



Università degli Studi di Padova

Corso di laurea in Medicina e chirurgia

Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino (DSB)
UOC di Patologia e Terapia Intensiva Neonatale
Direttore: Prof. Eugenio Baraldi

Caratteristiche del metaboloma urinario di neonati con asfissia perinatale sottoposti ad ipotermia terapeutica

Relatore: Prof. Eugenio Baraldi
Correlatore: Dott. Enrico Valerio

Laureando: Gabriele Monetti

Anno accademico 2021/2022

1	INTRODUZIONE.....	1
1.1	ASFISSIA PERINATALE.....	1
1.1.1	Definizione.....	1
1.1.2	Circolazione fetale fisiologica.....	1
1.1.3	Cause di asfissia perinatale.....	2
1.1.4	Adattamento nel feto asfittico.....	3
1.1.5	Scambio dei gas feto-placentare.....	4
1.1.6	Acidosi fetale.....	5
1.1.7	Danno neuronale da asfissia.....	6
1.1.8	Presentazione clinica.....	7
1.1.9	Diagnosi.....	8
1.1.10	Prognosi.....	10
1.1.11	Gestione terapeutica generale.....	12
1.2	IPOTERMIA TERAPEUTICA.....	13
1.2.1	Definizione e cenni storici.....	13
1.2.2	Meccanismi protettivi.....	14
1.2.3	Criteri di inclusione.....	17
1.2.4	Indicazioni cliniche.....	18
1.2.5	Risultati della terapia.....	19
1.3	METABOLOMICA.....	22
1.3.1	Definizione.....	22
1.3.2	Metodi di analisi.....	23
1.3.3	Ruolo nell'asfissia perinatale.....	23
2.	OBIETTIVO.....	25
3.	MATERIALI E METODI.....	26
3.1	PAZIENTI.....	26
3.2	CAMPIONAMENTO.....	26
3.3	ANALISI METABOLOMICA: PREPARAZIONE DEI CAMPIONI ED ANALISI TRAMITE CROMATOGRAFIA LIQUIDA E SPETTROMETRIA DI MASSA.....	27
3.4	ELABORAZIONE DEI DATI: "PEAK PICKING AND PRE-PROCESSING".....	29
3.5	ANALISI STATISTICA.....	29
4.	RISULTATI.....	32
4.1	CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE.....	32
4.2	RISULTATI DELL'ANALISI METABOLOMICA.....	32
5.	DISCUSSIONE.....	34
5.1	METABOLOMA URINARIO PATOLOGICO E SANO.....	34
5.2	ANALISI DEI PATHWAY.....	35
5.2.1	Pathway di steroidogenesi.....	36
5.2.2	Pathway di degradazione della lisina.....	39
5.2.3	Metabolismo energetico e β -ossidazione.....	40
5.2.4	Metabolismo del triptofano.....	42
5.2.5	Limiti e prospettive future.....	43
6.	CONCLUSIONI.....	44
7.	BIBLIOGRAFIA.....	45
8.	TABELLE.....	59
9.	FIGURE.....	69
10.	RINGRAZIAMENTI.....	81

ABSTRACT

Background: Perinatal asphyxia, the condition of compromise equilibrium of exchange of fetal-placental gases, is one of the greatest causes of mortality and morbidity in the neonatal age. Its biggest complication is hypoxic-ischemic encephalopathy, which can significantly affect the newborn's short- and long-term prognosis. To date, the only therapeutic option that can improve the prognosis of these newborns is therapeutic hypothermia. However, the choice of whether to use it is based only on clinical criteria and there are currently no biomarkers that can guide the clinical choice. Metabolomics is a field of research that is proving extremely promising in the area of perinatal asphyxia and that could allow identifying metabolites or metabolic pathways that can guide future research that could change the clinical approach in this pathology.

Methods: Newborns with more than 35 gestational weeks, with signs and symptoms of perinatal asphyxia at birth, undergoing therapeutic hypothermia (IT) were enrolled in the study. Urine samples were collected between 6 and 24 hours of life, between 24 and 48 hours of life, and between 48 and 72 hours of life during the IT phase. The samples were analyzed using untargeted metabolomics techniques using a high-performance liquid chromatography system coupled to a mass spectrometer. The derived data were analyzed using univariate and multivariate statistical analysis techniques.

