". Questa rassegna illustra alcuni dati sperimentali provenienti da studi condotti negli ultimi anni in bambini con lesione cerebrale focale acquisita molto precocemente. Il nostro obiettivo è quello di descrivere gli effetti determinati dalla lesione sullo sviluppo cognitivo di questi bambini in modo da suggerire, eventualmente, specifici percorsi diagnostici e riabilitativi.

Parole chiave: lesione cerebrale focale, sviluppo cognitivo, bambino.

Summary (*Cognitive and linguistic developmental indexes in children with early focal brain lesion*). - Prospective studies of development following early focal brain injury have identified deficits across a range of cognitive, linguistic and affective domains. In most cases these deficits are quite subtle and often not detected on standardized behavioral tests. Nonetheless, more detailed tests of neuropsychological functioning have documented subtle, persistent profiles of impairment. These contrasting findings have been cited in defense of two conflicting beliefs: plasticity and hemispheric equipotentiality theories on one side and early hemispheric specialization on the other. This paper shows some experimental data concerning studies from children with an early focal brain lesion. Our aim is to describe the effects determined by the lesion on the cognitive development and possible diagnostic and rehabilitative strategies.

Key words: focal cerebral lesion, cognitive development, child.

Introduzione

La letteratura neuropsicologica relativa agli effetti di lesioni emisferiche focali in pazienti adulti riporta numerosissime dissociazioni tra vari domini cognitivi (es. verbale vs non verbale, esplicito vs implicito) e tra competenze specifiche all'interno di ciascun dominio. Queste dissociazioni mostrano severi e selettivi deficit quali l'afasia, l'aprassia, l'amnesia, l'agnosia, l'alessia o l'acalculia. Viceversa, le osservazioni condotte in età evolutiva sugli effetti di lesioni emisferiche focali sono sorprendentemente limitate e riferiscono soprattutto singole dissociazioni (ad es. deficit linguistici o di funzioni percettive) e, in genere, i deficit osservabili nei bambini riguardano aspetti cognitivi più globali, quali il ritardo mentale, l'autismo, le difficoltà di apprendimento. Anche quando gli studi documentano deficit di abilità cognitive più specifiche, il disturbo è in genere sfumato e non assoluto come nella disfasia, dislessia o discalculia.

La ragione (o le ragioni) per cui lesioni cerebrali simili determinino effetti sulle competenze cognitive così diversi in persone adulte e in bambini restano, però,

ancora da chiarire. Un motivo possibile è che le lesioni cerebrali focali, quali ad esempio lesioni tumorali, vascolari, traumatiche, avvengano meno frequentemente nei bambini che negli adulti. Un altro motivo è che le ricerche in bambini con lesioni focali siano ancora "episodiche" e che quindi si riferiscano a popolazioni limitate. Comunque, a spiegazione di tali differenze bisogna considerare un ulteriore motivo: gli effetti di lesioni cerebrali focali acquisite in epoca molto precoce dello sviluppo sono qualitativamente diversi da quelli che si verificano in età adulta in quanto la localizzazione cerebrale di singole e specifiche funzioni cognitive emerge gradualmente durante lo sviluppo partendo da una organizzazione cerebrale almeno inizialmente indifferenziata [1].

Nonostante i numerosi interrogativi non ancora risolti, gli studi che si riferiscono agli effetti delle lesioni emisferiche focali sullo sviluppo cognitivo appaiono di grande interesse non solo per i loro risvolti clinici ma anche e soprattutto per le loro implicazioni teoriche. Questi studi, infatti, non si limitano a fornire utili informazioni circa le tappe relative allo sviluppo

neuropsicologico del bambino ma, soprattutto, aggiungono importanti elementi di conoscenza sulle basi neurali che guidano lo sviluppo cognitivo. In questo ambito, uno dei temi da sempre discusso è rappresentato dalla controversia “plasticità cerebrale vs specializzazione emisferica precoce”.

La plasticità cerebrale si riferisce all’assunto teorico secondo il quale il cervello nelle prime fasi del suo sviluppo è particolarmente flessibile ed elastico, cioè può mostrare un recupero sensibile dopo lesioni che in un adulto avrebbero, invece, effetti irreversibili. Il principio ispiratore della plasticità illimitata è stato per anni quello di Kennard [2], dedotto da esperimenti condotti su animali. In particolare una lesione provocata nelle aree motorie e premotorie della corteccia cerebrale di scimmie giovani produceva deficit irrilevanti rispetto a lesioni analoghe prodotte in scimmie adulte. L’ipotesi della plasticità senza limiti coincide con la teoria dell’equipotenzialità emisferica enunciata nel 1967 da Lennenberg [3]. Secondo questa teoria gli emisferi sono equipotenziali alla nascita e la specializzazione emisferica si sviluppa gradualmente nel tempo, sotto il duplice impulso dello sviluppo anatomico-funzionale del cervello e della stimolazione ambientale.

Il risultato finale è un assetto funzionale emisferico asimmetrico come quello degli adulti. Secondo questa teoria, quindi, una lesione emisferica, sia essa congenita o acquisita precocemente, può essere completamente recuperata dalle aree non lese all’interno dell’emisfero leso o dall’emisfero sano [4]; inoltre questa plasticità perde di potenza via via che si procede verso un funzionamento cognitivo adulto. Con il procedere della specializzazione emisferica, la plasticità cerebrale si ridurrebbe progressivamente rendendo impossibile un recupero completo.

In contrasto con queste osservazioni, però, numerosi autori hanno mostrato come, nonostante i bambini con lesione cerebrale focale precoce mostrino una evoluzione cognitiva clinicamente normale, alcuni lievi deficit linguistici o visuo-spaziali possano essere evidenziati mediante l’utilizzo di strumenti neuropsicologici raffinati [5-10]. Di conseguenza, in contrapposizione alla teoria dell’equipotenzialità si è andata via via affermando la teoria dell’anti-equipotenzialità o dell’invarianza della specializzazione emisferica. Kinsbourne [5] sostiene che gli emisferi cerebrali possiedono, già alla nascita, un certo grado di specializzazione emisferica e che sono sede di un programma genetico biologico che li differenzia. Questo significa che una funzione può essere processata, nei suoi aspetti più raffinati, solo dal suo emisfero e, in caso di lesione solo gli aspetti elementari, ma non gli aspetti più sofisticati, possono essere vicariati dall’emisfero sano. Anche le lesioni prenatali o connatali non sarebbero, quindi, del tutto recuperabili.

Sostegno ora alla teoria dell’equipotenzialità, ora alla teoria della specializzazione emisferica precoce, è stato fornito da numerosi autori (Tab. 1).

Woods e Teuber [11] sostengono che bambini con lesioni a carico di un emisfero, evolvono cognitivamente allo stesso modo di bambini con lesioni controlaterali, purché la lesione sia precoce. Secondo Hecaen [12], il recupero è completo se la lesione cerebrale avviene prima dei 5 anni di vita.

Woods e Carey [13] sottolineano come bambini con lesioni precoci a carico dell’emisfero sinistro non presentino deficit linguistici, mentre è possibile evidenziare tali deficit in caso di lesioni insorte tardivamente.

A sostegno della teoria della specializzazione emisferica si possono citare, invece, i lavori di Vargha-Khadem *et al.* [6], i quali hanno descritto deficit linguistici in tutti i soggetti con lesione cerebrale sinistra, sia connatale sia acquisita, da loro esaminati. Ulteriore supporto a tale teoria viene fornito anche da altri autori [7, 10, 14]. In realtà i risultati degli studi a sostegno della teoria della specializzazione emisferica precoce appaiono spesso contraddittori tra loro. Così, recentemente, molti autori sono giunti a rivalutare l’ipotesi della equipotenzialità e l’atteggiamento oggi prevalente è quello di ritenere che né la teoria della specializzazione precoce, né la teoria della equipotenzialità appaiono di grande aiuto se considerate come un assunto assoluto ma, piuttosto, si tende a ritenere che l’equipotenzialità e la specializzazione precoce siano gli estremi di un *continuum* [1, 15]. Secondo questo punto di vista una lesione emisferica sinistra, ad esempio, può provocare un iniziale ritardo nelle fasi più precoci dello sviluppo del linguaggio; successivamente, la plasticità cerebrale può permettere ad altre aree cerebrali di mediare funzioni linguistiche proprie delle aree danneggiate.

Da un punto di vista clinico, osservazioni di questo tipo appaiono utili anche nella valutazione e nel follow up di bambini nati pretermine i quali spesso presentano gli esiti di una sofferenza cerebrale di natura vascolare. Questi bambini, infatti, possono presentare, oltre a deficit motori, difficoltà cognitive di gravità variabile le cui conseguenze sullo sviluppo possono essere contenute da una diagnosi precoce ed un pronto intervento riabilitativo. Anche in questo caso la plasticità cerebrale può quindi vicariare il ruolo che aree cerebrali eventualmente danneggiate esercitano, sulla base di programmi geneticamente determinati, sullo sviluppo cognitivo.

Questa rassegna illustra alcuni dati sperimentali provenienti da studi condotti negli ultimi anni in bambini con lesione cerebrale focale acquisita molto precocemente. Il nostro obiettivo è quello di descrivere gli effetti determinati dalla lesione sullo sviluppo cognitivo di questi bambini in modo da suggerire, eventualmente, specifici percorsi diagnostici e riabilitativi.

Tabella 1. - Revisione di alcuni studi relativi agli effetti di lesioni cerebrali focali sullo sviluppo cognitivo

Studio	n. casi	Caratteristiche cliniche	Esami diagnostici	Risultati
Woods [23]	Sn= 27 Dx=23	In parte con lesione acquisita, e in parte con epilessia	TAC (in alcuni casi), WISC	Lesi sn e dx precoci VIQ e PIQ ridotto, lesi dx tardivi PIQ ridotto
Riva e Cazzaniga [7]	Sn= 22 Dx=26	In parte con lesione acquisita, nessun caso di epilessia	TAC (in alcuni casi), WISC	Lesi sn precoci VIQ e PIQ ridotto, lesi dx PIQ ridotto
Riva <i>et al.</i> [24]	Sn= 8 Dx=8	Alcuni casi con epilessia	TAC (in tutti i casi), WISC	Lesi sn VIQ e PIQ ridotto, lesi dx PIQ ridotto
Nass <i>et al.</i> [25]	Sn=15 Dx=13	Tutti con lesione congenita, nessun caso di epilessia	TAC (in tutti i casi), WISC	Lesi sn PIQ ridotto, lesi dx VIQ e PIQ ridotto
Banich <i>et al.</i> [26] Dx=14	Sn=27	In parte con lesione acquisita, non riferita la presenza o meno di epilessia	TAC (in tutti i casi), WISC, WAIS, Stanford Binet	Nessun confronto diretto tra dx e sn
Vargha-Khadem <i>et al.</i> [27]	Sn=42 Dx=40	Tutti con lesione congenita, gruppi con o senza epilessia a confronto	TAC o RMN WISC-R	Lesi dx e sn basso PIQ; lesi dx e sn con epilessia basso VIQ e PIQ
Vicari <i>et al.</i> [28]	Sn=17 Dx=18	Tutti con lesione congenita nessun caso di epilessia	TAC e/o RMN (in tutti i casi), WISC-R e test neuropsicologici	Lesi dx e sn deficitari rispetto ai controlli in prove prassico-costruttive; lesi sn deficitari in prove di fluidità verbale

Sn: sinistro; Dx: destro; WISC: *Wechsler intelligence scale for children*; VIQ: *verbal intelligence quotient*; PIQ: *performance intelligence quotient*; WAIS: *Wedyler intelligence scale for adults*.

Abilità visuo-spaziali

La capacità di analisi spaziale consiste nel codificare un set di elementi presentati visivamente e, quindi, nel riorganizzare questi elementi per formare un insieme coerente ed integrato.

Sugarman [16] ha dimostrato la presenza di un processo evolutivo nell'acquisizione di queste abilità. Bambini di 18 mesi di età posti di fronte ad un compito di organizzazione di materiale presentato visivamente (come, ad esempio, una serie di giocattoli) raggruppano soltanto un tipo di oggetti (ad esempio dei cubi di legno). Dai 24 mesi, invece, i bambini cominciano ad essere in

grado di organizzare più classi di oggetti, ma unicamente in modo sequenziale (prima uno poi un altro e così via). E' soltanto dai circa 30 mesi di età che i bambini riescono a realizzare classi spazialmente separate di oggetti, passando indifferentemente da una categoria ad un'altra. Così l'evoluzione nella concettualizzazione dei rapporti tra classi di oggetti si traduce in un cambiamento sistematico nell'attività di raggruppamento spaziale.

Cosa succede nei bambini con lesione cerebrale focale acquisita precocemente?

Stiles *et al.* [17, 18], hanno dimostrato che bambini di 2-3 anni di età e con lesione emisferica destra evolvono normalmente nella comprensione delle relazioni tra

classi, ma risultano in ritardo in attività di raggruppamento spaziale. Inoltre, questi bambini producono un numero limitato di relazioni spaziali rispetto ai normali e ai bambini con lesione emisferica sinistra. Ad esempio, bambini di 2-3 anni con lesione destra sono in grado di sovrapporre cubi o porre un oggetto all'interno di un altro, ma non riescono ad accostare due cubi tra loro per estendere le loro costruzioni nello spazio. Questo tipo di compito è svolto invece correttamente da bambini normali e da bambini con lesione sinistra già all'età di 24 mesi.

I bambini con lesione destra, mostrano di comprendere relazioni tra classi diverse. Il loro deficit è piuttosto funzione della loro difficoltà a cogliere le relazioni spaziali.

Deficit nell'analisi spaziale sono stati evidenziati anche in bambini con lesione emisferica sinistra. Bambini di 3 anni con lesione sinistra producono, in un gioco con blocchi, costruzioni mediamente più semplici di coetanei normali [17, 18]. A 4-5 anni bambini con lesione sinistra eseguono costruzioni adeguate ai loro controlli per correttezza, ma utilizzano procedure più semplici; alla stessa età bambini con lesione emisferica destra eseguono modelli meno corretti e mediante processi più semplici. Ancora a 5-6 anni di età bambini con lesione (sinistra o destra) eseguono costruzioni adeguate ai loro controlli per correttezza, ma, a differenza di questi ultimi, impiegano procedure di esecuzione mediamente più semplici.

I bambini con un danno emisferico precoce mostrano destini evolutivi molto diversi a seconda della sede della loro lesione: i bambini con una compromissione del lato sinistro mostrano alcune difficoltà piuttosto modeste che non sembrano incidere sullo sviluppo delle capacità di integrazione spaziale. Viceversa, i bambini con una lesione a carico dell'emisfero destro mostrano uno sviluppo più lento e qualitativamente diverso da quello osservabile in coetanei normali caratterizzato, comunque, anche dalla produzione di configurazioni spaziali complesse, ma poco ordinate e con gli elementi costitutivi mal integrati tra loro.

Riassumendo, mentre i bambini con lesione sinistra mostrano difficoltà nel codificare un set di elementi presentati visivamente ovvero nel cogliere le componenti costitutive dello stimolo (analisi), i bambini con lesione destra hanno maggiori difficoltà nell'integrazione di questi elementi per formare un insieme coerente (integrazione).

È interessante notare che questo profilo di comportamento è indipendente dalla estensione della lesione e, in particolare, dalla sua localizzazione in sede corticale o sottocorticale. Vicari *et al.* [19], infatti, hanno dimostrato profili paragonabili in bambini con lesione corticale e in lesione sottocorticale, suggerendo così una maggiore rilevanza del lato della lesione piuttosto che della sua estensione.

Il linguaggio

Molti dei lavori presenti in letteratura sugli effetti determinati da lesioni cerebrali focali acquisite precocemente sullo sviluppo cognitivo affrontano specificatamente le caratteristiche del linguaggio. Come abbiamo avuto modo di vedere, molti dei risultati riportati sono però spesso tra loro contraddittori. Infatti, mentre alcuni studi non documentano alcun deficit nel processamento del linguaggio, altri evidenziano difficoltà più o meno persistenti nel tempo. È importante notare come tali deficit, qualora presenti, non sembrano corrispondere a quanto osservabile in adulti con lesioni in territori cerebrali simili: ancora una volta, gli effetti provocati da una lesione cerebrale sono diversi a seconda dell'età in cui questa si verifica. In particolare, alcuni autori segnalano come bambini con lesione emisferica precoce destra possano presentare difficoltà in comprensione lessicale, mentre bambini con lesione delle aree corticali posteriori dell'emisfero sinistro presentano spesso un deficit in produzione lessicale. Inoltre, tali deficit sono più evidenti in età precoci e divengono via via, nel corso dello sviluppo, meno evidenti (per una rassegna sull'argomento vedi [20]). Sulla base di queste osservazioni, quindi, una lesione emisferica sinistra potrebbe provocare un iniziale ritardo di acquisizione del linguaggio e, successivamente, altre aree cerebrali, non coinvolte dall'evento lesionale, potrebbero mediare le funzioni linguistiche normalmente processate dalle aree danneggiate. La valutazione delle prime fasi di acquisizione del linguaggio diviene così di fondamentale importanza per poter comprendere il ruolo di ciascun emisfero nel processamento del linguaggio ed il contributo della plasticità cerebrale nei processi di recupero post-lesionali.

Gli studi condotti in tal senso sono, però, al momento, molto pochi. Recentemente abbiamo realizzato una ricerca il cui scopo è stato proprio quello di verificare il ruolo svolto dai due emisferi nelle prime fasi di sviluppo del linguaggio. A tal fine abbiamo analizzato lo sviluppo lessicale di un ampio gruppo di bambini con lesione emisferica precoce. Lo studio rappresenta una collaborazione tra due laboratori di ricerca, Santa Marinella (Ospedale Pediatrico Bambino Gesù), e Pisa (Istituto Stella Maris). Il campione sperimentale è costituito da 43 bambini (27 maschi, 16 femmine) 20 con lesione emisferica destra, 23 con lesione emisferica sinistra, selezionati secondo i seguenti criteri di inclusione:

- lesione cerebrale unilaterale precoce (insorta entro i primi sei mesi di vita) e di natura vascolare confermata da un esame neuroradiologico (TAC o RMN);
- assenza di epilessia grave o di trattamento prolungato con farmaci antiepilettici;
- anamnesi negativa per anossia perinatale e per infezioni a carico del SNC.

Tutti i bambini sono stati colpiti da una lesione cerebrale focale incorsa in epoca prenatale od entro i primi sei mesi di vita.

Lo sviluppo comunicativo e linguistico dei bambini è stato valutato proponendo ai genitori dei bambini inclusi nello studio il Primo Vocabolario del Bambino PVB [21], versione italiana del Questionario MacArthur, caratterizzato da due forme:

- la forma 1 (gesti e parole), per bambino dagli 8 ai 17 mesi che è costituita da una lista di 408 parole suddivise in 19 categorie comprendenti nomi, predicati e funtori; e da una lista di 63 gesti. Per quanto riguarda le parole i genitori debbono segnare sia quelle che il bambino comprende sia quelle che dice. Relativamente ai gesti vengono indicati solamente quelli che il bambino utilizza;

- la forma 2 (parole e frasi), per bambini dai 18 ai 30 mesi, è costituita da una lista di 670 parole divise in 23 categorie ed i genitori devono segnare quelle che il bambino produce. In questa seconda forma vi è anche una parte dedicata all'utilizzo del singolare e del plurale dei nomi, dei verbi e degli aggettivi. Infine vi è una parte in cui vengono presentate 37 coppie di frasi. Ciascuna comprende una frase completa ed il genitore dovrà segnare quella che più assomiglia alla produzione del proprio bambino. Questa parte è utile per la valutazione del diverso grado di complessità morfologica e sintattica prodotta dai bambini.

Nel consegnare una delle due forme ai genitori abbiamo scelto di seguire un criterio per sviluppo linguistico, piuttosto che un criterio di età: così, è stata consegnata la forma 1 ai genitori dei bambini in grado di produrre almeno qualche parola e la forma 2 ai genitori dei bambini in grado di produrre una combinazione di parole o una piccola frase. Seguendo questa procedura, 12 bambini con lesione sinistra hanno ricevuto la forma 1 (età media = 23,5 mesi, range da 16 a 33 mesi) e 11 la forma 2 (età media = 32 mesi, range da 24 a 42 mesi) del questionario; 11 bambini con lesione destra hanno ricevuto la forma 1 (età media = 24,5 mesi, range da 13 a 36 mesi) e 9 la forma 2 (età media = 34,6 mesi, range da 24 a 46 mesi). Le età dei bambini non differiscono statisticamente, cioè i bambini sono simili per età cronologica, $F(1,18) = 0,38$.

I risultati ottenuti consentono una valutazione della comprensione e della produzione lessicale del campione selezionato.

Comprensione lessicale

Sono state prese in considerazione le parole comprese dai bambini con lesione destra e sinistra nella forma 1 del questionario (gesti e parole). E' stata condotta una ANOVA ad una via, con il numero di parole prodotte come variabile indipendente e la sede della lesione come variabile dipendente. I dati mostrano che i bambini lesi

sinistri comprendono un numero minore di parole rispetto ai loro coetanei con lesione destra, ma non si rileva una differenza significativa, $F(1,21) = 1,36$, tra il numero medio di parole comprese dai bambini con lesione sinistra (14,4, DS = 2,7) e quelle comprese dai bambini con lesione destra (15,7, DS = 2,9).

Produzione lessicale

I risultati ottenuti documentano, innanzitutto, un ritardo nella produzione lessicale in entrambi i gruppi.

La Fig. 1 mostra le prestazioni di ciascun bambino in riferimento ai valori normativi del PVB. Come è evidente, ad eccezione di tre bambini con lesione destra ed altrettanti con lesione sinistra, i bambini inclusi nel nostro studio mostrano una produzione lessicale inferiore a quella attesa sulla base dell'età cronologica.

Le due forme del questionario contengono liste diverse di parole; per questo motivo sono state condotte due ANOVA ad una via, una per le parole prodotte nella forma 1 ed una per le parole prodotte nella forma 2. Per entrambe le analisi, la sede della lesione costituiva la variabile indipendente ed il numero medio di parole prodotte la variabile dipendente.

Forma gesti e parole. - L'analisi statistica ha evidenziato una differenza significativa tra la media di parole prodotte dai bambini con lesione sinistra rispetto ai bambini con lesione destra, $F(1,21) = 7,48$, $p < 0,05$; i bambini con lesione sinistra producono meno parole (3,24, ds = 2,41) dei bambini con lesione destra (7,65, ds = 4,9).

Forma parole e frasi. - In questo caso, l'analisi statistica non evidenzia più una differenza significativa tra i due gruppi, $F(1,18) = 2,53$. Alle età considerate (32-34 mesi) i bambini con lesione sinistra producono un numero maggiore di parole (18,93, ds = 5,9) rispetto ai loro coetanei con lesione destra (14,99, ds = 4,96).

I nostri dati sembrano confermare il ruolo fondamentale svolto dall'emisfero sinistro nelle prime fasi dell'acquisizione del lessico: i bambini lesi sinistri producono meno parole dei coetanei con lesione emisferica destra. Allo stesso tempo i risultati descritti evidenziano un certo recupero, nel tempo, nella produzione lessicale dei bambini con lesione sinistra. E' stata condotta una ANOVA a due vie per evidenziare questo recupero. Le variabili indipendenti sono costituite dal numero medio di parole prodotte nelle due forme del questionario, la sede della lesione è la variabile dipendente. I risultati evidenziano una interazione significativa: i due gruppi non hanno, nel tempo, lo stesso andamento. Ad età precoci (23-24 mesi), i bambini con lesione sinistra partono svantaggiati rispetto ai bambini con lesione destra, ma poi sembrano recuperare e superare, tra i 32-34 mesi, i loro coetanei, nel numero di parole prodotte (Fig. 2).

Alla luce dei risultati riportati, i bambini con lesione cerebrale focale (destra o sinistra) mostrano un ritardo nella acquisizione del lessico (almeno nelle età esplorate). Inoltre, i bambini con lesione a carico

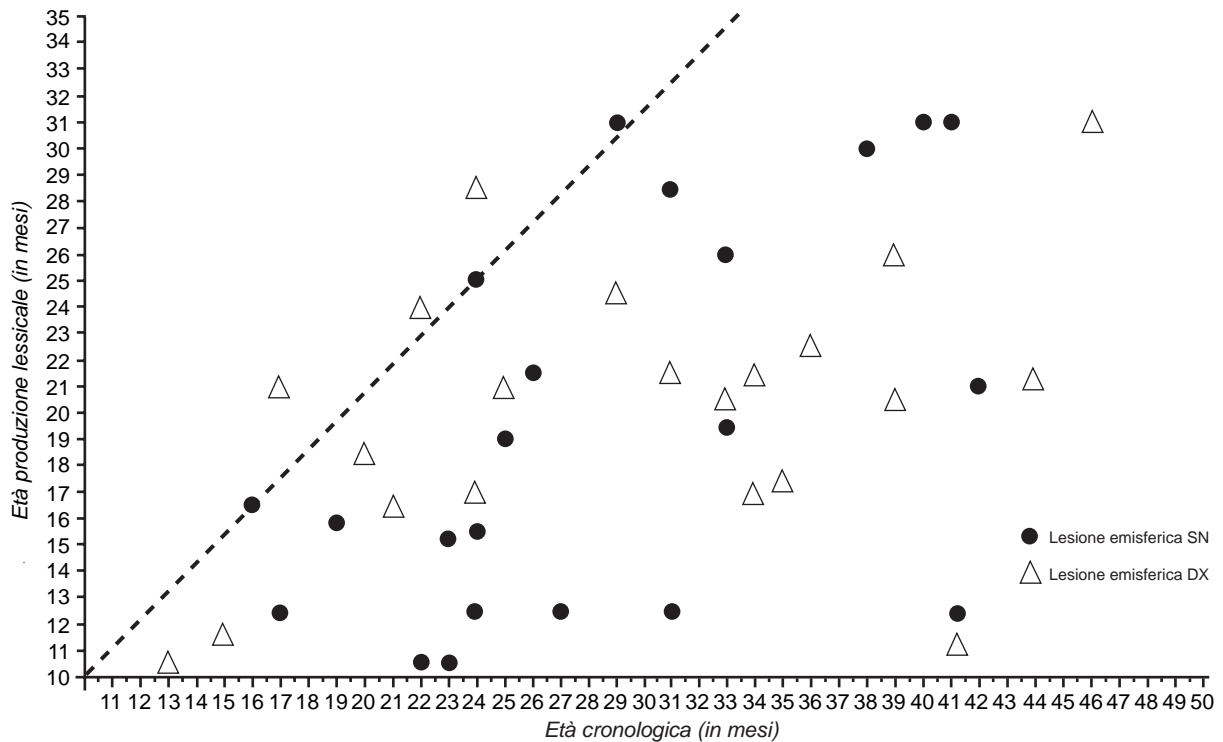


Fig. 1. - Età di produzione lessicale in rapporto all'età cronologica dei bambini con lesione emisferica precoce.

dell'emisfero sinistro con età di 23-24 mesi mostrano, rispetto ai coetanei con danno controlaterale, difficoltà nella comprensione lessicale e producono un numero significativamente minore di parole. Questo pattern, però, non è più evidenziabile per età maggiori (32-34 mesi).

I nostri dati sembrano confermare il ruolo principale svolto dall'emisfero sinistro nell'acquisizione del lessico (in fase precoce) ed il ruolo della plasticità cerebrale per un recupero, nel tempo, di tale abilità. Allo stesso tempo i risultati descritti suggeriscono un coinvolgimento dell'emisfero destro nell'acquisizione del lessico (almeno in fasi meno precoci di sviluppo).

Conclusioni

I dati della letteratura ed i risultati di alcuni recenti lavori sembrano indicare come anche lesioni emisferiche limitate ed acquisite molto precocemente determinino effetti più o meno rilevanti sullo sviluppo cognitivo e, in particolare, sui tempi di acquisizione di alcune competenze. Queste osservazioni forniscono un importante sostegno all'ipotesi di una specializzazione funzionale dei due emisferi cerebrali presente già nelle primissime fasi dello sviluppo e, quindi, con tutta probabilità, frutto di una programmazione geneticamente determinata. Ciò nonostante, gli effetti negativi determinati da lesioni cerebrali acquisite molto precocemente sullo sviluppo cognitivo, si riducono nel corso della crescita. Questa seconda osservazione, fornisce sostegno

all'ipotesi della plasticità cerebrale ed ai suoi possibili meccanismi di compenso. Resta difficile da definire se questa sorta di attività riparatrice possa assolvere in pieno il suo compito o se modesti deficit nel funzionamento e processamento di compiti cognitivi siano sempre osservabili nel corso dello sviluppo. Molte recenti osservazioni sembrano propendere per questa seconda possibilità (si veda [20] per una revisione).

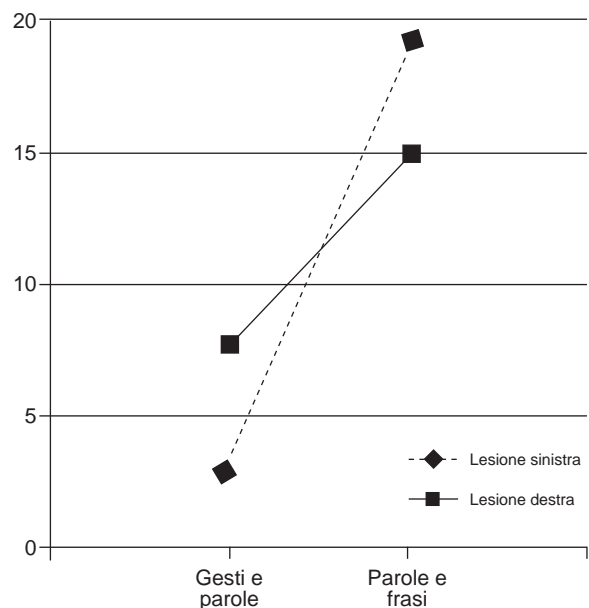


Fig. 2. - Prestazioni ottenute nel Primo Vocabolario del Bambino, dai bambini con lesione emisferica precoce.

I bambini con lesione cerebrale focale giungono ai servizi territoriali per il loro disturbo motorio (emiparesi spastica controlaterale alla sede della lesione) e, per tale motivo, svolgono frequentemente terapia riabilitativa motoria fin dai primi mesi di vita. Quanto da noi segnalato dimostra, però, che questi bambini sono anche a rischio per un ritardo di linguaggio e difficoltà nell'analisi visuo-spaziale. Una attenta valutazione neuropsicologica deve essere quindi raccomandata agli operatori che hanno in cura questi bambini anche quando esami psicometrici (ad es. il QI) dovessero risultare nella norma. E' stato, infatti, ampiamente documentato come le difficoltà cognitive che questi bambini spesso presentano si associano per lo più a livelli di QI normali. Una diagnosi precoce di eventuali difficoltà cognitive, anche in questi bambini, consente la realizzazione di un intervento riabilitativo specifico che può rivelarsi decisivo nell'evitare la cronicizzazione del disturbo (o dei disturbi) e la comparsa di difficoltà più gravi di fronte a richieste più complesse (come ad esempio con l'inserimento nella scuola elementare).

Ringraziamenti

L'autore desidera ringraziare i colleghi, Anna Maria Chilosi, Paola Cipriani e Giovanni Cioni con cui lo studio riferito è stato realizzato. Parte dei dati riferiti sono stati recentemente pubblicati [22].

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 19 luglio 2001.

BIBLIOGRAFIA

- Vargha-Khadem F, Isaacs E, Muter VA. Review of cognitive outcome after unilateral lesion sustained during childhood. *J Child Neurol* 1994;9:2S67-73.
- Kennard M. Age and other factors in motor recovery from pre-central lesions in monkeys. *Am J Physiol* 1936;115:138-46.
- Lenneberg EH. *Biological foundations of language*. New York: Wiley; 1967.
- Basser L. Hemiplegia of early onset and the faculty of speech with special reference to the effects of hemispherectomy. *Brain* 1962;85:427-60.
- Kinsbourne M. The development of cerebral dominance. In: Filskov SB, Bol TJ (Ed.). *Hand Clin Neuropsychol*. New York: Wiley; 1988. p. 399-417.
- Vargha-Khadem F, O'Gorman A, Watters G. Aphasia and handedness in relation to hemispheric side, age at injury and severity of cerebral lesions during childhood. *Brain* 1985;108:677-96.
- Riva D, Cazzaniga L. Late effects of unilateral brain lesions sustained before and after age one. *Neuropsychol* 1986;24:423-8.
- Aram DM. Language sequelae of unilateral brain lesions in children. In: Plum F (Ed.). *Language, communication and the brain*. New York: Raven; 1988; p. 171-97.
- Stiles-Davis J. Spatial dysfunction in young children with right cerebral hemisphere injury. In: Stiles-Davis J, Kritchevsky M, Bellugi U (Ed.). *Spatial cognition: brain bases and development*. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum; 1988. p. 251-72.
- Thal D, Marchman VA, Stiles J, Aram D, Trauner D, Nass R, Bates E. Early lexical development in children with focal brain injury. *Brain Language* 1991;40:491-527.
- Woods B, Teuber H. Early onset of complementary specialization of the cerebral hemispheres in man. *Trans Am Neurol Ass* 1973; 98:113-7.
- Hecaen H. Acquired aphasia in children and the ontogenesis of hemispheric functional specialization. *Brain and Language* 1976; 3:114-34.
- Woods B, Carey S. Language deficits after apparent clinical recovery from childhood aphasia. *Ann Neurol* 1979;6:405-9.
- Aram DM, Ekelman B, Whitaker H. Lexical retrieval in left- and right-brain-lesioned children. *Brain and Language* 1987;28:61-87.
- Satz P, Strauss E, Whitaker H. The ontogeny of hemispheric specialization: some hold hypotheses revisited. *Brain and Language* 1990;38:596-614.
- Sugarman S. Developmental change in early representational intelligence: evidence from spatial classification strategies. *Cognitive Psychol* 1982;14:410-49.
- Stiles J, Nass R. Spatial grouping activity in young children with congenital right or left hemisphere brain injury. *Brain and Cognition* 1991;15(2):201-22.
- Stiles J, Stern C, Trauner D, Nass R. Developmental change in spatial grouping activity among children with early focal brain injury: evidence from a modeling task. *Brain and Cognition* 1996; 31:46-62.
- Vicari S, Stiles J, Stern C, Resca A. Spatial grouping activity in children with early cortical and subcortical lesions. *Develop Med Child Neurol* 1998;40:90-4.
- Bates E, Vicari S, Trauner D. Neural mediation of language development: perspectives from lesion studies of infants and children. In: Tager-Flusberg H. (Ed.). *Neurodevelopmental Dis* Cambridge: MIT Press; 1999. p. 533-81.
- Caselli MC, Casadio P. *Il primo vocabolario del bambino: guida all'uso del questionario MacArthur per la valutazione della comunicazione e del linguaggio nei primi anni di vita*. Milano: Franco Angeli; 1995.
- Vicari S, Albertoni A, Chilosi AM, Cipriani P, Cioni G, Bates E. Plasticity and reorganization during language development in children with early brain injury. *Cortex* 2000;36:31-46.
- Woods BT. The restricted effects of right-hemisphere lesions after age one: Wechsler test data. *Neuropsychology* 1980;18:65-70.
- Riva D, Cazzaniga L, Pantaleoni C, Milani N, Fedrizzi E. Acute hemiplegia in childhood: the neuropsychological prognosis. *J Pediatr Neurosci* 1986;2:4-10.
- Nass R, Peterson HC, Koch D. Differential effects of congenital left and right brain injury on intelligence. *Brain and cognition* 1989;9:258-66.

26. Banich TM, Levine SC, Huttenlocher PR. The effects of developmental factors on IQ in hemiplegic children. *Neuropsychol* 1990;28:35-47.
27. Vargha-Khadem F, Isaacs E, Van der Werf S, Robb S, Wilson J. Development of intelligence and memory in children with hemiplegic cerebral palsy: The deleterious consequences of early seizures. *Brain* 1992;115:315-29.
28. Vicari S, Resca A, Vizzotto A, Albertini G. *Lesioni cerebrali unilaterali ad insorgenza precoce: aspetti neuropsicologici evolutivi*. Roma: Phoenix Editrice 1994; 2.

Effetti dei fattori socio-ambientali sugli esiti neurocognitivi in età prescolare dei bambini con prematurità o basso peso alla nascita

Flavia CHIAROTTI (a), Anna Maria CASTIGNANI (b), Maria PUOPOLO (a), Francesca MENNITI-IPPOLITO (c), Elena MINNITI DE SIMEONIBUS (b) e Ambrogio DI PAOLO (b)

(a) Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e di Sistema, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Cattedra di Neonatologia, Università degli Studi "Tor Vergata", Roma

(c) Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - I neonati gravemente pretermine (età gestazionale \leq 32 settimane) e/o *very low birth weight* (VLBW, con peso alla nascita \leq 1500 g) costituiscono oggi il 2% di tutti i nati con un'incidenza destinata ad aumentare con l'aumentare delle gestazioni multiple e delle gravidanze in età avanzata. Tali bambini possono presentare deficit neurologici maggiori (6-10% dei casi), ma spesso riportano disabilità minori (disturbi dell'attenzione e iperattività, deficit di apprendimento e di interazione sociale, problemi dello sviluppo motorio) di difficile diagnosi, spesso riconosciute solo in età prescolare o scolare. Viene riportata una rassegna delle conoscenze attuali sulla valutazione di fattori potenzialmente di rischio per i disturbi dello sviluppo neurocognitivo in età prescolare e per lo stress emotivo postnatale materno, e delle loro inter-relazioni.

Parole chiave: prematurità alla nascita, basso peso alla nascita, sviluppo neurocognitivo, fattori socio-ambientali.

Summary (*Effects of social and environmental factors on neurocognitive performances of pre-school children born premature or very low birth weight*). - Severely preterm neonates (gestational age \leq 32 weeks) and/or very low birth weight (VLBW, with weight at birth \leq 1500 g) are 2% of all newborns, with a rising incidence due to the increase of multiple gestations and of pregnancies at advanced age. These neonates may be affected by severe neurological pathologies (6-10% of cases), but they often have minor disabilities (such as distractibility, hyperactivity, learning and social competence disabilities, deficit of motor development) difficult to be early diagnosed, and frequently recognized only at pre-school or school age. A review of the current knowledge about the effects of potential risk factors responsible for deficits of neurocognitive development in pre-school age and for postnatal distress of mothers, and their inter-correlations, is reported.

Parole chiave: premature birth, very low birth weight, cognitive development, social and environmental factors.

Introduzione

I continui progressi nell'assistenza al neonato gravemente pretermine (età gestazionale \leq 32 settimane) e/o *very low birth weight* (VLBW, con peso alla nascita \leq 1500 g) hanno prodotto un aumento notevole nei tassi di sopravvivenza. Tali neonati sono meno del 2% di tutti i nati [1] e la loro incidenza è in aumento con l'aumentare delle gestazioni multiple e di quelle in donne in età avanzata. Tuttavia, se la mortalità di questi neonati è diminuita, resta ancora molto elevata l'incidenza di esiti neurologici. I bambini nati pretermine e/o VLBW costituiscono infatti una grossa parte dei bambini con deficit neurologici maggiori; in particolare, l'incidenza di paralisi cerebrale nei neonati di peso molto basso varia dal 6 al 10% e il 40% dei pazienti con paralisi cerebrale aveva un basso peso alla nascita [2, 3]. Questo dato, secondo alcuni autori, è in aumento, essendo propor-

zionalmente molto aumentato il numero dei bambini con più basso peso che riesce a sopravvivere grazie all'assistenza sempre più perfezionata. Altre sequele importanti della prematurità e/o basso peso sono i deficit sensoriali della vista e, meno frequentemente, dell'udito: entrambi possono incidere pesantemente sullo sviluppo del bambino, provocando ritardo dello sviluppo psicomotorio e del linguaggio e aumentando il rischio psicopatologico. Oltre a questi esiti, definiti maggiori, sono riportati in letteratura disturbi di sviluppo cosiddetti minori, per i quali non sembrano esservi correlazioni significative con la patologia in epoca neonatale. Ad eziologia ancora poco chiara ma presumibilmente multifattoriale (organica, psichica e relazionale), i disturbi di sviluppo si concretizzano in problemi dello sviluppo motorio, dell'apprendimento e del comportamento. I numerosi studi di follow up, ormai disponibili in letteratura, sono generalmente centrati sul versante

cognitivo dello sviluppo; negli ultimi anni, altri studi si sono proposti di valutare in che modo la nascita prematura possa influenzare lo sviluppo dell'organizzazione della vita mentale del bambino. Pur essendo i risultati di questi studi poco standardizzabili e generalizzabili (date le notevoli difficoltà metodologiche), essi sembrano segnalare in modo unanime che "... i bambini nati pretermine mostrano di avere difficoltà più o meno intense un po' in tutte le aree di sviluppo", particolarmente nel campo dell'alimentazione, dei ritmi sonno-veglia, dell'organizzazione motoria e dello sviluppo e utilizzazione del linguaggio pur senza presentare quadri patologici chiari [4].