Results: Urine samples were collected for 12 subjects before hypothermia (T0), during hypothermia (IPO), and after hypothermia (PT). The combination of the univariate and multivariate analysis revealed 31 relevant metabolites in describing the changes during the three phases. The pathway analysis has made it possible to identify the metabolic pathways disrupted in the three phases: of particular importance are the pathway of steroidogenesis and the pathway of lysine degradation. The energy metabolism associated with β -oxidation and the metabolism of tryptophan were also disrupted.

Discussion: In this study, untargeted metabolomics analysis has allowed us to describe the relevant metabolites in describing the change of urinary metabolome during hypothermia and to highlight the pathways disruption.

RIASSUNTO

Introduzione: L'asfissia perinatale, ossia la condizione di compromesso equilibrio di scambio di gas feto-placentare, è ad oggi una delle maggiori cause di mortalità e morbilità in epoca neonatale. La sua complicità più temibile è l'encefalopatia ipossico ischemica che può influenzare in maniera importante la prognosi a breve e a lungo termine del neonato. Ad oggi l'unica opzione terapeutica che sia in grado di migliorare la prognosi di questi neonati è l'ipotermia terapeutica. La scelta se utilizzarla o meno è però basata solamente su criteri clinici e non esistono ad oggi biomarcatori che possano guidare la scelta clinica. La metabolomica è un campo di ricerca che si sta dimostrando estremamente promettente in ambito di asfissia perinatale e che potrebbe permettere di identificare metaboliti o pathway metabolici in grado di guidare ricerche future che potrebbero cambiare l'approccio clinico in questa patologia.

Metodi: Sono stati arruolati neonati con più di 35 settimane gestazionali, con segni e sintomi di asfissia perinatale alla nascita, sottoposti ad ipotermia terapeutica (IT). Sono stati raccolti campioni di urine tra le 6 e le 24 ore di vita, tra le 24 e 48 ore di vita e tra le 48 e le 72 ore di vita durante la fase di IT. I campioni sono stati analizzati con tecniche di metabolomica untargeted utilizzando un sistema di cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiato ad uno spettrometro di massa. I dati derivati sono stati analizzati con tecniche di analisi statistica univariate e multivariate, nonché metodiche di over-representation pathway analysis.

Risultati: Per 12 soggetti sono stati collezionati campioni di urina prima della fase di ipotermia (T0), durante la fase di ipotermia (IPO) e dopo ipotermia (PT). La combinazione di analisi univariata e multivariata ha messo in luce 31 metaboliti rilevanti nel descrivere le modificazioni nelle tre fasi. La pathway analysis ha permesso di identificare le vie metaboliche perturbate nelle tre fasi: di particolare importanza sono il pathway di steroidogenesi ed il pathway di degradazione della lisina. Sono risultati perturbati anche il metabolismo energetico associato alla β -ossidazione ed il metabolismo del triptofano.

Discussione e conclusioni: In questo studio l'analisi metabolomica untargeted ha permesso di caratterizzare i metaboliti rilevanti nel descrivere il cambiamento del metaboloma urinario durante l'ipotermia e di mettere in luce i pathway perturbati.

1 INTRODUZIONE

1.1 Asfissia perinatale

1.1.1 Definizione

Con il termine asfissia perinatale si definisce una condizione di compromesso equilibrio di scambio di gas feto-placentare che porta alla progressiva ipossia, ipercapnia e acidosi del feto, variabili in base all'estensione e alla durata dell'interruzione ^[1]. L'evento asfittico può temporalmente occorrere durante il parto (asfissia intrapartum) o iniziare nelle fasi precedenti al parto stesso (asfissia peripartum), dando solitamente segno di sé come sofferenza fetale al tracciato cardiocografico. Generalmente, più il danno è anteriore al parto, peggiore è l'acidosi e la depressione del neonato alla nascita. Non esistono dei criteri esclusivamente biochimici per la definizione di asfissia, essa si attribuisce combinando dati clinici ed ematochimici precoci del neonato come trattati in seguito. L'incidenza dell'asfissia perinatale nei Paesi industrializzati è stimata a 3-4:1000 nati vivi. Il danno ipossico è generalmente multiorgano; circa il 20-25% dei neonati asfittici evolve verso un interessamento neurologico, definito come encefalopatia ipossico-ischemica ^[49].