La maggior parte dei deficit di sviluppo gravi viene diagnosticata entro il primo anno di vita del bambino, mentre il riconoscimento delle disabilità minori sia motorie che di carattere cognitivo resta difficile e spesso avviene solo in età prescolare o scolare. In particolare, i disturbi dell'attenzione e l'iperattività, i deficit di apprendimento e di interazione sociale possono risultare evidenti solo quando i bambini fanno il loro ingresso nella scuola e il confronto con i coetanei rende manifesti a genitori ed insegnanti comportamenti e *performances* inadeguati [5]. L'associazione tra il basso peso alla nascita (pretermine o a termine che sia) e un minor successo scolastico, misurata come incidenza di bocciature durante il corso normale di studi o come necessità di ricorrere a corsi speciali di istruzione, è dimostrata in ricerche condotte da sociologi [6] e psicologi [7, 8] statunitensi. Il ritardo nella diagnosi delle disabilità minori può comportare la mancata o la non tempestiva adozione di eventuali interventi terapeutici quali strategie di supporto psicopedagogico, di *counselling* familiare e, nei casi più marcati, di terapie riabilitative mirate a migliorare le *performances* maggiormente compromesse.

Il *counselling* familiare può essere di grande aiuto anche per prevenire o almeno mitigare lo stress emotivo postnatale materno che, secondo alcuni autori, colpisce circa il 28% delle madri di neonati ad alto rischio, contro il 10% circa delle madri di neonati normali [9]. Anche i padri di neonati ad alto rischio sono soggetti a tale tipo di stress, sebbene con una minore incidenza rispetto alle madri [10-12]. Lo stress emotivo postnatale dei genitori può essere a sua volta associato ai disturbi comportamentali e allo sviluppo cognitivo del bambino, insieme ad altri fattori legati ai genitori, sia di natura ereditaria sia di carattere educativo [13]. Le difficoltà emotive della madre e l'evoluzione difettosa del processo di attaccamento possono tradursi in rifiuto e aggressività verso il figlio [14]. E' ormai riconosciuta l'utilità nei centri di terapia intensiva neonatale di figure professionali come lo psicologo o il neuropsichiatra infantile che svolgano un lavoro di formazione degli operatori e di sostegno ai genitori dei neonati pretermine per evitare in loro lo sviluppo di percezioni alterate nei

riguardi del figlio e aiutarli invece a ricostruire la propria relazione con lui [15, 16].

Per verificare quanto sia stato finora fatto nell'individuazione e nella valutazione di fattori potenzialmente di rischio sullo sviluppo neurocognitivo in età prescolare (3-5 anni), diamo nel seguito una breve rassegna critica dei principali studi che sono stati condotti per l'individuazione di criteri predittivi o diagnostici precoci delle disabilità minori del neonato pretermine e/o VLBW e dello stress emotivo postnatale materno. Verranno esaminati i risultati cui si è pervenuti nella valutazione del ruolo di fattori relativi alle condizioni alla nascita (ad esempio settimana gestazionale, peso, parametri fisiologici e biochimici, danno ipossico con relativa gravità, trattamenti perinatali) e alla fase di terapia intensiva postnatale (ad esempio andamento dei parametri fisiologici e biochimici, necessità, durata e modalità di ventilazione meccanica, trattamenti, manipolazioni, presenza e durata di infezioni, tasso di crescita corporea, durata della permanenza in incubatrice). Un particolare rilievo verrà infine dato alla valutazione del ruolo di fattori relativi all'aspetto socio-ambientale, come le caratteristiche socio-demografiche della famiglia, la frequenza e tipologia di interazioni sociali, la presenza di stress emotivo postnatale materno, la composizione familiare e l'emotività della famiglia allargata.

Metodi utilizzati

E' stata condotta una revisione dei lavori pubblicati su riviste specializzate negli ultimi anni riguardanti l'influenza di diversi fattori sugli esiti neurocognitivi in età prescolare nel bambino nato pretermine e/o con basso peso alla nascita.

Diversi test sono stati utilizzati, e sono tuttora utilizzati, in diverse parti del mondo per la valutazione degli effetti di fattori neurologici e socio-ambientali sullo sviluppo cognitivo dei bambini. I diversi test sono selezionati in funzione del particolare aspetto dello sviluppo che viene studiato, e dell'età del bambino alla quale lo sviluppo stesso è valutato. La Tab. 1 riporta la lista dei test valutati nei lavori considerati in questa rassegna.

Stato dell'arte

Studi fino ad oggi condotti su neonati pretermine e/o a termine, con peso ridotto o appropriato per l'età gestazionale, senza disabilità maggiori, hanno evidenziato l'effetto di diversi fattori sullo sviluppo cognitivo e comportamentale in età prescolare e scolare.

I risultati presentati non sempre sono concordanti, in particolare per quanto riguarda la reale importanza, sul normale sviluppo cognitivo e comportamentale, dei

Tabella 1. - Test condotti sui bambini e/o sui genitori

Test	Tipo di valutazione	Rif. bibl.
Relativi ai bambini		
APGAR	Performance neonatale	[17]
Neonatal Medical Index (NMI)	Condizioni neonatali (basato su peso alla nascita, necessità e durata della ventilazione assistita, necessità e uso di farmaci o di chirurgia, presenza di problemi cerebrali)	[18]
Bayley Scales	Sviluppo cognitivo e motorio (condotto a 12 e 24 mesi)	[18-20]
Stanford-Binet	Sviluppo cognitivo (condotto a 3 anni)	[18, 19]
McCarthy Scales of Children's Abilities (MSCA)	Abilità cognitive e verbali, spaziali, di memoria e motorie (condotto a 2 _{1/2} -8 _{1/2} anni)	[5, 21]
WPPSI-R IQ	Livello intellettivo	[13]
General Intellectual Index (GII)	Indice intellettivo generale	[22]
Osservazione del gioco e delle interazioni sociali	Competenze sociali (condotto a 38 mesi)	[19]
Child Behavior Checklist (CBCL)	Competenze sociali e disturbi del comportamento (condotto a 2-3 anni o a 7-10 anni)	[5, 21]
Tester's Rating of Child Behaviour (TRCB)	Comportamenti di approccio/evitamento, attività, distraibilità, cooperatività	[21]
Behavior Screening Questionnaire (BSQ)	Problemi comportamentali in età pre-scolare	[23]
Teacher's Report Form (TRF)	Risultati scolastici (mediante intervista agli insegnanti all'età di 7-10 anni)	[5]
Relativi ai genitori		
Mother-Child Relationship Evaluation (MCRE)	Atteggiamento materno	[23]
Raven progressive matrices	Abilità materna nel risolvere problemi non verbali	[13]
Child Rearing Practices Report (CRPR)	Attitudine materna ad allevare il bambino	[13]
Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS)	Livello intellettivo dei genitori	[21]
Inventory of Parents Experiences (IPE)	Grado di soddisfazione materna per il supporto sociale	[13]
Symptom Check List Revised (SCL-90-R)	Grado di stress psicologico materno	[9, 13]
HOME inventory for families	Qualità dell'ambiente domestico del bambino (fisico, sociale e culturale)	[21]
GESU	Strategie di insegnamento e di controllo delle madri sul bambino	[21]
Golombok-Rust Inventory of Marital Status (GRIMS)	Qualità della relazione con il marito	[21]
Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS)	Depressione materna	[24]
Standardized Psychiatric Interview (SPI)	Depressione materna	[24]
Parental Stressor Scale	Stress psicologico delle madri	[9]

diversi fattori esaminati, sia quelli legati allo sviluppo intra-uterino e/o alle condizioni neurologiche neonatali, sia quelli relativi al livello socio-economico della famiglia, all'ambiente di sviluppo e di crescita del bambino, alle interazioni e all'educazione genitoriale.

In particolare, i fattori relativi allo sviluppo intra-uterino e alle condizioni neurologiche neonatali sembrano essere essenzialmente legati a deficit cognitivi e di apprendimento [25], seppure con differenze temporali evidenziate nei fattori potenzialmente dannosi: fase precoce della gravidanza per l'handicap neurologico; seconda metà della gravidanza e primi due anni di vita del bambino per le disfunzioni neurologiche minori [26]. I fattori di tipo sociodemografico sembrano acquistare maggior rilievo nella predizione di deficit cognitivi a partire dal secondo anno di vita del bambino, in particolare nei neonati di più alto peso alla nascita, meno colpiti da complicanze mediche perinatali e meno soggetti ad eventuali effetti di lunga durata di tali complicanze rispetto ai neonati di più basso peso alla nascita [18]. Più in generale, i diversi autori sembrano concordare sul fatto che l'alta incidenza di problemi comportamentali nei bambini nati pretermine (spesso già evidenziabile dall'analisi di questionari somministrati ai genitori, *child behaviour checklist*) sia maggiormente correlabile con fattori ambientali, come il ceto di appartenenza e l'atteggiamento della madre nel primo anno di vita del bambino, e sia solo marginalmente in relazione a danni neurologici minori, tranne che per i bambini di bassissimo peso alla nascita [27].

L'importanza sulla prognosi del bambino di alcuni indici di *performance* neonatale (come l'Apgar), legati esclusivamente alle complicanze mediche e allo stato di salute e reattività del neonato nelle primissime fasi di vita postnatale, sono ancora oggetto di discussione [17]. Sono stati sviluppati altri indicatori, come ad esempio il neonatal medical index (NMI), basato su informazioni facilmente ricavabili dalle schede cliniche e dagli esami di routine cui i neonati prematuri vengono sottoposti nel periodo neonatale precoce. In particolare, l'NMI si basa sul peso alla nascita, sulla necessità e durata della ventilazione assistita, sulla necessità di uso di farmaci o di chirurgia per correggere disfunzioni o malformazioni, sulla presenza di problemi cerebrali (meningite, convulsioni, emorragia periventricolare o intraventricolare, leucomalacia periventricolare). Tale indice è risultato predittivo dello sviluppo cognitivo dei bambini con peso alla nascita inferiore o uguale a 1500 g [18].

Deficit di attenzione e cognitivi sembrano essere potenziati da disturbi comportamentali [5]. Entrambi sembrano associati a disturbi nelle interazioni precoci madre-figlio, più frequenti in caso di depressione postnatale materna e/o di condizioni sociali difficili (così come percepite e valutate dalla madre), concernenti ad esempio gravidanza e parto, salute del neonato, rapporti con il partner, con la propria madre e con gli altri membri

della famiglia, stato sanitario ed economico della famiglia, condizioni legate all'abitazione, all'impiego, a problemi legali e ad altro [24].

Trattamenti riabilitativi precoci, comprendenti l'educazione psicomotoria del bambino e il *counselling* con coinvolgimento nelle pratiche psicomotorie del nucleo familiare, sembrano migliorare la qualità dello sviluppo successivo nei neonati pretermine ad alto rischio. Essi non sembrano però raggiungere lo stesso livello di sviluppo neurologico e comportamentale dei controlli a termine: ciò da una parte può dipendere da una limitata efficacia del trattamento riabilitativo precoce, dall'altra può implicare la necessità di usare diversi valori normativi per la valutazione della risposta nei pretermine [28].

Alcuni lavori [29-31] hanno dimostrato l'importanza di trattamenti per la riduzione dello stress postnatale familiare, soprattutto materno, che può derivare sia dal ricovero del neonato pretermine nella terapia intensiva neonatale, con le terapie invasive che la situazione inevitabilmente comporta, sia, più in generale, dalle condizioni di salute del bambino [9-11, 29, 32-34]. In particolare, uno studio condotto su genitori di bambini con diverso tipo e grado di disabilità (sindrome di Down, malattia cardiaca congenita, labbro leporino e/o palatoschisi, nessuna disabilità), ha evidenziato che lo stress genitoriale è fortemente influenzato dalla severità della disabilità del bambino, e dalla sua eventuale cronicità. La mancanza della prospettiva di un futuro miglioramento e/o guarigione dalla disabilità rende più difficile l'accettazione e la gestione della disabilità stessa da parte dei genitori [12]. In generale, sembra emergere un maggior carico di stress nelle madri rispetto ai padri [10-12]; lo stress psicologico nelle madri sembra influenzato, oltre che dallo stato di salute del bambino, da fattori socio-economici, come una insoddisfacente relazione di coppia (in particolare, per la presenza di conflitti nella divisione dei compiti familiari), la mancanza di un confidente da cui ricevere appoggio psicologico, le preoccupazioni di tipo finanziario. Tali fattori sembrano essere importanti predittori di depressione *post partum* anche nei paesi latini [35].

D'altro canto, alla maggiore suscettibilità allo stress psicologico postnatale presentata dalle madri sembra corrispondere anche un maggior livello di interazione con il bambino [36, 37], che dimostra un maggior coinvolgimento fisico ed emotivo generale da parte delle madri rispetto ai padri.

Vari studi sono stati condotti per verificare il ruolo della depressione postnatale materna e dei disturbi di interazione precoce madre-figlio sulla crescita e sul successivo sviluppo sensorimotorio e cognitivo del bambino.

In particolare, una ricerca condotta su bambini di 3 anni di età, nati pretermine o a termine, figli di madri con basso reddito, in ambiente urbano, per la valutazione

dell'associazione fra interazioni madre-figlio durante l'allattamento da un lato, e abilità cognitive (valutate con il test di Stanford-Binet) e sociali (relative sia alla competenza sia alla partecipazione sociale) dall'altro lato, ha mostrato che le interazioni precoci madre-figlio, nonostante una marcata differenza fra neonati pretermine e a termine, non predicavano né le abilità sociali né le abilità cognitive a 3 anni, che erano invece positivamente influenzate dalla maggiore responsabilità, sia sul piano emozionale sia su quello verbale, manifestata dalle madri all'età di 20 mesi del bambino. Le abilità cognitive (ma non quelle sociali) a tre anni erano inoltre negativamente influenzate dalla nascita pretermine. Tutto ciò sembra dimostrare che le interazioni precoci madre-bambino durante i primi mesi di vita possono fungere da fattore protettivo rispetto alle conseguenze a lungo termine della prematurità [19]. D'altra parte, molti studi hanno riportato difficoltà di interazione tra madre e bambino durante il primo anno di vita, interpretate come il risultato di segnali di fragilità che il bambino nato pretermine trasmette a chi si prende cura di lui rispetto al bambino a termine. Il bambino nato pretermine, inoltre, è un bambino "difficile" durante il primo anno di vita, con una autoregolazione insufficiente che conduce a disturbi del sonno e dell'alimentazione che aumentano le ansie e le preoccupazioni dei genitori [19, 38].

Al contrario, uno studio prospettico condotto sui figli di 204 madri che avevano precedentemente partecipato ad una ricerca sulla propria salute mentale durante la gravidanza e il primo anno postnatale ha mostrato che mediamente, all'età di 3 anni e 10 mesi, i figli di madri depresse durante il primo anno *post partum* si classificano circa 1 SD (deviazione standard) più in basso sui test standardizzati della capacità intellettuale raggiunta rispetto ai figli di madri non depresse, anche tenendo conto di fattori quali problemi comportamentali generali, peso alla nascita, punteggi ai test di intelligenza dei genitori, interazioni madre-figlio, allattamento al seno [21].

Analogamente, da uno studio condotto in un campione di primipare a basso rischio, sugli effetti della depressione e dell'avversione materna sulle interazioni viso a viso madre-neonato a due mesi, e sul successivo sviluppo cognitivo e attaccamento alla madre da parte del bambino, i disturbi nelle interazioni precoci madre-neonato sono risultati predittivi di un minore sviluppo cognitivo a 18 mesi. L'attaccamento del neonato è risultato non associato alla qualità delle interazioni a 2 mesi, ma associato all'avversione e alla depressione *post partum* materna [24].

Inoltre, uno studio longitudinale, condotto su 67 madri di neonati particolarmente vulnerabili alla dimissione dall'unità di terapia intensiva neonatale e a 6, 12 e 16 mesi dopo la nascita, per descrivere i fattori prognostici dell'adattabilità materna, ha mostrato che lo stress materno, misurato come sintomi depressivi utilizzando l'*Epidemiologic Studies Depression Scale*, è influenzato

dalle caratteristiche materne, dallo stress derivante dall'ambiente ospedaliero e dal livello di preoccupazione materna per la salute del neonato. Inoltre, i sintomi depressivi maggiori sono risultati tra i maggiori determinanti di un minore sviluppo del neonato, insieme al grado di coinvolgimento nel ruolo materno e alle caratteristiche della malattia del neonato [39].

Ricerche che nel follow up di bambini pretermine utilizzano oltre alla valutazione clinica altre metodologie che indagano il mondo rappresentazionale della madre in rapporto allo sviluppo del bambino e alle modalità di attaccamento, hanno segnalato una maggiore incidenza di bambini con attaccamento resistente o disorganizzato tra i nati pretermine. Il periodo critico, per il genitore che deve organizzare le sue rappresentazioni sul bambino, sembra collocarsi nei giorni in cui avvengono i primi contatti col bambino reale e influenzare l'evoluzione della relazione. E' proprio in questo periodo che andrebbe fatto il maggior lavoro con i genitori, per favorire l'instaurarsi di una soddisfacente relazione madre-bambino che, influenzando entrambi, trasformi le rappresentazioni e interazioni reciproche da potenziale circolo vizioso in efficace circolo virtuoso. Questo, del resto, costituirebbe un atto di prevenzione del rischio psicopatologico in età evolutiva [40].

Tutto ciò evidenzia l'importanza di sviluppare misure di intervento per il sostegno psicologico dei genitori, in particolare delle madri, nel periodo di ospedalizzazione e nella prima fase di rientro a casa, ai fini della riduzione dello stress legato alle condizioni di salute del bambino e del conseguente miglioramento delle interazioni genitori-figlio [41]. Tale tipo di intervento, insieme ai trattamenti riabilitativi precoci diretti al bambino, può essere di aiuto per lo sviluppo ottimale delle capacità sensomotorie, cognitive e affettive del bambino stesso, pur sempre nei limiti determinati dalle sue condizioni di salute.

Prospettive future

Alla luce di quanto detto finora, nell'ambito del progetto "Danno cerebrale ipossico/ischemico nel neonato: studi epidemiologici e sperimentali su diagnosi, terapie e recupero", è stato avviato uno studio longitudinale su una coorte di bambini pretermine (età gestazionale ≤ 32 settimane) e/o *very low birth weight* (VLBW, peso alla nascita ≤ 1500 g) senza disabilità maggiori, e di bambini di controllo nati a termine con peso alla nascita basso (*small for gestational age* SGA) o appropriato (*appropriate for gestational age* AGA), per la valutazione del ruolo prognostico di diversi fattori sullo sviluppo neurocognitivo in età prescolare (3-5 anni). L'obiettivo è l'individuazione e la definizione di programmi di intervento precoce mirati e di qualità.

In particolare, si vogliono esaminare gli effetti di fattori relativi: a) alle condizioni alla nascita (ad esempio settimana gestazionale, peso, parametri fisiologici e biochimici, danno ipossico con relativa gravità, trattamenti perinatali), b) alla fase di terapia intensiva postnatale (ad esempio andamento dei parametri fisiologici e biochimici, necessità, durata e modalità di ventilazione meccanica, trattamenti, manipolazioni, presenza e durata di infezioni, tasso di crescita corporea, durata della permanenza in incubatrice), e c) agli aspetti socio-ambientali (p.e. caratteristiche socio-demografiche della famiglia, frequenza e tipologia di interazioni sociali, presenza di stress emotivo postnatale materno, composizione della famiglia ed emotività della famiglia allargata).

Le informazioni sui fattori potenzialmente prognostici di tipo clinico verranno raccolte retrospettivamente, estraendole dalle cartelle cliniche dei bambini relative al periodo di ricovero nell'unità di terapia intensiva neonatale; le informazioni sui fattori di tipo socio-demografico, sullo stato emotivo materno relativamente ai vari momenti della vita familiare dalla nascita, al periodo di degenza nell'unità di terapia intensiva neonatale, e al periodo del rientro e accoglienza nella famiglia verranno raccolte prospettivamente, utilizzando appositi questionari e un'intervista strutturata con psicologi esperti in tale tipo di valutazione.

La valutazione dello sviluppo neurocognitivo del bambino a 3-5 anni di età, infine, verrà eseguita con test specifici dedicati per le rispettive età. In particolare, per la valutazione del livello intellettuale verrà utilizzato il test di WPPSI; per la valutazione delle abilità visuo-spaziali verrà utilizzata la "figura di Rey B" nella versione "copia" mentre nella versione "ricordo" verrà valutata la memoria di lavoro. Il *Bender visual retention test* e il *visual motor gestalt test* saranno utilizzati a completamento della valutazione visuo-spaziale.

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

- Berkowitz GS, Papiernik E. Epidemiology of preterm birth. *Epidemiol Rev* 1993;15:414-43.
- Hagberg B, Hagberg G, Olow I, van Wendt L. The changing panorama of cerebral palsy in Sweden. VII. Prevalence and origin in the birth year period 1987-90. *Acta Paediatr* 1996;85:954-60.
- Hack M. Follow up for high-risk neonates. In: Fanaroff AA, Martin RJ (Ed.). *Neonatal-perinatal medicine. Diseases of the fetus and infant*. VI ed. Saint Louis: Mosby & C.; 1997. p. 952.
- Torrioli MG. Nascere prima del tempo: un evento che coinvolge sia il corpo che la mente. In: Latmiral S, Lombardo C (Ed.). *Pensieri prematuri*. Roma: Edizioni Borla; 2000. p. 73-97.
- Langkamp DL, Brazy JE. Risk for later school problems in preterm children who do not cooperate for preschool developmental testing. *J Pediatr* 1999;135:756-60.
- Aber JL, Bennett NJ, Conley DC, Li J. The effects of poverty on child health and development. *Annu Rev Public Health* 1997;18:463-83.
- Brooks-Gunn J, McCarton C, Casey P, McCormick M, Bauer C, Bernbaum J, Tyson J, Swanson M, Bennett F, Scott D, Tonascia J, Meinert C. Early intervention in low birth weight, premature infants: Results through age 5 years from the Infant Health and Development Program. *J Am Med Assoc* 1994;272:1257-62.
- McCarton CM, Brooks-Gunn J, Wallace IF, Bauer CR, Bennett FC, Bernbaum JC, Sue Broyles R, Casey PH, McCormick MC, Scott DT, Tyson J, Tonascia J, Meinert CL. Results at age 8 years of early intervention for low-birth-weight premature infants. *J Am Med Assoc* 1997;277:126-32.
- Meyer EC, Garcia Coll CT, Seifer R, Ramos A, Kilis E, Oh W. Psychological distress in mothers of preterm infants. *J Dev Behav Pediatr* 1995;16(6):412-7.
- Miles MS, Funk SG, Kasper MA. The stress response of mothers and fathers of preterm infants. *Res Nurs Health* 1992;15(4):261-9.
- Doering LV, Dracup K, Moser D. Comparison of psychosocial adjustment of mothers and fathers of high-risk infants in the neonatal intensive care unit. *J Perinatol* 1999;19(2):132-7.
- Pelchat D, Ricard N, Bouchard JM, Perreault M, Saucier JF, Berthiaume M, Bisson J. Adaptation of parents in relation to their 6-month-old infant's type of disability. *Child Care Health Dev* 1999;25(5):377-97.
- Sommerfelt K, Andersson HW, Sonnander K, Ahlsten G, Ellersten B, Markestad T, Jacobsen G, Hoffman HJ, Bakketeig L. Cognitive development of term small for gestational age children at five years of age. *Arch Dis Child* 2000;83:25-30.
- Montecchi F. *Gli abusi all'infanzia*. Roma: Carocci Editore;1994.
- Negri R. *Il neonato in terapia intensiva - un modello neuropsico-analitico di prevenzione*. Milano: Raffaello Cortina Editore;1994.
- Di Cagno L, Gandione M, Massaglia P. Il contenimento delle angosce come momento terapeutico nel lavoro con genitori di bambini con patologia organica grave. In: Fava Vizziello G, Stern DN (Ed.). *Dalle cure materne all'interpretazione*. Milano: Raffaello Cortina Editore; 1992. p. 115-42.
- Volpe JJ. Hypoxic-hischemic encephalopathy: clinical aspects. In: Volpe JJ (Ed.). *Neurology of the newborn*. Philadelphia: WB Saunders Co., 2001. p. 331-94.
- Korner AF, Stevenson DK, Kraemer HC, Spiker D, Scott DT, Constantinou J, Dimiceli S. Prediction of the development of low birth weight preterm infants by a new neonatal medical index. *J Dev Behav Pediatr* 1993;14(2):106-11.
- Bakeman R, Brown JV. Early interaction: Consequences for social and mental development at three years. *Child Dev* 1980;51(2):437-47.

20. Hack M, Wilson-Costello D, Friedman H, Taylor GH, Schluchter M, Fanaroff AA. Neurodevelopment and predictors of outcomes of children with birth weights of less than 1000 g. 1992-1995. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000;154:725-31.
21. Sharp D, Hay DF, Pawlby S, Schmucker G, Allen H, Kumar R. The impact of postnatal depression on boys' intellectual development. *J Child Psychol Psychiatry* 1995;36(8):1315-36.
22. Fawer CL, Besnier S, Forcada M, Buclin T, Calame A. Influence of perinatal, developmental and environmental factors on cognitive abilities of preterm children without major impairments at 5 years. *Early Hum Dev* 1995;43(2):151-64.
23. O'Mara L, Johnston C. Mothers' attitudes and their children's behaviors in 3-years-old born prematurely and at term. *J Dev Behav Pediatr* 1989;10(4):192-7.
24. Murray L, Fiori-Cowley A, Hooper R, Cooper P. The impact of postnatal depression and associated adversity on early mother-infant interactions and later infant outcome. *Child Dev* 1996; 67(5):2516-26.
25. Hadders-Algra M, Huisjes HJ, Touwen BC. Preterm or small-for-gestational-age infants. Neurological and behavioural development at the age of 6 years. *Eur J Pediatr* 1988;147(5):460-7.
26. Hadders-Algra M, Huisjes HJ, Touwen BC. Perinatal risk factors and minor neurological dysfunction: significance for behaviour and school achievement at nine years. *Dev Med Child Neurol* 1988; 30(4):482-91.
27. Achembach TM. *Manual for the Child Behaviour Checklist/4-8 and 1991 profile*. Burlington, VT: University of Vermont, Department of Psychiatry; 1991.
28. Pisaturo C, Contegno P, Sodini G. Effects of early rehabilitative treatment on neurological development and cognitive and perceptual-motor functions of preterm infants at risk. *Minerva Pediatr* 1990;42(7-8):281-9.
29. Cobiella CW, Mabe PA, Forehand RL. A comparison of two stress-reduction treatments for mothers of neonates hospitalized in a neonatal intensive care unit. *Child Health Care* 1990;19(2):93-100.
30. Davis DW, Logsdon MC, Birkmer JC. Types of support expected and received by mothers after their infants' discharge from the NICU. *Issues Compr Pediatr Nurs* 1996;19(4):263-73.
31. Younger JB, Kendell MJ, Pickler RH. Mastery of stress in mothers of preterm infants. *J Soc Pediatr Nurs* 1997;2(1):29-35.
32. DeMier RL, Hynan MT, Harris HB, Manniello RL. Perinatal stressors as predictors of symptoms of posttraumatic stress in mothers of infants at high risk. *J Perinatol* 1996;16(4):276-80.
33. Singer LT, Salvator A, Guo S, Collin M, Lilien L, Baley J. Maternal psychological distress and parenting stress after the birth of a very low-birth-weight infant. *JAMA* 1999;281(9):799-805.
34. DeMier RL, Hynan MT, Hatfield RF, Varner MW, Harris HB, Manniello RL. A measurement model of perinatal stressors: Identifying risk for postnatal emotional distress in mothers of high-risk infants. *J Clin Psychol* 2000;56(1):89-100.
35. Romito P, Saurel-Cubizolles MJ, Lelong N. What makes new mothers unhappy: psychological distress one year after birth in Italy and France. *Soc Sci Med* 1999;49(12):1651-61.
36. Harrison MJ, Magill-Evans J. Mother and father interactions over the first year with term and preterm infants. *Res Nurs Health* 1996; 19(6):451-9.
37. Lewis MD, Koroshegyi C, Douglas L, Kampe K. Age-specific associations between emotional responses to separation and cognitive performance in infancy. *Dev Psychol* 1997;33(1):32-42.
38. Stjernqvist K, Svenningsen NW. Ten-year follow-up of children born before 29 gestational weeks: Health, cognitive development, behaviour and school achievement. *Acta Paediatr* 1999;88:557-62.
39. Miles MS, Holditch-Davis D, Burchinal P, Nelson D. Distress and growth outcomes in mothers of medically fragile infants. *Nurs Res* 1999;48(3):129-40.
40. Fava Vizziello G, Rebecca L, Calvo V, Giaccherini S, Nofri F. Nascita pretermine/rappresentazioni materne, attaccamento e sviluppo del bambino. In: Pazzagli A, Benvenuti P, Guerrini Degli Innocenti B (Ed.). *Bambini e genitori. Attaccamento e psicopatologia*. Firenze: Loggia de' Lanzi; 1995. p. 171-200.
41. Cooper PJ, Murray L. L'impatto della depressione postnatale sullo sviluppo infantile. In: Pazzagli A, Benvenuti P, Guerrini Degli Innocenti B (Ed.). *Bambini e genitori. Attaccamento e psicopatologia*. Firenze: Loggia de' Lanzi; 1995. p. 99-112.

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.

L'influenza dei fattori socio-ambientali sui processi fisiologici di recupero dal danno cerebrale: il contributo dei modelli animali

Sara MORLEY-FLETCHER, Monica REA, Walter ADRIANI e Giovanni LAVIOLA

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

Riassunto. - In questa rassegna vengono presentati alcuni degli approcci sperimentali descritti sui modelli animali volti a individuare possibili strategie terapeutiche da adottare in presenza di danno neurologico/funzionale congenito, e/o indotto da anossia/ischemia neonatale. Le tecniche utilizzate per ridurre le alterazioni in roditori di laboratorio vengono concisamente descritte, e particolare attenzione viene rivolta alla modulazione in senso fisico e sociale dell'ambiente di crescita dell'animale.

Parole chiave: danno neurologico/funzionale, ambiente di crescita, modelli animali, ambiente arricchito, plasticità neuronale, strategie di recupero.

Summary (*Social environmental variables and physiological processes of recovery from brain damage: the contribution of animal models*). - This review presents the experimental approaches more widely used in animal models to investigate possible strategies aimed to stimulate plasticity in the nervous system and possibly to increase spontaneous recovery from functional/neurological diseases such as neonatal anoxia. Methods used in laboratory rodents are briefly described. Attention is focused on possible enrichments of the social and physical environment during development.

Key words: neuronal/functional alterations, raising environment, animal models, enriched environment, experience-dependent neural plasticity, therapeutic approaches.

Introduzione

Come descritto approfonditamente in altri contributi a questo fascicolo, l'encefalopatia ipossico/ischemica è una delle più importanti conseguenze dell'evento asfittico perinatale per le potenziali ripercussioni che essa può avere sulle funzioni motorie, cognitive e comportamentali nel soggetto in via di sviluppo. Il sistema nervoso oltre ad essere particolarmente vulnerabile, risulta anche essere caratterizzato da una notevole plasticità. Osservazioni condotte su modelli animali suggeriscono come le condizioni di crescita postnatale dell'individuo contribuiscano in misura importante nel modulare i possibili processi di recupero del danno cerebrale [1]. Tali processi appaiono inoltre estremamente sensibili a stress anche di lieve entità. Soggetti animali mantenuti in condizioni di sovraffollamento o, al contrario, d'isolamento sociale, o che siano sottoposti a procedure sperimentali invasive, possono presentare alterazioni significative di parametri immunologici e ormonali, che interferiscono con la risposta fisiologica dell'organismo al processo patologico. Ad esempio, lo stress psicosociale può indurre deviazioni significative della linea di base nel comportamento del soggetto animale in sperimentazione, interferendo con le componenti emozionali e attenzionali alla base dei processi cognitivi. E' evidente quindi come la regolare valutazione delle caratteristiche dell'ambiente di crescita dell'animale da

esperimento e del suo conseguente stato di benessere psicofisico, possa aprire la strada a una serie di possibili interventi modulatori da parte dello sperimentatore che possono fungere da supporto e da possibile stimolo delle potenzialità fisiologiche di recupero.

In questa rassegna verranno presentati alcuni degli approcci sperimentali più usati in modelli animali per mettere a punto possibili strategie terapeutiche da adottare in presenza di danni neurologico/funzionali congeniti indotti da anossia e/o ischemia neonatale. Le tecniche utilizzate per alleviare i deficit in roditori di laboratorio vengono concisamente descritte, e particolare attenzione viene rivolta alla modulazione in senso fisico e sociale dell'ambiente di crescita dell'animale. Tali risultati suggeriscono come un'adeguata stimolazione sensori-motoria che tenga anche conto della componente sociale dell'ambiente di crescita possa avere alcune effetti positivi, e potrebbe rivelarsi un'utile strategia terapeutica in casi di pazienti affetti da disturbi neurologico/funzionali in età precoce.

Stato dell'arte

La storia evolutiva e le necessità filogenetiche dei roditori, la specie animale maggiormente utilizzata in studi di neuroscienze, devono essere tenute in appropriato conto, soprattutto nel caso di animali nati e

mantenuti in condizioni quali quelle di laboratorio che ottimizzano l'esigenza di ridurre i costi ma risultano spesso, almeno per alcuni aspetti, fuori di un contesto di natura. I modelli sperimentali animali dimostrano come la possibilità di interagire con un ambiente fisicamente complesso abbia la capacità, ad esempio tramite l'induzione di strategie di stimolazione sensoriale-motoria, di favorire la plasticità e di esercitare di conseguenza un'influenza positiva sui processi fisiologici di compensazione di un possibile danno funzionale a livello del sistema nervoso centrale. Tali condizioni stimolerebbero la plasticità neuro-comportamentale mediante l'instaurarsi di un maggior stato di vigilanza e di reattività agli stimoli. Sono presenti in letteratura dati riguardanti il miglioramento delle condizioni psicofisiche dei roditori in seguito all'utilizzo di specifiche tecniche di arricchimento ambientale (Fig. 1). In studi di neuroscienze, ratti o topi con lesioni indotte sperimentalmente a livello di specifiche aree cerebrali, presentano gradi importanti di recupero delle funzioni e della ricchezza del repertorio comportamentale proprio della specie, qualora vengano posti per un periodo consistente in condizioni di arricchimento fisico e sociale, anche se il ruolo (e le eventuali interazioni) tra questi diversi fattori è tuttora oggetto di analisi. Risulta evidente quindi che, tramite tale procedura, un certo grado di stimolazione sensori-motoria viene fornita all'animale semplicemente rispettando alcune basilari necessità etologiche e fisiologiche. Ad esempio, la sola presenza di una partizione nella gabbia di allevamento può contribuire, in seguito all'incremento della

complessità dell'ambiente fisico spaziale, anche all'instaurarsi di relazioni sociali più complesse (e verosimilmente più vicine a quelle specie-specifiche). In tali condizioni viene consentito all'animale di operare o meno una scelta nel grado di vicinanza fisica e di controllo visivo con i conspecifici presenti nella gabbia di stabulazione.

In condizioni di arricchimento, l'ambiente fisico può divenire parzialmente manipolabile e/o controllabile dall'animale e in quanto tale probabilmente più approssimabile alle condizioni naturali. Di conseguenza viene consentita anche una maggiore espressione delle differenti componenti del repertorio comportamentale. A questo proposito, uno studio condotto su ratti allevati in ambiente arricchito a partire dal periodo dello svezzamento, ha mostrato come comportamenti ritenuti indici di stati ansiosi e normalmente esibiti in presenza di un predatore (in questo caso rappresentato dall'odore dell'urina di un gatto) fossero ridotti significativamente negli animali mantenuti in condizioni di arricchimento. Questi ultimi erano visti trascorrere più tempo nelle vicinanze dello stimolo associato al gatto rispetto ai soggetti di controllo che erano invece allevati nelle normali condizioni di stabulazione [2]. Tale studio dimostra come nell'animale da esperimento il profilo emozionale e la reattività a stimoli potenzialmente avversi siano ampiamente modulabili da parte dello sperimentatore.

Ulteriori evidenze sperimentali indicano poi come la crescita in un ambiente cosiddetto arricchito comporti modifiche morfo-funzionali importanti a livello cerebrale

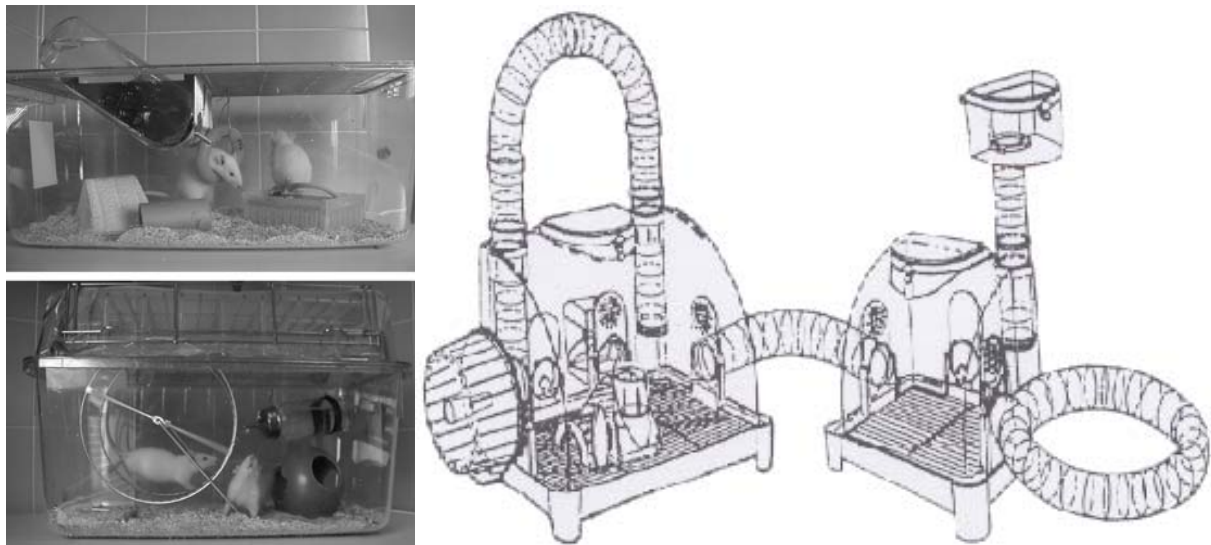


Fig. 1. - Possibili configurazioni di ambienti arricchiti. A sinistra: gabbie da stabulazione fornite di differenti assetti di oggetti manipolabili, in parte mobili, come ruote, anelli, scatole a forma di nido provviste di fori di entrata, ecc. di forma e di colore vario che vengono alternati nei giorni al fine di conservarne la novità. A destra: un modello di arricchimento più dispendioso (SAM dall'inglese *small animal module*, USA), costituito da più moduli intercambiabili. I modelli raffigurati a sinistra presentano il vantaggio rispetto alle gabbie SAM di una più facile applicazione in condizioni standard di laboratorio.

[3, 4]. Parametri neurobiologici che costituiscono indici di un'accresciuta funzionalità del sistema nervoso presentano un certo numero di modifiche importanti. Viene riportata infatti in ratti cresciuti in ambiente arricchito un'aumentata espressione dei geni responsabili della codifica dei recettori per i glucocorticoidi nell'ippocampo e una maggiore produzione di fattori di crescita quali NGF e BDNF [5-7].

Più in generale è stato riportato un incremento significativo dei processi di neurogenesi a livello ippocampale assieme ad alti livelli di mRNA nell'area cerebrotorale [8-10]. Non è attualmente ancora accertato quale sia il fattore critico responsabile dei maggiori livelli di sopravvivenza delle cellule neuronali neonate riscontrati nel ratto a livello del giro dentato ippocampale. Uno studio recente ha individuato, nell'ambito delle procedure per l'arricchimento ambientale, la componente legata all'esercizio fisico volontario (stimolata dalla disponibilità di *running wheels*) come quella maggiormente responsabile dell'accresciuta proliferazione cellulare, della sopravvivenza neuronale e quindi di un'effettiva neurogenesi a livello dell'ippocampo del topo adulto [11]. Effettivamente l'esercizio fisico è stato dimostrato facilitare il recupero del danno neurologico conseguente all'ischemia e migliorare la performance cognitiva [12, 13]. L'attività fisica stimola inoltre la produzione di fattori di crescita e l'espressione genica [14]. Alcuni studi riportano inoltre un'influenza dell'ambiente arricchito anche sui ritmi del ciclo sonno/veglia [15].

Uno studio condotto su un modello animale di ipossia neonatale indica come alcuni deficit neurologici e comportamentali indotti da questo tipo di insulto precoce, quali alterazioni nell'apprendimento spaziale e nel comportamento esplorativo, possano essere contrastati se non completamente recuperati in seguito a un periodo di crescita durante lo sviluppo in condizioni di ambiente fisicamente e socialmente arricchito [16]. Ratti esposti a ipossia neonatale e cresciuti in seguito in ambiente arricchito, presentano un miglioramento in questi parametri comportamentali che si associa anche a una ridotta espressione a livello ippocampale di una specifica proteina quale la parvalbumina (Fig. 2). Tale risultato costituisce un'indice a livello cellulare di accresciuta funzionalità del sistema nervoso coinvolto nella modulazione dei processi di apprendimento.

L'aumentata plasticità del sistema nervoso in risposta alla stimolazione ambientale si conserva anche in età avanzata. Ad esempio topi senescenti (due anni di età) mantenuti per un periodo di tre mesi in ambiente fisicamente arricchito presentano punteggi superiori in un paradigma di apprendimento e di *food seeking* rispetto a soggetti mantenuti in gabbie standard [17, 18]. Quest'ultimo esempio indica come sia possibile intervenire mediante metodiche non farmacologiche, volte alla stimolazione dei naturali meccanismi di

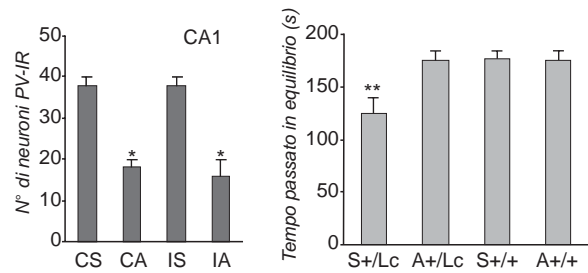


Fig. 2. - *Pannello di sinistra:* numero di neuroni immuno-reattivi per la parvalbumina nelle cellule non piramidali della regione CA1 (corno ammonio) dell'ippo-campo dorsale misurati in animali controllo (C) e in animali esposti a ipossia neonatale (A). Gli animali sono allevati rispettivamente in gabbie standard (S) o viceversa arricchite (A). Come si può notare l'arricchimento si associa a una notevole riduzione nel numero di neuroni PV. *Pannello di destra:* test motorio. Tempo trascorso in equilibrio su un'asticella di legno posta a 20 cm dal suolo misurato in topi mutanti Lurcher (Lc) e wildtype (+/+) cresciuti in gabbie standard (S) o arricchite (A). Come si può osservare l'arricchimento migliora i livelli di coordinazione motoria nei mutanti Lurcher rispetto ai controlli.

reazione e recupero dell'organismo al fine di rallentare i deficit comportamentali conseguenti alla neurodegenerazione che è normalmente associata al processo di invecchiamento. Un ulteriore studio ha caratterizzato le conseguenze positive dell'allevamento in condizioni di ambiente arricchito sull'espressione dei deficit comportamentali di origine genetica [19, ma vedi anche 3]. Topi Lurcher caratterizzati da una mutazione che induce una marcata degenerazione delle cellule di Purkinje nel cervelletto presentano un certo numero di deficit in paradigmi sperimentali che richiedono capacità di equilibrio e più in generale coordinazione sensorimotoria. Tali alterazioni vengono ridotte notevolmente quando questi animali vengono fatti crescere sin dalla nascita in un ambiente fisicamente complesso. E' noto infatti che in tali condizioni viene favorita la stimolazione sensoriale assieme alla possibilità di esercizio fisico, e di conseguenza ne traggono notevole giovamento i processi di coordinazione motoria.

Modulazione di fattori sociali: l'adozione

L'esperienza di pregresse e/o attuali condizioni di stress rappresenta un fattore di rischio importante per l'insorgere precoce di una serie di patologie a eziologia genetica. La condizione di stress sarebbe in grado di interagire con la vulnerabilità dei singoli organismi e i polimorfismi a essi associati. L'esposizione della madre durante la gravidanza a un'intensa condizione di stress è stata associata alla presenza di ritardo mentale e a disturbi del sonno nel bambino [20]. Disturbi similari

sono stati riscontrati in modelli animali e risultano persistere anche in età adulta [4, 21, 22].

Le caratteristiche del contesto sociale postnatale sembrano avere una notevole importanza nel modulare e ridurre gli effetti dello stress prenatale. Uno studio condotto sul ratto ha rivelato come la sostituzione alla nascita della madre naturale (stressata precedentemente durante la gravidanza) con una di controllo adottiva, possa ripristinare nella prole il corretto funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Normalmente i piccoli stressati prenatalmente presentano notevoli alterazioni, sia dal punto di vista dei livelli ormonali che della densità recettoriale dei sistemi dei glucocorticoidi [21] (Fig. 3).

Contesto sociale di crescita e modulazione degli stimoli associati ai due sessi

I fattori di natura sociale esercitano un'influenza marcata sui profili di risposta comportamentale degli individui. La segregazione in contesti a sesso singolo o in isolamento sociale comporta la deprivazione degli stimoli quotidiani relativi alla vita sociale e quindi un'importante fonte di attivazione funzionale dei maggiori sistemi di regolazione fisiologica evolutisi di conseguenza. Studi condotti sui roditori hanno mostrato come variazioni nel rapporto sessi nella nidiata (LGC dall'inglese *litter gender composition*) abbiano la capacità di modulare profondamente l'espressione del repertorio comportamentale dell'individuo in fase di

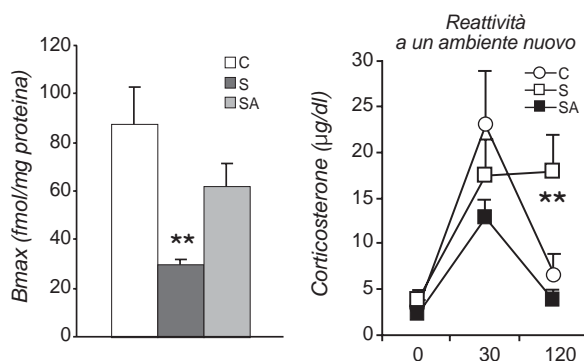


Fig. 3. - *Pannello di sinistra:* densità dei recettori per i glucocorticoidi misurati nell'ippocampo di ratti adulti stressati prenatalmente (S), di ratti stressati prenatalmente ma adottati alla nascita (SA) e ratti controllo (C). *Pannello di destra:* livelli di corticosterone secreti in risposta all'esposizione a un ambiente nuovo negli stessi gruppi di animali. Gli animali S presentano una prolungata secrezione di corticosterone rispetto ai controlli e un ridotto numero di recettori per i glucocorticoidi a livello ippocampale, entrambi indici di un'alterazione nei sistema di regolazione a *feedback* dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Come si può notare l'adozione alla nascita si associa al ripristino di una corretta funzionalità dell'asse.

sviluppo e una serie di indici fisiologici pertinenti agli ormoni gonadici e all'asse della risposta allo stress [23, 24]. Tale processo avviene in parte per via diretta in quanto alcuni specifici comportamenti nella prole in sviluppo vengono stimolati o viceversa depressi in presenza di stimoli derivanti da individui del proprio sesso o del sesso opposto (es. i comportamenti "ludico/affiliativi" caratteristici di stati giovanili, sono principalmente rivolti nel maschio verso partner del proprio sesso). Inoltre il comportamento materno viene indirettamente modulato dalla composizione in sessi della nidiata. Infatti, nei roditori di laboratorio la madre è perfettamente in grado di discriminare il sesso della prole e interagire di conseguenza in maniera differenziale nei confronti di una prole maschile o femminile [25]. In considerazione di un differente investimento riproduttivo associato ai soggetti dei due sessi, in genere i maschi richiedono e ottengono una maggior numero di cure [26-29]. I meccanismi con cui i genitori discriminano la prole secondo il sesso sembrano essersi evoluti al fine di avere come effetto un aumento della *fitness* della specie. Ciò si verificherebbe attraverso una modulazione e focalizzazione dell'investimento parentale volto ad ottimizzare le possibilità di sopravvivenza del piccolo.

La modulazione dei comportamenti espressi dai vari individui nella nidiata familiare e di alcuni importanti parametri fisiologici di questi come conseguenza della manipolazione degli stimoli relativi ai due sessi, potrebbe rivelarsi una strategia utile ai fini di ottenere individui che presentino caratteristiche di maggior resistenza (o viceversa ridotta sensibilità) all'esposizione a insulti perinatali di varia natura, siano essi droghe d'abuso [23, 24], inquinanti ambientali o danno neurologico-funzionale conseguente ad es. a ipossia neonatale.

Prospettive future

Alla luce di quanto detto finora, è stato avviato uno studio per la valutazione del ruolo "terapeutico" dell'esposizione a un ambiente arricchito in animali, nel nostro caso il ratto, che abbiano subito una condizione di anossia perinatale indotta dall'esposizione precoce (1-2 giorni dalla nascita) a atmosfera satura di N₂ per un periodo di circa 30 min [12]. Verrà studiato un modello di neonato a rischio che consenta di conservare la madre genetica e quindi gli aspetti di motivazione legati all'investimento riproduttivo associati alla propria prole. Verrà condotta anche la valutazione del profilo fisiologico-comportamentale della madre che risulta affetta in modo diretto dallo stress conseguente alla cura di una prole con danno neurologico/funzionale. L'approccio sperimentale adottato permetterà un'analisi dei meccanismi regolatori neuro-ormonali coinvolti durante le fasi ontogenetiche di tarda infanzia e adolescenza nello sviluppo delle relazioni sociali e

nell'eventuale disturbo dei loro profili. L'obiettivo è l'individuazione e la definizione di programmi di intervento di natura non farmacologica oppure di integrazione a quest'ultima che si avvalgano della possibilità di apportare significative modifiche alle normali pratiche di stabulazione perchè possano costituire una procedura terapeutica di qualità ma anche di semplice applicazione. Mediante manipolazioni dei fattori socio-ambientali verrà esaminata la possibilità di superare o compensare le deviazioni nella maturazione neuro-comportamentale e sensorimotoria (scale di Fox) attese nei rattini utilizzati come modello di danno ipossico perinatale, e dei loro profili disturbati di attività locomotoria, di abitudine e di esplorazione spontanea. La videoregistrazione di incontri sociali ripetuti tra ratti adolescenti appaiati per fascia d'età, sesso e condizioni sperimentali, permetterà di valutare il possibile insorgere di una socialità disturbata conseguente al danno neurologico/funzionale nella fase peripuberale, la quale è associata all'emergere prepotente degli ormoni gonadici [13].

Indagini epidemiologiche indicano poi come la presenza di una figura di sostegno a vari gradi di familiarità sia una variabile fondamentale per l'instaurarsi di una sana relazione della madre con il bambino soprattutto in presenza di prole con danno neurologico/funzionale. Tale condizione spesso comporta la necessità da parte della madre di mettere in opera strategie comportamentali volte alla compensazione del danno che si associano a stati di affaticamento e stress oltremodo prolungati con la possibile insorgenza di comportamenti parentali ambigui o rifiutanti. A questi ultimi si associano spesso alterazioni importanti dei sistemi fisiologici di regolazione ormonale nervosa e immunitaria. Molti studi hanno riportato difficoltà di interazione tra madre e bambino durante il primo anno di vita, come risultato degli accresciuti segnali di fragilità che il bambino con un danno neurologico trasmette a chi si prende cura di lui rispetto al bambino sano [14, 30].

Tutto ciò evidenzia l'importanza di sviluppare misure di intervento per il sostegno psicologico dei genitori in particolare delle madri nel periodo di ospedalizzazione e nella prima fase di rientro a casa ai fini della riduzione dello stress legato alle condizioni di salute del bambino e del conseguente miglioramento delle interazioni genitori-figlio. Tale tipo di intervento, insieme ai trattamenti riabilitativi precoci diretti al bambino, può essere di aiuto per lo sviluppo ottimale delle capacità sensorimotorie cognitive e affettive del bambino stesso, pur sempre nei limiti determinati dalle sue condizioni di salute. In tale contesto di indagine in modelli animali appropriati verrà condotta una valutazione dei disturbi comportamentali in paradigmi sperimentali di ansia e di depressione. Tale valutazione verrà condotta negli animali sperimentali che si trovino a svolgere un ruolo materno e/o paterno in presenza e cura di una prole affetta da danno neurologi-

co/funzionale [31]. Eventuali stati di affaticamento e stress e la durata di questi nel tempo verranno monitorati, così come la possibile insorgenza di comportamenti disturbati.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 19 luglio 2001.

BIBLIOGRAFIA

1. Laviola G. On mouse pups and their lactating dams: behavioral consequences of early exposure to oxazepam and interacting factors. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;55(4):459-74.
2. Klein SL, Lambert KG, Durr D, Schaefer T, Waring RE. Influence of environmental enrichment and sex on predator stress response in rats. *Physiol Behav* 1994;56(2):291-7.
3. Chapillon P, Manneche C, Belzung C, Caston J. Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. *Behav Genet* 1999;29(1):41-6.
4. Weinstock M, Fride E, Hertzberg R. Prenatal stress effects on functional development of the offspring. *Prog Brain Res* 1988; 73:319-31.
5. Falkenberg T, Mohammed AK, Henriksson B, Persson H, Winblad B, Lindfors N. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci Lett* 1992;138(1):153-6.
6. Mohammed AH, Henriksson BG, Soderstrom S, Ebendal T, Olsson T, Seckl JR. Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat. *Behav Brain Res* 1993;57(2):183-91.
7. Olsson T, Mohammed AH, Donaldson LF, Henriksson BG, Seckl JR. Glucocorticoid receptor and NGFI-A gene expression are induced in the hippocampus after environmental enrichment in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 1994;23(4):349-53.
8. Ferchmin PA, Eterovic VA. Forty minutes of experience increase the weight and RNA content of cerebral cortex in periadolescent rats. *Dev Psychobiol* 1986;19(6):511-9.
9. Kempermann G, Brandon EP, Gage FH. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol* 1998; 8(16):939-42.
10. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 1997; 386:493-5.
11. Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neurosci* 1999;2:266-70.
12. 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(2):125-34.
13. Renner MJ, Rosenzweig MR. Social interactions among rats housed in grouped and enriched conditions. *Dev Psychobiol* 1986; 19(4):303-13.

14. Cobiella CW, Mabe PA, Forehand RL. A comparison of two stress-reduction treatments for mothers of neonates hospitalized in a neonatal intensive care unit. *Child Health Care* 1990;19(2):93-100.
15. Mirmiran M, Van den DH, Uylings HB. Sleep patterns during rearing under different environmental conditions in juvenile rats. *Brain Res* 1982;233(2):287-98.
16. 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(1):25-33.
17. Warren JM, Zerweck C, Anthony A. Effects of environmental enrichment on old mice. *Dev Psychobiol* 1982;15(1):13-8.
18. Green EJ, Greenough WT, Schlumpf BE. Effects of complex or isolated environments on cortical dendrites of middle-aged rats. *Brain Res* 1983;264(2):233-40.
19. Caston J, Devulder B, Jouen F, Lalonde R, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J. Role of an enriched environment on the restoration of behavioral deficits in Lurcher mutant mice. *Dev Psychobiol* 1999;35(4):291-303.
20. Stott DH. Follow-up study from birth of the effects of prenatal stresses. *Dev Med Child Neurol* 1973;15(6):770-87.
21. Maccari S, Piazza PV, Kabbaj M, Barbazanges A, Simon H, Le Moal M. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *J Neurosci* 1995;15(1 Pt 1):110-6.
22. Vallee M, Maccari S, Dellu F, Simon H, Le Moal M, Mayo W. Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat. *Eur J Neurosci* 1999;11(8):2906-16.
23. Laviola G, Terranova ML. The developmental psychobiology of behavioural plasticity in mice: the role of social experiences in the family unit. *Neurosci Biobehav Rev* 1998;23(2):197-213.
24. Cirulli F, Laviola G. Paradoxical effects of D-amphetamine in infant and adolescent mice: role of gender and environmental risk factors. *Neurosci Biobehav Rev* 2000;24(1):73-84.
25. Petruzzi S, Chiarotti F, Alleva E, Laviola G. Limited changes of mouse maternal care after prenatal oxazepam: dissociation from pup-related stimulus perception. *Psychopharmacology (Berl)* 1995;122(1):58-65.
26. Moore CL, Power KL. Variation in maternal care and individual differences in play, exploration, and grooming of juvenile Norway rat offspring. *Dev Psychobiol* 1992;25(3):165-82.
27. Moore CL, Wong L, Daum MC, Leclair OU. Mother-infant interactions in two strains of rats: implications for dissociating mechanism and function of a maternal pattern. *Dev Psychobiol* 1997;30(4):301-12.
28. Francis DD, Champagne FA, Liu D, Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the development of individual differences in stress reactivity. *Ann N Y Acad Sci* 1999;896:66-84.
29. Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD, Meaney MJ. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat Neurosci* 2000;3(8):799-806.
30. Miles MS, Funk SG, Kasper MA. The neonatal intensive care unit environment: sources of stress for parents. *AACN Clin Issues Crit Care Nurs* 1991;2(2):346-54.
31. Laviola G. Mouse models of emotional postpartum disorders. *Ann Ist Super Sanità* 1993;29(1):153-62.

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 morbidità 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, Gidday 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, Isackson PJ. Limbic seizures increase neuronal production of messenger RNA for nerve growth factor. *Science* 1989;24:758-61.
32. Isackson 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, Quinero 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, Vetuschi 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. Kirschner 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⁺ 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.

Marker proteici del danno ipossico-ischemico

Alessio CRESTINI, Paola PISCOPO,
Lorenzo MALVEZZI CAMPEGGI e Annamaria CONFALONI

*Laboratorio di Metabolismo e Biochimica Patologica,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Riassunto. - La lesione ipossica perinatale è una delle maggiori cause di alterazione del normale sviluppo neurologico. Studi recenti su modelli animali hanno mostrato che eventi di natura ipossico-ischemica avviano un processo di riorganizzazione dell'architettura sinaptica che comporta modificazioni transitorie dell'espressione sia di proteine sinaptiche (sinapsina 1, SNAP 25, APP) che di proteine neuronali (MAP2, N-CAM, GAP-43, preseniline), attive durante l'ontogenesi del sistema nervoso. Per alcune di queste proteine, in seguito all'evento ipossico, si verificano modificazioni post-traduzionali, mentre altre sono interessate da insoliti eventi di trascrizione. Uno studio più approfondito sulle proteine associate alla plasticità sinaptica potrebbe fornire una preziosa chiave di lettura per la miglior comprensione dei meccanismi di recupero del sistema nervoso.

Parole chiave: marcatori proteici, ipossia-ischemia, modello animale, uomo.

Summary (*Protein marker of hypoxic-ischaemic damage*). - Perinatal hypoxic injury is the major cause of normal neural developmental alterations. Recent studies concerning animal models show that an hypoxic/ischaemic event triggers a process taking to a synaptic architecture reorganization which induces a transient change in the synaptic (synapsin 1, SNAP 25, APP) and neuronal (MAP2, N-CAM, GAP-43 and presenilins) protein expression. Here we review the post-translational modifications of some proteins after hypoxic-ischaemic events. A deeper study on synaptic proteins plasticity could give an important key for the understanding of the recovery mechanisms of the nervous system.

Key words: proteic markers, hypoxia-ischaemia, animal model, human.

Introduzione

Il danno ipossico-ischemico cerebrale si verifica frequentemente in età neonatale in seguito ad episodi quali l'asfissia *intrapartum* o l'arresto respiratorio. Nonostante gli interventi terapeutici comunemente utilizzati, gli esiti di tali eventi possono manifestarsi con alcuni deficit neurologici quali la paralisi cerebrale, il ritardo mentale e l'epilessia. Gli effetti dell'ipossia-ischemia in età perinatale e nell'adulto, pur causati da processi degenerativi analoghi, mostrano differenze sostanziali; infatti, mentre nel neonato il tessuto nervoso è ancora metabolicamente immaturo [1] e, evento forse ancora più decisivo, adattato ad un ambiente povero di ossigeno, il tessuto cerebrale adulto, altamente differenziato, risulta particolarmente sensibile a variazioni della pressione relativa dell'ossigeno. E' stato osservato che mentre nell'adulto i processi neuronali di necrosi e apoptosi sono lenti [2], negli animali neonati, e presumibilmente negli infanti umani, la morte cellulare risulta molto più rapida, per cui i tempi effettivi per realizzare un efficace intervento terapeutico non dovrebbero superare le due-sei ore [3]. Tuttavia, il sistema nervoso centrale fetale, presenta notevoli capacità reattive ed adattative all'asfissia [4] per cui la maggior parte dei

neonati che presentano una severa acidemia nel momento del parto, mostrano, successivamente, un decorso postnatale privo di complicazioni [5].

Quando la perfusione cerebrale è troppo bassa per fornire un'adeguata ossigenazione, a livello cellulare ha inizio una cascata di eventi biochimici innescati da un deficit energetico con conseguente arresto della biosintesi delle proteine, grave acidosi, accumulo citoplasmatico di ioni Ca^{++} , perossidazione lipidica e rilascio del glutammato dalle vescicole sinaptiche [3]. La successiva riperfusione, invece di ristabilire un ambiente adeguato alla sopravvivenza delle cellule nervose, determina un ulteriore aggravamento del quadro clinico causato da un anomalo aumento della pressione nei capillari cerebrali con conseguente rilascio di radicali liberi, sintesi di ossido nitrico, sviluppo di reazioni infiammatorie ed una rinnovata attività eccitotossica del glutammato.

Sebbene a tutt'oggi si disponga di poche informazioni riguardanti i meccanismi plastici che consentono il rimodellamento assonale ed il recupero dell'efficacia sinaptica, questi, tuttavia, sono certamente coinvolti negli eventi successivi agli insulti di tipo ipossico-ischemico.

In modelli sperimentali condotti su roditori, tra i quali il gerbillo della Mongolia (*Meriones unguiculatus*), l'ischemia transitoria del prosencefalo determina un

pattern di morte neuronale che vede coinvolti la maggioranza dei neuroni piramidali ippocampali CA1 e la maggior parte di quelli inibitori polimorfici dell'ilo del giro dentato [6-9].

Alcuni autori hanno proposto che l'eccitazione propagata dalle cellule granulari del giro dentato ai neuroni piramidali ippocampali in CA1, sia il meccanismo attraverso il quale tali cellule muoiono nei quattro giorni successivi all'induzione dell'insulto ischemico [9, 10]. La morte neuronale e la perdita dell'organizzazione sinaptica determinano tuttavia un riadattamento dei neuroni resistenti, che orientano lo sviluppo delle loro terminazioni verso i distretti danneggiati, ristabilendo in parte, le connessioni sinaptiche.

E' stato rilevato che alcune proteine, note per il loro coinvolgimento nello sviluppo del sistema nervoso e nell'organizzazione del network neuronale, vengono riespresse inaspettatamente, in seguito ad insulti di tipo ischemico e nel corso di alcune malattie neurodegenerative [11-13]. Ad esempio, nell'ippocampo del gerbillo e del ratto dopo ischemia transitoria del prosencefalo si osserva l'induzione della SNAP-25 (*synaptosomal associated protein of 25 kDa*), proteina coinvolta nella crescita assonale durante l'ontogenesi cerebrale, e fortemente indotta, dopo danno ischemico, nello "strato muscoide" dell'ippocampo [14-16]. Analogamente dopo ischemia, si osserva un aumento anche dell'RNA messaggero della GAP-43 (*growth associated protein of 43 kDa*) [17, 18].

L'articolo vuole rivisitare i recenti contributi forniti dai dati sperimentali in relazione ad alcune proteine normalmente espresse nel corso dell'ontogenesi, la cui induzione risulta aumentata o diminuita a seguito di episodi di ipossia-ischemia. Tali proteine possono risultare utili marcatori prognostici del danno neuronale causato da ipossia-ischemia cerebrale perinatale e dimostrarsi efficaci per la valutazione degli interventi farmaco-terapeutici e lo sviluppo di nuove terapie.

La sinapsina I (*synapsin I*)

La sinapsina I è una fosfoproteina localizzata nella parte citoplasmatica interna delle vescicole sinaptiche della quale sono note due isoforme di *splicing* di 80 e 86 kDa [19]. La proteina viene sintetizzata nei corpi cellulari neuronali e trasferita con trasporto assonale [20], insieme alle principali proteine assonali e sinaptiche, ai terminali nervosi. La sinapsina I funge da substrato della CaMKII (protein chinasi calcio-calmodulina dipendente) e regola il legame ad elementi citoscheletrici quali l'actina, la tubulina ed i neurofilamenti, mediante fosforilazione.

Osservazioni al microscopio elettronico ed analisi di immunocitochimica hanno stabilito che la proteina forma legami contemporaneamente, sia con le vescicole sinaptiche che con il citoscheletro, principalmente con i

filamenti di actina [21-23]. Inoltre la fosforilazione della parte C-terminale della sinapsina facilita la sua dissociazione dall'actina citoscheletrica incrementando l'attività di esocitosi delle vescicole sinaptiche. Questo meccanismo, a sua volta, regola il rilascio del neurotrasmettitore dalle vescicole, influenzando l'efficienza della trasmissione sinaptica [24].

Durante lo sviluppo, la proteina viene espressa nel neuropilo, dove partecipa al differenziamento e alla maturazione funzionale delle sinapsi [25]. Il soma neuronale, i dendriti, i bulbi assonali, la glia e le cellule endoteliali invece, mostrano un basso livello di espressione. Dopo ischemia, la proteina tende a scomparire piuttosto tardivamente rispetto ad altri marcatori proteici, sia nell'emisfero ischemico coinvolto, che in quello controlaterale alla lesione, in quest'ultimo soprattutto nello strato molecolare del giro dentato.

La sinapsina I è stata studiata durante l'ipossia-ischemia cerebrale neonatale nel ratto, indotta unilateralmente attraverso occlusione della carotide sinistra e rilevata nei sinaptosomi, mediante elettroforesi ed *immunoblotting* [19]. L'analisi biochimica non mostra cambiamenti significativi dell'espressione nell'emisfero ischemico rispetto a quello normale. Tuttavia l'analisi della fosforilazione della sinapsina I decresce dopo ventuno ore sia nell'emisfero ischemico che in quello normale, dopo una settimana questa diminuzione risulta ancora più evidente e dopo un mese è rilevabile soltanto nell'emisfero ischemico per scomparire totalmente dopo tre mesi. Ulteriori esperimenti di ischemia cerebrale, con occlusione della carotide destra sono stati condotti sul cervello del gerbillo [26]. Nell'emisfero ischemico, l'immunoreattività della sinapsina inizia a scomparire dal talamo, dopo un giorno; dopo tre giorni non si osserva più nell'ippocampo, nella corteccia cerebrale e nella parte dorsale del *caudato-putamen*, per poi scomparire, dopo un mese, in tutto l'emisfero destro. Nell'emisfero non ischemico dopo tre giorni dall'ischemia si verifica un danno selettivo e quindi ha inizio una nuova sinaptogenesi nello strato molecolare del giro dentato. In tale emisfero vengono chiaramente rilevati sia una perdita di circa un terzo dell'immunoreattività della proteina, dovuta al danno selettivo delle terminazioni presinaptiche di questa regione, che un suo successivo recupero a seguito della sinaptogenesi *ex novo*. L'analisi biochimica mediante immunoblot, effettuata dopo 24 ore dall'episodio ischemico conferma i dati dell'immunoistochimica.

Sempre sul gerbillo, è stato condotto uno studio immunoistochimico, mediante occlusione "bilaterale" della carotide [24]. L'ischemia prodotta sperimentalmente, induce la morte cellulare sia dei neuroni piramidali dell'ippocampo che di quelli del giro dentato e dell'ilo, determinando un decremento dell'immunoreattività della proteina, soprattutto nella zona più interna

dello strato molecolare del giro dentato. Dopo due-quattro ore e fino ad una settimana dall'ischemia, l'immunoreattività rilevata subisce un aumento nelle terminazioni nervose dell'ilo e dello *stratum lucidum* nell'area CA3, come rilevato dall'analisi densitometrica che mostra un incremento della densità ottica del 200 per cento. Dopo una settimana, l'immunoreattività inizia a decrescere nella zona più interna dello strato molecolare e successivamente tale diminuzione tende ad estendersi anche alle terminazioni nervose dell'ilo e dello *stratum lucidum* dell'area CA3, fino a raggiungere i livelli dei controlli. Successivamente anche i livelli di immunoreattività della sinapsina nella zona più interna dello strato molecolare, tornano ad eguagliare i livelli tipici degli animali di controllo.

SNAP-25 (*synaptosomal-associated protein of 25 kDa*)

Anche la SNAP-25, coinvolta nell'ontogenesi, è inducibile in seguito ad un danno ipossico. La proteina, associata ai sinaptosomi, con un peso molecolare di 25 kDa fu inizialmente identificata come specifica dei neuroni [15]. La sua espressione, elevata durante la sinaptogenesi, risulta principalmente localizzata nei terminali nervosi e negli assoni [16]. La proteina, componente essenziale del meccanismo di esocitosi che conduce al rilascio del neurotrasmettitore, forma un complesso eterotrimerico, sia legandosi alla sinaptobrevina, presente sulla vescicola nella quale è contenuto il neurotrasmettitore, che alla syntaxina ancorata alla membrana plasmatica pre-sinaptica. Tale complesso, in presenza di ATP, si dissocia attivando una cascata di eventi che determina la fusione della vescicola sinaptica alla membrana pre-sinaptica [27].

Durante la fase iniziale dello sviluppo, il livello di espressione della SNAP-25 è molto basso, aumenta con la formazione delle sinapsi, per essere espressa in seguito, in modo rilevante, nei coni di crescita assonali [28]. La proteina, trasportata nelle terminazioni nervose pre-sinaptiche, svolge un ruolo chiave nella formazione e nella stabilizzazione delle terminazioni stesse [29]. La sua espressione è stata studiata mediante immunostochimica, nel gerbillo, dopo rapida induzione di ischemia cerebrale transitoria (5 min) effettuata mediante l'occlusione "bilaterale" della carotide [14].

In condizioni normali la SNAP-25 è rilevabile nell'ippocampo, ed in particolare, nel neuropilo dell'area CA1, all'interno dello strato muscoide e nello *stratum lucidum*. Dopo un giorno dall'induzione dell'ischemia, l'immunoreattività della SNAP-25 aumenta nello *stratum lucidum* e quindi la sua osservazione, dopo due, quattro ore e dopo una settimana, mostra il suo maggiore incremento nello strato muscoide più interno dell'ilo. Dopo una settimana, l'immunoreattività decresce nello strato molecolare del giro dentato, in seguito alla morte

dei neuroni dell'ilo che proiettano le innervazioni in questa area. A distanza di due settimane dalla lesione, la proteina aumenta in corteccia e nell'ippocampo, in particolare nello *strato oriens* e nel *radiatum*, oltre che nel giro dentato, indicando un reinnervamento dello strato molecolare.

Il pattern di immunoreattività osservato nel gerbillo è molto simile a quello descritto nei ratti e nei topi [16, 30], mentre non sono disponibili, al momento, dati relativi all'espressione della proteina nel cervello umano.

GAP-43 (*growth associated protein - 43*)

Solo dalla metà degli anni ottanta si giunse a comprendere che una serie di studi iniziati da un decennio riguardanti fosfo-proteine note come B-50, F1, neuromodulina, pp46 e GAP-43 avevano come protagonista un'unica proteina sinaptica implicata sia negli eventi dello sviluppo, sia nei cambiamenti di plasticità neurale del cervello maturo [31].

La GAP-43 è una proteina di 43 kDa strettamente associata allo strato citoplasmatico delle membrane terminali dei neuroni [32]. Essa è attualmente considerata il maggior substrato della protein-chinasi C nei compartimenti presinaptici ed è stato riportato che in risposta al fenomeno neuro-fisiologico del potenziamento a lungo termine (LTP) [33], può subire variazioni persistenti dello stato di fosforilazione. La proteina si lega alla calmodulina [34], con insolita modalità Ca^{2+} -indipendente e probabilmente, forma legami anche nei coni di crescita degli assoni [35] con due proteine del citoscheletro: l'actina e la spettrina. La GAP-43 regola, inoltre, l'inibizione di una classe di proteine G, che rappresenta uno degli eventi precoci nell'attivazione della crescita assonale [36, 37].

Esperimenti condotti su modelli animali hanno mostrato il ruolo fisiologico chiave svolto dalla proteina nella crescita e nell'arborizzazione dell'assone; infatti in topi transgenici l'inattivazione funzionale del gene, prodotta da mutazioni e delezioni, impedisce il corretto orientamento degli assoni [38], mentre l'espressione della proteina, oltre i livelli usuali, provoca una loro eccessiva arborizzazione [39].

In risposta ad eventi di tipo ipossico-ischemico è stato osservato un significativo incremento dei livelli d'espressione della GAP-43. Tale incremento è riconducibile alla capacità dei neuroni resistenti allo stimolo degenerativo di avviare un processo parzialmente compensatorio che è alla base del meccanismo di plasticità del sistema nervoso, di cui la proteina è un marcatore riconosciuto.

L'espressione di RNA messaggero della GAP-43 può essere normalmente osservabile in aree specifiche dell'ippocampo di ratto (CA1, CA2, CA3, ilo). Tuttavia,

in seguito all'induzione di ischemia globale è stato evidenziato un moderato ma precoce aumento di RNA messaggero sia nei neuroni dell'ilo che nelle cellule granulari del giro dentato [17]. I neuroni dell'area CA3, resistente alla degenerazione cellulare, dopo 3-5 giorni dallo stimolo ischemico mostrano un incremento analogo che suggerisce nuovamente un possibile meccanismo di tipo plastico necessario nel recupero delle connessioni assoniche nell'area CA1, dove si verifica, come precedentemente descritto, la completa scomparsa delle cellule neuronali.

Esperimenti di ischemia focale indotta nell'area parietale della corteccia, mostrano nel *nucleus basalis magnocellularis*, un aumento transitorio dei livelli di RNA messaggero della GAP-43, incremento che rimane ancora rilevante dopo una settimana dalla lesione [40]. Nel talamo, è osservabile un aumento analogo che tuttavia resta significativo soltanto nei primi tre giorni post-trauma. Anche le aree corticali limitrofe alla lesione presentano un incremento dei livelli di trascritto nei neuroni piramidali del quinto strato, che raggiunge il suo apice in tre giorni e resta rilevabile per due settimane.

Studi eseguiti mediante lesioni corticali hanno evidenziato un aumento dell'immunoreattività della GAP-43, nell'area che delimita il bordo della lesione ischemica (penombra) dopo tempi brevissimi d'induzione (sei ore) [41]. L'immunoreattività risulta localizzata sia nel soma cellulare, indice della neosintesi proteica, che nei coni d'emergenza degli assoni.

L'incremento simultaneo dell'espressione di altre proteine quali la MAP2 e la Ciclina D1, nella medesima area, può suggerire che tali variazioni siano parte di un tentativo di riparazione del danno cellulare, per preservare i neuroni parzialmente danneggiati. Alcuni autori basandosi su tali evidenze sostengono l'ipotesi che, in seguito al danno cellulare, i neuroni sembrano regredire ad uno stadio primitivo dello sviluppo neurale, con riattivazione di quelle proteine funzionalmente attive durante il ciclo cellulare ed espresse, normalmente, prima del differenziamento [41].

MAP 2 (*microtubule associated protein 2*)

La proteina associata ai microtubuli 2 o MAP2 è attualmente considerata un marcatore del danno neuronale dendritico. Inizialmente venne identificata come una proteina strutturale necessaria, con gli altri componenti intracellulari quali l'actina, i neurofilamenti, ed i mitocondri, per mantenere la neuroarchitettura [42]. Risulta costituita da una coppia di polipeptidi del peso molecolare di 280 kDa (MAP2a e MAP2b) e da un'altra isoforma, meno abbondante nel cervello in sviluppo, di 70 kDa (MAP2c).

In condizioni normali la MAP2 è confinata nei neuroni; la sua espressione risulta maggiore nei dendriti, dove appare sia nell'albero dendritico e nelle spine

sinaptiche [43], che nei corpi cellulari [44], mentre è assente negli assoni [45]. La proteina sembra consolidare i processi neuronali [46] oltre a rappresentare un sito di legame sia per la protein chinasi cAMP dipendente [47, 48], sia per una chinasi calcio/calmodulina dipendente [49] enzimi responsabili della fosforilazione della MAP2, che potrebbero rivestire un ruolo fondamentale nel segnale del neurotrasmettitore [45].

La MAP2 è considerata un utile marcatore immunostochimico per lo studio dei terminali post-sinaptici e dei cambiamenti patologici osservati nei dendriti e nei corpi cellulari. Infatti, gli studi condotti indicano che le modificazioni ed il riarrangiamento della proteina possono monitorare una fase precoce indispensabile per l'avvio di numerosi processi che tendono a modificare la funzione neuronale. Come suggerito da numerosi esperimenti di danno ischemico, la proteina risulta essere un marcatore molto sensibile per tale tipo di danno [50-55]. Infatti, la perdita della MAP-2 può essere coinvolta nella fase iniziale della disfunzione neuronale e nella scomparsa dell'arborizzazione dendritica che può essere considerata, generandosi soltanto un'ora dopo l'ischemia cerebrale, un primo precoce segno di neurodegenerazione.

In particolare, la proteina è stata studiata in un modello di danno ipossico-ischemico "neonatale" nel ratto di sette giorni, la cui maturità cerebrale corrisponderebbe a quella del feto umano a termine. L'esperimento consiste nell'induzione ischemica "unilaterale", mediante occlusione della carotide sinistra seguita dall'osservazione dell'immunocolorazione della proteina dopo tre-tre ore e dopo uno-tre giorni dall'ischemia [56]. L'immunoreattività della MAP2, osservata in ratti appena nati rivela alterazioni precoci della proteina, soprattutto nella regione CA3 dell'ippocampo che normalmente, nei ratti adulti, non risulta vulnerabile al danno. Nella corteccia, la scomparsa della proteina è evidente già dopo tre ore, con una caratteristica colorazione "a colonna".

La perdita della MAP2 progredisce, quindi, nel tempo, in termini sia di dimensioni dell'area coinvolta che di intensità dell'immunocolorazione. Questo dato farebbe supporre una regressione rapida e transiente dell'immunoreattività della proteina da collegarsi alla perdita di antigenicità della MAP2 causata da fattori quali la fosforilazione della proteina stessa, tipica dell'età neonatale. Una perdita maggiore è rilevabile dopo tre giorni dall'induzione dell'ipossia-ischemia [57] mentre la sua scomparsa permanente è correlabile al danno citoscheletrico nei neuroni [51].

L'espressione della MAP2 è stata osservata con tecniche di immunocolorazione anche in un modello animale di ratto adulto. Dopo una rapida induzione di ischemia, l'immunoreattività della proteina risulta diminuita nella corteccia cerebrale, nell'ippocampo e nel talamo dell'emisfero ipsilaterale. La sua perdita è massima a settantadue ore dall'ischemia soprattutto nel

giro dentato e nella regione CA1. L'emisfero contralaterale, invece, non presenta alterazioni immunostochimiche nell'espressione della proteina. In particolare sono stati rilevati due differenti tipi di danno neuronale, uno "reversibile" e l'altro di tipo "irreversibile". Il primo consiste nella perdita precoce della MAP2, mentre il secondo tipo è da correlarsi ad alterazioni simili che si verificano in uno stadio più tardivo e associabili alla morte neuronale che provoca la perdita delle sinapsi [58].

β -APP

La proteina precursore della β -amiloide (β -APP) è una glicoproteina transmembrana di tipo 1 espressa, preferenzialmente, nel cervello. Nell'uomo la proteina è codificata da un singolo gene sul cromosoma 21 che genera numerose isoforme a seguito di un taglio alternativo del suo RNA messaggero.

Le forme secrete di β -APP rilasciate nell'ambiente extracellulare sono di due tipi: quelle che presentano la regione KPI (*Kunitz-type protease inhibitor*), APP₇₅₁ e APP₇₇₀ e quelle in cui questa regione è assente (APP₆₉₅ e APP₇₁₄). La forma neuronale dell'APP è quella costituita da 695 aminoacidi (APP 695). Come osservato da numerosi studi, tali isoforme mostrano localizzazioni diverse [59, 60] e la loro induzione, in risposta all'insulto ipossico-ischemico, avviene in maniera differente. Dopo ischemia, infatti, le isoforme contenenti la regione KPI subiscono un incremento della loro espressione che contribuisce, probabilmente, alla rigenerazione neuronale, mentre le altre due diminuiscono in relazione alla perdita neuronale.

Il precursore dell'amiloide, dopo essere stato sintetizzato, viene inviato, con trasporto assonale veloce [61], alle terminazioni nervose e localizzato nelle membrane sinaptiche dove svolge il ruolo di neuromodulatore. Inoltre nei neuroni ippocampali e in quelli corticali la β -APP ha un'attività protettiva contro gli insulti eccitotossici, attraverso un meccanismo che coinvolge la stabilizzazione dei livelli del calcio [62].

In seguito al danno ischemico l'espressione della β -APP aumenta soprattutto nei neuroni e negli astrociti, in relazione a vari meccanismi. Inizialmente la proteina aumenta a causa dell'incremento della sua sintesi o per diminuzione dell'efficienza del turn-over nei neuroni vulnerabili e negli astrociti della regione danneggiata. In un secondo momento l'APP è rilasciata dai neuroni degenerati e dagli astrociti vicini alla regione che ha subito l'insulto ischemico. Infine la β -APP aumenta nelle cellule del sangue come ad esempio le piastrine e viene trasportata dagli astrociti perivascolari [62]. In alcuni lavori è stato rilevato che la sovra-espressione di β -APP, indotta dall'insulto ipossico-ischemico nello strato di cellule piramidali produce neurotossicità [63, 64] mentre in altri casi promuove la neuroprotezione e la crescita

neuritica [65-67]. Un'ipotesi che potrebbe spiegare questa discrepanza funzionale è che l'APP, prodotta sia nelle cellule resistenti che in quelle vulnerabili, potrebbe svolgere ruoli diversi a seconda del grado di espressione del suo gene: livelli moderati di APP, favorirebbero la sopravvivenza del neurone, mentre alti livelli ne indurrebbero la morte cellulare per apoptosi.

L'espressione della β -APP è stata studiata nei cervelli di neonati umani e di ratto dopo insulto ipossico-ischemico, mediante *western blotting* ed immunostochimica [68]. Nel cervello dei neonati umani l'espressione della proteina inizia ad aumentare circa 24 ore dopo l'insulto ipossico-ischemico fino a raggiungere i livelli più elevati dopo 3 giorni dal danno cerebrale indotto. Questo incremento non è stato osservato soltanto nell'area danneggiata del cervello, ma anche in quella apparentemente non colpita da ischemia. Sembra quindi che l'induzione di β -APP sia frutto di una risposta adattativa del cervello neonatale al danno ipossico-ischemico.

Nei ratti, l'analisi biochimica mediante *western blotting* è stata studiata nella corteccia cerebrale, nello striato e nell'ippocampo dopo quattro-dodici ore dalla lesione e fino a tre giorni dal danno. È stato osservato che la proteina inizia ad aumentare dopo due ore, raggiungendo i suoi livelli più alti dopo un giorno dall'insulto ischemico.

L'espressione della β -APP è stata osservata anche nell'ippocampo del gerbillo [69] dopo induzione di ischemia cerebrale mediante occlusione bilaterale della carotide. Inizialmente si osserva una morte cellulare neuronale accompagnata da ipertrofia degli astrociti nei quali l'immunoreattività della β -APP risulta molto debole. Dopo una-quattro settimane dall'insulto ipossico-ischemico, gli astrociti, ormai iperplastici, mostrano una forte immunoreattività contro la β -APP, suggerendo che l'espressione della proteina sia associata alla proliferazione astrocitaria [70].

Le preseniline 1 e 2

Identificate nel 1995 in seguito agli studi riguardanti una forma ad insorgenza particolarmente precoce della malattia di Alzheimer di tipo familiare, le preseniline 1 e 2 (PS1, PS2) sono codificate rispettivamente dai geni: S182 sul cromosoma 14 [71] e STM2 [72] sul cromosoma 1. Le due proteine integrali di membrana presentano un'omologia di sequenza del 67% ed entrambe sono divise in due frammenti ammino e carbossi-terminali di 30 e 18 kDa [73, 74] mediante un processo proteolitico non ancora ben caratterizzato.

L'iniziale localizzazione delle preseniline nel reticolo endoplasmatico ed in misura minore nel compartimento del Golgi ha permesso di elaborare modelli strutturali che prevedono da sette a nove domini trans-membrana oltre ad un *loop* idrofilico con i domini ammino e

carbossi-terminali orientati verso il citoplasma [75, 76]. Più recentemente studi immunocitochimici hanno rivelato che ambedue le proteine sono presenti sulla membrana plasmatica [77] in particolare nei compartimenti pre e post-sinaptici dei neuroni, anche se non è stato ancora definito se si tratti delle forme intere o di frammenti proteolitici [78].

Le preseniline sono espresse in una notevole varietà di tessuti ed organi [79] ed in particolare nel tessuto cerebrale embrionale ed in quello adulto, nel quale sono coinvolte nel processamento del precursore dell'amiloide [80]. Sebbene le funzioni fisiologiche rimangono fondamentalmente sconosciute, numerosi studi hanno assegnato alle due proteine un ruolo nella regolazione dei segnali intracellulari durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale [81], nel mantenimento dell'omeostasi dello ione Ca^{2+} [82] e nel fenomeno dell'apoptosi [83].

La funzione primaria svolta dalla PS1 durante l'embriogenesi [84] è stata in parte rivelata dagli studi condotti in topi *knock-out* (PS1 $-/-$) nei quali viene impedita la normale espressione della proteina. Gli animali PS1 $-/-$ muoiono prima o immediatamente dopo la nascita a causa di gravi difetti nella formazione dei somiti e dell'apparato scheletrico associati ad emorragie cerebrali. In tali modelli è stata documentata la diminuzione dell'espressione di importanti fattori per la trasduzione del segnale intracellulare (Notch e delta), da cui deriva l'ipotesi secondo la quale la PS1 rivestirebbe una funzione diretta o indiretta in queste vie di trasduzione [85, 86]. Nonostante le dimostrazioni che avvalorano il ruolo funzionale della presenilina nell'ontogenesi, sorprendentemente, la più alta espressione della PS1 è stata registrata nel cervelletto e nell'ippocampo, dieci giorni dopo la nascita. Tale dato suggerirebbe il coinvolgimento della PS1 in almeno due processi distinti rispettivamente attivi durante l'embriogenesi e lo sviluppo postnatale del sistema nervoso centrale [87].

Modelli transgenici *in vitro* ed *in vivo* sottoposti ad ipossia-ischemia hanno mostrato che l'espressione della presenilina 1 mutata induce una vulnerabilità statisticamente maggiore in risposta a stimoli pro-apoptotici, rispetto all'espressione della proteina nativa [88, 82]. In particolare colture cellulari transgeniche, poste in condizioni di ipossia e con riduzione di glucosio nel terreno di crescita, mostrano una soglia di sensibilità alla mancanza di ossigeno significativamente minore con aumento della mortalità cellulare. Anche gli esperimenti *in vivo* di ischemia focale cerebrale che utilizzano modelli transgenici mutati per la presenilina 1 mostrano un danno tissutale più severo ed un recupero comportamentale meno efficace, rispetto ai controlli che non esprimono PS1 mutata [89]. I modelli transgenici suddetti, inoltre, hanno permesso di dimostrare che la concentrazione degli ioni calcio, dopo induzione di stimoli ipossico-ischemici, dipende dalla presenza di mutazioni nella sequenza della PS1. L'effetto della presenilina

sull'omeostasi del calcio deriva, probabilmente, dall'interazione diretta con il recettore per la rianodina o proteine associate, che potrebbe svolgere un ruolo nel meccanismo precoce di attivazione dei processi apoptotici [90].

L'ipossia induce l'espressione di un fattore di trascrizione relativamente raro, l'HIF-1, che a sua volta implementa l'espressione della presenilina 2 legandosi a siti multipli presenti nel promotore del gene STM2. Infatti colture cellulari ipossiche di retina derivate da neonati di ratto mostrano un notevole aumento del legame del fattore HIF-1 al DNA, seguito da un incremento dell'RNA messaggero di PS2 che resta sovra-espresso per due-sette giorni [91]. Sempre in condizioni di stress ipossico si è potuta dimostrare l'espressione di un'isoforma della presenilina 2 in colture cellulari di neuroblastoma, analogamente a quanto avviene nei cervelli di pazienti Alzheimer; tale isoforma osservabile solo dopo ipossia, non compare in risposta a nessun altro tipo di induzione [92].

Esperimenti su modelli animali hanno permesso di osservare che l'induzione dello stress ipossico-ischemico produce, nei confini dell'area colpita da infarto, un accumulo di epitopi della presenilina 1 e 2 rilevabili nelle cellule della glia [93]. Il fenomeno sembrerebbe non derivare dall'attività macrofagica, ma da un aumento dell'espressione endogena della glia attivata. Tale considerazione è avvalorata dalla presenza di frammenti N-terminali di entrambe le preseniline nella microglia, mentre gli astrociti risultano positivi solo verso gli anticorpi specifici contro la sequenza aminoacidica del loop idrofilico della presenilina 1.

Il ruolo effettivo svolto dalle preseniline negli eventi ipossico-ischemici deve essere ulteriormente approfondito considerando anche i risultati che indicano un aumento dell'espressione di PS1 nei neuroni resistenti all'ischemia focale dello strato CA3 e del giro dentato, indotta nel sistema nervoso centrale del gerbillo della Mongolia [94].

In conclusione mentre numerosi esperimenti sembrano suggerire un possibile coinvolgimento della presenilina 1 nei meccanismi di recupero della lesione ipossico-ischemica, la presenilina 2 potrebbe rivelarsi un possibile target per contrastare l'instaurarsi di meccanismi di morte cellulare programmata che caratterizzano l'evento ipossico-ischemico.

NCAM (*neural cell adhesion molecule*)

La NCAM, una delle circa 160 proteine che appartengono alla super-famiglia delle immunoglobuline [95] è considerata un elemento di notevole importanza nell'ontogenesi del sistema nervoso per il suo coinvolgimento in molteplici eventi quali lo sviluppo assonale, la crescita neuritica e la fascicolazione nervosa

[96, 97]. La sequenza aminoacidica della NCAM è codificata da un unico gene del quale sono note tre isoforme principali, ottenute per *splicing* alternativo (NCAM 180, 140 e 120) [98]. Tutte le isoforme sono caratterizzate dalla presenza di cinque domini Ig-simili e due fibronectina di tipo III, mentre, soltanto l'isoforma 120 risulta priva del dominio trans-membrana pur rimanendo legata alla membrana plasmatica mediante un ponte glicosilico con un fosfatidilinositolo [99]. Le interazioni cellula-cellula mediate dalla proteina possono essere di tipo omofilico od eterofilico; nelle prime i legami inter-cellulari vengono stabiliti tra due molecole di NCAM; nelle altre il partner è costituito da numerose proteine tra le quali sono state identificate la L1 [100], la TAG-1/axonina 1 [101] ed il recettore per il fattore di crescita dei fibroblasti (FGFr) [102].

La variabilità della proteina di adesione neurale viene ulteriormente incrementata da modificazioni post-traduzionali [103]. In particolare, due siti di N-glicosilazione posti nel quinto dominio Ig-simile [104] sono considerati estremamente interessanti in quanto costituiscono il sito di legame d'elezione per l'acido polisialico [105], un omopolimero α 2-8 dell'acido N-acetilneuroaminico [106]. Le catene di tale acido conferiscono alcune caratteristiche peculiari alla PSA-NCAM per l'ingombro sterico e la carica elettrica negativa di cui sono dotate. Quella che viene definita la forma embrionale della NCAM [107], infatti, rispetto alle forme non polisialicate, risulta caratterizzata da una maggiore dinamica nell'interazione cellula-cellula e cellula-matrice, particolarmente utile durante l'ontogenesi quando, per assecondare le trasformazioni morfologiche dello sviluppo sono necessari legami facilmente modificabili. La forma embrionale della NCAM rimane espressa nel cervello adulto in alcune aree ben circoscritte come la neuroipofisi [108], i bulbi olfattivi [109], la retina [110] e nei neuroni dello strato delle cellule granulari dell'ippocampo [111]. Questi distretti del sistema nervoso centrale mantengono la capacità di effettuare cambiamenti strutturali e funzionali anche in età adulta, conservando una intrinseca attività neuroplastica. L'espressione della PSA-NCAM è incrementata nei neuroni e nelle cellule gliali in risposta ai fenomeni di plasticità sinaptica alla base dell'apprendimento [112] e del consolidamento mnemonico [113] e nel corso del rimodellamento neurale prodotto da alcune tipologie di trauma cerebrale. Esperimenti di lesione condotti sulla corteccia entorinale [114] hanno permesso di individuare, dopo quindici ore dalla resezione degli assoni corticali, un aumento della concentrazione della forma embrionale della NCAM nel citoplasma dei dendriti neuronali dello strato granulare che attraversano lo strato molecolare interno nell'ippocampo. Dopo quarantotto ore l'immunoreattività prodotta dalle nuove proteine si trasferisce nello strato molecolare esterno cui afferiscono i dendriti. In quest'ultima area in seguito alla lesione, in circa due giorni, si verifica la perdita dell'85% delle

sinapsi [115]. Dopo trenta giorni la PSA-NCAM è ancora sovra-espressa sulle membrane plasmatiche delle afferenze dello strato molecolare esterno, mentre la densità sinaptica della regione ha recuperato il cinquanta per cento del valore iniziale [116].

Esperimenti di ischemia globale condotti sul gerbillo della Mongolia hanno evidenziato un moderato incremento dopo 1-2 giorni della proteina polisialilata nelle cellule dello strato granulare dell'ippocampo [117]. In particolare, a partire dal quinto giorno post-trauma, l'immunoreattività verso la NCAM diminuisce in modo significativo nei neuroni, mentre l'astroglia dei processi radiali, presenta ancora sovra-espressione, dopo 35 giorni dal trauma ischemico.

Il significato dell'aumento delle forme 120/140 della NCAM, caratteristiche della glia, dopo l'ipossia-ischemia, non è ancora stato compreso in modo esaustivo, anche se esistono alcune evidenze di un suo coinvolgimento nel supporto alla crescita assonale [118].

Conclusioni

La risposta cerebrale all'ischemia è data dal bilanciamento tra l'attivazione di meccanismi neuroprotettivi endogeni e cambiamenti neurodistruttivi che aumentano la probabilità della morte cellulare. Tali processi contrapposti sono ulteriormente influenzati dalla regolazione dell'espressione genica. D'altra parte l'aumentato livello di alcune proteine, può limitare la perdita cellulare oltre ad attivare un meccanismo di riparo che influisce sul recupero del danno subito da parte del cervello.

Il danno ipossico ischemico favorisce, come dimostrato dagli esempi dei vari marcatori proteici passati in rassegna, una modificazione dell'espressione quantitativa e funzionale delle proteine coinvolte. Da una parte si osserva la produzione selettiva di particolari isoforme come nel caso dell'APP (APP₇₅₁) e della PS2, dall'altra l'induzione di modificazioni post-traduzionali che ne cambiano l'attività (fosforilazione della sinapsina I e polisialilazione della N-CAM), adattandola alle nuove necessità di recupero funzionale e strutturale del tessuto danneggiato.

L'ipossia-ischemia perinatale presenta ancora alcuni meccanismi che non sono stati messi in luce in maniera adeguata. Quello che emerge dalla lettura critica delle evidenze riportate è una sostanziale carenza di informazioni sull'attività delle proteine esaminate che sono state quasi esclusivamente studiate sperimentalmente nell'adulto. I meccanismi biomolecolari di degenerazione neuronale e recupero funzionale nei due processi potrebbero però non differire in maniera sostanziale ed anzi nell'adulto, in seguito alla lesione ipossico-ischemica si è da più parti osservata una regressione del tessuto nervoso ad uno stadio parzialmente simile a quello embrionale. In definitiva

l'ipotesi che le proteine attive durante l'ontogenesi conservino un ruolo nella fase successiva al danno ipossico-ischemico potrebbe rivelarsi tanto più vera nel caso dell'ipossia perinatale.

In conclusione i processi coinvolti nel cambiamento di espressione delle proteine associate alla plasticità sinaptica, necessitano attualmente di una maggiore comprensione, perché il loro studio potrebbe fornire una preziosa chiave di lettura per aumentare le informazioni disponibili sia sulle funzioni fisiologiche svolte dalle stesse proteine, talvolta ancora ignote, sia sulla regolazione sistemica di un evento necessariamente complesso quale il recupero della funzionalità del tessuto nervoso.

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

- Lutz PL, Nilsson GE, Perez-Pinzon MA. Anoxia tolerant animals from a neurobiological perspectives. *Comp Biochem Physiol* 1996;113B:3-13.
- Du Plessis AJ, Johnston MV. Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn: cellular mechanisms and potential strategies for neuroprotection. *Clin Perinatol* 1997;24:627-54.
- Vannucci RC, Perlman JM. Intervention for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 1997;100:1004-14.
- Singer D. Neonatal tolerance to hypoxia: a comparative-physiological approach. *Comp Biochem Physiol* 1999;123:221-34.
- King TA, Jackson GL, Josey AS. The effect of profound umbilical artery acidemia in term neonates admitted to a newborn nursery. *J Pediatr* 1998;132:624-9.
- Crain BJ, Westerkam WD, Harrison AH, Nadler JV. Selective neuronal death after transient forebrain ischemia in the mongolian gerbil: a silver impregnation study. *Neuroscience* 1988;27:387-402.
- Ito U, Spatz M, Walker JT, Klatzo I. Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. *Acta Neuropathol* 1975;32:209-23.
- Kirino T. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* 1984;62:201-8.
- Schmidt-Kastner R, Freund TF. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 1991;40:599-636.
- Johansen FF, Zimmer J, Dimer MH. Early loss of somatostatin neurons in dentate hilus after cerebral ischemia in the rat precedes CA-1 pyramidal cell loss. *Acta Neuropathol* 1987;79:110-4.
- Dessi F, Colle MA, Hauw JJ, Duyckaerts C. Accumulation of SNAP-25 immunoreactive material in axons of Alzheimer's disease. *Neuroreport* 1997;8(17):3685-9.
- Mukaetova-Ladinska EB, Garcia-Siera F, Hurt J, Gertz HJ, Xuereb JH, Hills R, Brayne C *et al.* Staging of cytoskeletal and beta amyloid changes in human isocortex reveals biphasic synaptic protein response during progression of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 2000;157(2):623-36.
- Sokolov BP, Tcherepanov AA, Haroutunian V, Davis KL. Levels of mRNAs encoding synaptic vesicle and synaptic plasma membrane proteins in the temporal cortex of elderly schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 2000;1;48(3):184-96.
- Marti E, Ferrer I, Ballabriga J, Blasi J. Increase in SNAP-25 immunoreactivity in the mossy fibers following transient forebrain ischemia in the gerbil *Acta Neuropathol* 1998;95:254-60.
- Oyler GA, Higgins GA, Hart RA, Battemberg ML, Billingsley M, Bloom FE, Wilson WC. The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Biol* 1989;109:3039-52.
- Geddes JW, Hess EJ, Hart RA, Kesslak JP, Cotman CW, Wilson MC. Lesion of hippocampal circuitry define synaptosomal-associated protein-25 (SNAP-25) as a novel presynaptic marker. *Neuroscience* 1990;38:515-25.
- Schmidt-Kastner R, Bedard A, Hakim A. Transient expression of GAP-43 within the hippocampus after global brain ischemia in rat. *Cell Tiss Res* 1997;288:225-38.
- Tagaya M, Matsuyama T, Nakamura H, Hata R, Shimizu S, Kiyama H, Matsumoto M, Sugita M. Increased F1/GAP-43 mRNA accumulation in the gerbil hippocampus after brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995;15:1132-5.
- Moretto MB, de Mattos-Dutra A, Arteni N, Meirelles R, Sampaio de Freitas M, Netto AC, Pessoa-Pureur R. Effects of neonatal cerebral hypoxia-ischemia on the *in vitro* phosphorylation of Synapsin I in rat synaptosomes. *Neurochem Res* 1999;24(10):1263-9.
- Petrucci T, Macione P, Paggi P. Axonal transport kinetics and posttranslational modification of synapsin I in mouse retinal ganglion cells. *J Neurosci* 1991;11(9):2938-46.
- Harada A, Sobue K, Hirokawa N. Developmental changes of synapsin I subcellular localization in rat cerebellar neurons. *Cell Struct Funct* 1990;15:329-42.
- Hirokawa N, Sobue Kanda K, Harada A, Yorifuji H. The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin I. *J Cell Biol* 1989;108:111-26.
- Hirokawa N. Molecular architecture and dynamics of the neuronal cytoskeleton. In: Burgoyne RD (Ed.). *The neuronal cytoskeleton*. New York: Wiley-Liss; 1990. p. 5-74.
- Marti E, Ferrer I, Blasi J. Transient increase of synapsin-I immunoreactivity in the mossy fiber layer of the hippocampus after transient forebrain ischemia in the Mongolian gerbil. *Brain Res* 1999;824:153-60.
- Melloni RH, De Gennaro LJ. Temporal onset of synapsin-I gene expression coincides with neuronal differentiation during the development of the nervous system. *J Comp Neurol* 1994;342:449-62.

26. Kitagawa K, Matsumoto M, Sobue K, Tagaya M, Okabe T, Niinobe M, Ohtsuki T *et al.* The synapsin I brain distribution in ischemia. *Neuroscience* 1992;46:287-99.
27. Grosse G, Grosse J, Tapp R, Kuchinke J, Gorsleben M, Fetter I, Hönhe Tapp R *et al.* SNAP 25 requirement for dendritic growth of hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 1999;56:539-46.
28. Osen-Sand A, Catsicas M, Staple JK, Jones KA, Ayala G, Knowles J, Grenningloh G *et al.* Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides *in vitro* and *in vivo*. *Nature* 1993;364:445-8.
29. Roberts AL, Morris BJ, O'Schaughnessy TC. Involvement of two isoforms of SNAP-25 in the expression of long-term potentiation in the rat hippocampus. *Molec Neurosci* 1998;9:33-6.
30. Onodera H, Aoki H, Yae T, Kogure K. Post-ischemic plasticity in the rat hippocampus after long-term survival: histochemical and autoradiographic study. *Neuroscience* 1990;38:125-36.
31. Benowitz LI, Routtenberg A. A membrane phosphoprotein associated with neural development, axonal regeneration, phospholipid metabolism, and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 1987;10:527-32.
32. Skene H. Axonal growth-associated proteins. *Ann Rev Neurosci* 1989;12:127-56.
33. Lovinger DM, Colley PA, Akers RF, Nelson RB, Routtenberg A. Direct relation of long-term synaptic potentiation to phosphorylation of membrane protein F1, a substrate for membrane protein kinase C. *Brain Res* 1986;399:205-11.
34. Cimlir BM, Giebelhaus DH, Wakim BT, Storm DR, Moon RT. Characterization of murine cDNAs encoding P57, a neural-specific calmodulin-binding protein. *J Biol Chem* 1987;262:12158-63.
35. Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *TINS* 1997;2:84-91.
36. Strittmatter S, Valenzuela D, Kennedy TE, Neer EJ, Fishman MC. G0 is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43. *Nature* 1990;344: 836-41.
37. Strittmatter S, Valenzuela D, Vartanian D, Sudo Y, Zuber M, Fishman MC. Growth cone transduction: G0 and GAP-43. *J Cell Sci* 1991;15:27-33.
38. Strittmatter S, Fankhauser C, Huang PL, Mashimo H, Fishman MC. Neuronal pathfinding is abnormal in mice lacking the neuronal growth cone protein GAP-43. *Cell* 1995;80:445-52.
39. Aigner L, Arber S, Kapfhammer J, Laux T, Schneider C, Botteri F, Brenner HR *et al.* Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system in transgenic mice. *Cell* 1995;83:269-78.
40. Figueiredo BC, Skup M, Bedard AM, Tetzlaff W, Cuello AC. Differential expression of p140trk, p75 and growth-associated phosphoprotein-43 genes in nucleus basalis magnocellularis, thalamus and adjacent cortex following meocortical unarction and nerve growth factor treatment. *Neuroscience* 1995;98(1): 29-45.
41. Li Y, Jiang N, Powers C, Chopp M. Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated protein 2, growth-associated protein 43, and cyclin D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1998;29:1972-81.
42. Wiche G. High-M_r microtubule-associated proteins: properties and functions. *Biochem J* 1989;259:1-12.
43. Caceres A, Binder LI, Payne MR, Bender P, Rebhuhn L, Steward O. Differential subcellular localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence. *Neuroscience* 1984;11:819-46.
44. Bernhardt R, Matus A. Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeleton. *J Comparative Neurol* 1984;226:203-21.
45. De Camilli P, Miller P, Navone F, Theurkauf W, Vallee R. Distribution of microtubule-associated protein 2 in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence. *Neuroscience* 1984;11:819-46.
46. Matus A. Stiff microtubules and neuronal morphology. *Trends Neurosci* 1994;17:19-22.
47. Theurkauf W, Vallee R. Phosphorylation of MAP2 by c AMP-independent protein kinase. *J Cell Biol* 1982;95:340a.
48. Vallee R. Structure and phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2). *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77: 3206-10.
49. Yamauchi T, Fujisawa H. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 by calmodulin dependent protein kinase (kinase II) which occurs only in the brain tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;109:975-81.
50. Inuzuka T, Tamura A, Sato S, Kirino T, Yanagisawa K, Toyoshima I, Miyatake T. Changes in the concentration of cerebral proteins following occlusion in the middle cerebral artery in rats. *Stroke* 1990;21:917-22.
51. Kitagawa K, Matsumoto M, Niinobe M, Mikoshiba K, Hata R, Ueda H, Handa N *et al.* Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage. Immunohistochemical investigation of dendritic damage. *Neuroscience* 1989;31:401-11.
52. Kudo T, Tada K, Takeda M, Nishimura T. Learning impairment and microtubule-associated protein 2 decrease in gerbils under chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* 1990;21:1205-9.
53. Miyazawa T, Bonnekoh P, Hossmann KA. Temperature effect of immunostaining of microtubule-associated protein 2 and synaptophysin after 30 minutes of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* 1993;85:526-32.
54. Rae A, Gilland E, Bona E, Hagberg H. Microglia activation after neonatal hypoxic-ischemia. *Dev Brain Res* 1995;84:245-52.
55. Dawson DA, Hallenbeck JM. Acute focal ischemia-induced alterations in MAP2 immunostaining: description of temporal changes and utilization as a marker for volumetric assesment of acute brain injury. *J Cerebral Blood Flow Metab* 1996;16:170-4.
56. Johnston M. Neurotransmitters alterations in a model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Ann Neurol* 1983;13:511-8.
57. Zhu C, Wang X, Hagberg H, Blomgren K. Correlation between caspase-3 activation and three different markers of DNA damage in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *J Neurochemistry* 2000;75(2):819-9.

58. Kirino T, Tamura A, Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Prog Brain Res* 1985;63:39-58.
59. Abe K, Tanzi RE, Kogure K. Selective induction of Kunitz-type protease inhibitor domain-containing amyloid precursor protein mRNA after persistent focal ischemia in rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 1991;125(2):172-4.
60. Abe K, Kogure K. Selective gene expression after brain ischemia. *Prog Brain Res* 1993;96:221-36.
61. Lyckman AW, Confaloni AM, Thinakaran G, Sisodia SS, Moya KL. Post-translational processing and turnover kinetics of presynaptically targeted amyloid precursor proteins in the central nervous system. *J Biol Chem* 1998;273(18):111000.
62. Koistinaho J, Pyykonen I, Keinänen R, Hokfelt T. Expression of b-amyloid precursor protein mRNAs following transient focal ischaemia. *Clin Neurosci Neuropathol* 1996;7:2727-31.
63. Smith-Swintosky VL, Pettigrew LC, Craddock SD, Culwell AR, Rydel RE, Mattson MP. Secreted forms of β -amyloid precursor protein protect against ischemic brain injury. *J Neurochem* 1994; 63:781-4.
64. Fukuchi KI, Kamino K, Deeb SS, Smith AC, Dang T, Martin GM. Overexpression of amyloid precursor protein alters its normal processing and is associated with neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182:165-73.
65. Yhoshikawa K, Aizawa T, Hayashi Y. Degeneration *in vitro* of post-mitotic neurons overexpressing the Alzheimer amyloid protein precursor. *Nature* 1992;359:64-7.
66. Cosgaya JM, Latasa MJ, Pascual A. Nerve growth factor and ras regulate beta-amyloid precursor protein gene expression in PC12 cells. *Neurochem* 1996;67:98-104.
67. Fukuchi KI, Ohman T, Dang N, Smith AC, Furlong CE, Martin GM. Overexpressions of c-DNAs for beta-amyloid precursor proteins 695, 751 and 770 enhance the secretion of beta-amyloid precursor protein derivatives and the survival of P19-derived neurons. *J Neurochem* 1996;66:165-73.
68. Baiden-Amisshah K, Joashi U, Blumberg R, Mehmet H, Edwards AD, Cox PM. Expression of amyloid precursor b-protein (b-APP) in the neonatal brain following hypoxic ischaemic injury. *Neuropath App Neurobiol* 1998;24:346-52.
69. Masliah E, Westland CE, Rockenstein EM, Abraham CR, Mallory M, Veinberg I, Scheldon E *et al.* Amyloid precursor proteins protect neurons of transgenic mice against acute and chronic excitotoxic injuries *in vivo*. *Neuroscience* 1997;78:135-46.
70. Palacios G, Mengod G, Tortosa A, Ferrer I, Palacios M. Increased b-amyloid precursor expression in astrocytes in the gerbil hippocampus following ischaemia: association with proliferation of astrocytes. *Eur J Neurosci* 1995;7:501-10.
71. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva E, Levesque G, Ikeda M, Chi H *et al.* Cloning of a gene bearing missense mutations in early onset familial Alzheimer's Disease. *Nature* 1995;375:754-60.
72. Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H *et al.* Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 1995;376:775-8.
73. Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, Slunt HH, Spitzer L, Kim G, Ratovitsky T *et al.* Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives *in vitro*. *Neuron* 1996; 17: 181-90.
74. Kim TW, Pettingell WH, Hallmark OG, Moir RD, Wasco W, Tanzi RE. Endoproteolytic cleavage and proteasomal degradation of presenilin 2 in transfected cells. *J Biol Chem* 1997;272:11006-10.
75. Kovacs DM, Fausett HJ, Page KJ, Kim TW, Moir RD, Merriam DE, Hollister RD *et al.* Alzheimer-associated pre-senilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nature Med* 1996;2:224-9.
76. De Strooper B, Beullens M, Contreras B, Levesque L, Craessaerts K, Cordell B, Moechars D *et al.* Phosphorylation, subcellular localisation, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins. *J Biol Chem* 1997;272:3590-8.
77. Dewji NN, Singer SJ. Specific intercellular binding of the b-amyloid precursor protein to the presenilins induces intercellular signaling: its significance for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15055-60.
78. Ribaut-Barassin C, Moussaoui S, Brugg B, Haeblerlè A-M, Huber G, Imperato A, Delhay-Bouchaud N *et al.* Hemisynaptic distribution patterns of the presenilins and b-APP isoforms in the rodent cerebellum and hippocampus. *Synapse* 2000;35:96-110.
79. Suzuki T, Nishiyama K, Murayama S, Yamamoto A, Sato S, Kanazawa I, Sakaki Y. Regional and cellular presenilin 1 gene expression in human and rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;219:708-13.
80. Annaert WG, Levesque L, Craessaerts K, Dierinck I, Snellings G, Westaway D, George-Hyslop PS *et al.* Presenilin 1 controls gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in pre-golgi compartments of hippocampal neurons. *J Cell Biol* 1999; 147:277-94.
81. Levitan D, Doyle TG, Brousseau D, Lee MK, Thinakaran G, Slunt HH, Sisodia SS *et al.* Assessment of normal and mutant presenilin function in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14940-4.
82. Guo G, Sopher BL, Pham DG, Furukawa K, Robinson N, Martin GM, Mattson MP. Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid-peptide: involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci* 1997;17:4212-22.
83. Wolozin B, Iwasaki K, Vito P, Ganjei JK, Lacana E, Sunderland T, Zhao B *et al.* Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* 1996;274:1710-3.
84. Berezovska O, Xia MQ, Page K, Wasco W, Tanzi RE, Hyman BT. Developmental regulation of presenilin mRNA expression parallels Notch expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56: 40-4.
85. Wong PC, Zheng H, Chen H, Becher MW, Sirinathsingji DJS, Trumbauer ME, Chen HY, Price DL, Van Der Ploeg LHT, Sisodia S. Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* 1997;387:288-92.
86. Shen J, Bronson RT, Chen DF, Xia W, Selkoe DJ, Tonogawa S. Skeletal and CNS defects in presenilin-1-deficient mice. *Cell* 1997;89:629-39.

87. Moreno-Flores MT, Medina M, Wandosell F. Expression of presenilin 1 in nervous system during rat development. *J Comp Neurol* 1999;410:556-70.
88. Grilli M, Diodato E, Lozza G, Brusa R, Cesarini M, Uberti D, Rozmahel R *et al.* Presenilin 1 regulates the neuronal threshold to excitotoxicity both physiologically and pathologically. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;23:12822-7.
89. Mattson MP, Zhu H, Yu J, Kindy MS. Presenilin-1 mutation increases neuronal vulnerability to focal ischemia *in vivo* and to hypoxia and glucose deprivation in cell culture: involvement of perturbed calcium homeostasis. *J Neurosci* 2000;20:1358-64.
90. Mattson MP, Pedersen WA, Duan W, Culmsee C, Camandola S. Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ann NY Acad Sci* 1999;893:154-75.
91. Lukiw WJ, Gordon WC, Rogaev EI, Thompson H, Bazan NG. Presenilin-2 (PS2) expression up-regulation in a model of retinopathy of prematurity and pathoangiogenesis. *Neuroreport* 2001;12:53-7.
92. Sato N, Hori O, Yamaguchi A, Lambert J-C, Chartier-Harlin M-C, Robinson PA, Delacourte A *et al.* A novel presenilin-2 splice variant in human Alzheimer's disease brain tissue. *J Neurochem* 1999;72:2498-505.
93. Miake H, Tsuchiya K, Nakamura A, Ikeda K, Levesque L, Fraser PE, St. George-Hyslop PH *et al.* Glial expression of presenilin epitopes in human brain with cerebral infarction and in astrocytoma. *Acta Neuropathol* 1999;98:337-40.
94. Tanimukai H, Imaizumi K, Kudo T, Katayama T, Tsuda M, Takagi T, Tohyama M *et al.* Alzheimer-associated presenilin-1 gene is induced in gerbil hippocampus after transient ischemia. *Mol Brain Res* 1998;54:212-8.
95. Brummendorf T, Rathjen FG. Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein profile* 1995;2:963-1008.
96. Edelman G. Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern. *Annu Rev Cell Biol* 1986;2:81-116.
97. Rutishauser U, Acheson A, Hall A, Sunshine J. The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science* 1988;240:53-7.
98. Owens GC, Edelman GM, Cunningham BA. Organization of the N-CAM gene - alternative exon usage as the basis for different membrane associated domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:294-8.
99. Rønn LCB, Pedersen N, Jahnsen H, Berezin V, Bock E. Brain plasticity and the neural cell adhesion molecule (NCAM). *Adv Exp Med Biol* 1997;429:305-22.
100. Kadmon G, Kowitz A, Altevogt P, Schachner M. The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J Cell Biol* 1990;110:193-208.
101. Milev P, Maurel P, Haring M, Margolis RK, Margolis RU. TAG-1/axonin 1 is a high-affinity ligand of neurocan, phosphocan/protein-tyrosinephosphatase-zeta/beta and NCAM. *J Biol Chem* 1996;271:15716-23.
102. Williams EJ, Furness J, Walsh FS, Doherty P. Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, NCAM, and N-cadherin. *Neuron* 1994;13:583-94.
103. Krog L, Bock E. Glycosylation of neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *APMIS Supplementum* 1992;27:53-70.
104. Nelson RW, Bates PA, Rutishauser U. Protein determination for specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 1995;270:17171-9.
105. Zuber C, Lackie PM, Catterall WA, Roth J. Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. *J Biol Chem* 1992;267:9965-71.
106. Rougon G. Structure, metabolism and cell biology of polysialic acids. *Eur J Cell Biol* 1993;61:197-207.
107. Edelman GM, Chuong C. Embryonic to adult conversion of neural cell adhesion molecules in normal and staggerer mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:7036-40.
108. Kiss JZ, Wang C, Rougon G. Nerve-dependent expression of high polysialic acid neural cell adhesion molecule in neurohypophysial astrocytes of adult rats. *Neuroscience* 1993;53:213-21.
109. Miragall LS, Kadmon G, Husmann M, Schachner M. Expression of cell adhesion molecules in the olfactory system of the adult mouse: presence of embryonic form of N-CAM. *Dev Biol* 1988;129:516-31.
110. Bartsch U, Kirchhoff F, Schachner M. Highly sialylated N-CAM is expressed in adult mouse optic nerve and retina. *J Neurocytol* 1990;19:550-65.
111. Seki T, Arai Y. Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J Neurosci* 1993;13:2351-8.
112. O'Connell AW, Fox GB, Barry T, Foley AG, Murphy KJ, Fichera G, Kelly J, Regan GM. Spatial learning activates neural cell adhesion molecule polysialylation in a corticohippocampal pathway within the medial temporal lobe. *J Neurochem* 1997;68(6):2538-46.
113. Becker CG, Artola A, Gerardy-Schahn R, Becker T, Welzl H, Schachner M. The polysialic acid modification of neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci Res* 1996;45:143-52.
114. Styren SD, Lagenaur CF, Miller PD, Dekosky ST. Rapid expression and transport of embryonic N-CAM in dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: ultrastructural analysis. *J Comp Neurol* 1994;349:486-92.
115. Scheff SW. Neural regeneration and transplantation. In: Seil FJ (Ed.). *Synaptic reorganization after injury: the hippocampus as a model system*. New York: Liss; 1989. p. 137-56.
116. Jucker M, Mondadori C, Mohajeri H, Bartsch U, Schachner M. Transient upregulation of NCAM mRNA in astrocytes in response to entorhinal cortex lesions and ischemia. *Mol Brain Res* 1995;28:149-56.
117. Fox GB, Kjoller C, Murphy KJ, Regan CM. The modulation of NCAM polysialylation state that follow transient global ischemia are brief on neurons but enduring. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60(2):132-40.
118. Kawaja MD, Gage FH. Reactive astrocytes are substrates for the growth of adult CNS axons in the presence of elevated levels of nerve growth factor. *Neuron* 1991;7:1019-30.