1.1.2 Circolazione fetale fisiologica

Il feto si trova in una condizione di ipossiemia fisiologica, risultato di una circolazione specifica per l'epoca fetale (*Figura 1*) in cui il sangue ossigenato arriva attraverso la vena ombelicale, da qui attraverso il dotto venoso di Aranzio bypassa la circolazione epatica e si unisce al sangue della vena cava inferiore. A questo punto avviene una cosa del tutto singolare in quanto il sangue più ossigenato (PO_2 40- 50 mmHg ^[3]) che deriva dalla vena ombelicale viene diretto quasi esclusivamente verso il forame ovale fra i due atri raggiungendo la circolazione sinistra l'irrorazione di coronarie ed encefalo con sangue adeguatamente ossigenato. Il sangue meno ossigenato che deriva dalla cava inferiore (PO_2 15- 20 mmHg) viene invece spinto dal circolo dx nel tronco polmonare dove attraverso il dotto arterioso di Botallo raggiunge l'aorta e il circolo sx bypassando il circolo polmonare, che nel feto è ad altissima resistenza ^[4]. Infine, il sangue dopo aver raggiunto la periferia torna alla placenta attraverso le due arterie ombelicali.

Un altro meccanismo che rende possibile la vita fetale sono i livelli di emoglobina superiori rispetto all'adulto ^[5], il che permette di sopperire alla richiesta di ossigeno tissutale nonostante una condizione di ipossiemia.

Inoltre, l'emoglobina fetale HbF ha un'affinità maggiore per l'ossigeno (shift verso sinistra della curva di dissociazione dell'emoglobina) e ciò permette a livello placentare di massimizzare lo scambio di ossigeno con il sangue materno.

La perfusione tissutale nel feto è maggiore che nella vita extrauterina. A ciò si aggiunge il fatto che il feto ha un dispendio energetico inferiore in quanto necessita di meno energia per la respirazione e la termoregolazione.

Infine, l'autoregolazione del flusso ombelicale mantiene, in condizioni fisiologiche, un'adeguata ossigenazione del feto anche durante il travaglio ^[7].

La maggior parte delle modificazioni circolatorie avviene nella fase post-natale, con l'avvio della respirazione e il pianto del neonato. Inizialmente l'espansione polmonare porta ad un drammatico crollo delle resistenze vascolari polmonari da cui deriva un aumento importante del flusso polmonare. La pressione in arteria polmonare crolla sotto i valori della pressione sistemica per cui lo shunt destro-sinistro a livello di forame ovale e dotto di Botallo si inverte, divenendo sinistro-destro, con successiva chiusura del dotto di Botallo stesso dovuta all'aumento della tensione di ossigeno ematica. Il flusso in arteria polmonare aumenta, con conseguente aumento della pressione atriale sinistra e l'inversione dello shunt a livello del forame ovale, con sua successiva eventuale obliterazione entro l'anno di vita. Con il clampaggio del cordone ombelicale, la circolazione placentare viene esclusa e ci si trova in una condizione di circolazione adulta.

1.1.3 Cause di asfissia perinatale

La compromissione degli scambi gassosi feto-placentari può avvenire prima o nell'immediato intrapartum, la causa principale rimane l'interruzione del flusso ematico placentare. I fattori che possono portare a questa condizione sono molteplici (Tabella 1) e sono da associarsi a cause materne, neonatali oppure degli annessi embrionali (placenta e cordone ombelicale).

Alcune patologie materne come diabete, ipertensione e preeclampsia possono compromettere la vascolarizzazione placentare e impattare quindi sul flusso ematico al feto. Dall'altro lato anche condizioni di ipotensione possono

ripercuotersi sul flusso placentare; condizioni associate sono ipotensione materna essenziale, ipotensione da farmaci o da anestesia spinale. Il flusso placentare può essere influenzato anche da anomalie placentari quali il distacco parziale e l'infezione/infiemmazione placentare, si è visto infatti come la corionamnionite (infiemmazione di corion e amnios) e la funicolite siano correlate ad una diminuzione del flusso ematico [8].

Il cordone ombelicale può essere compresso con alterazione del flusso ematico, come avviene nel cordone nucale o nel prolasso.

1.1.4 Adattamento nel feto asfittico

Al momento della compromissione del flusso ematico placentare nel feto si verifica la redistribuzione dell'output cardiaco verso gli organi vitali quali cervello, cuore e ghiandole surrenali a discapito di organi come reni, intestino, cute e tessuto muscolare (*Figura 2*).

Gli stimoli che possono innescare questo meccanismo sono diversi. A livello dell'arteria carotide esistono chemocettori (attivati dalla condizione di ipossiemia) che determinano una liberazione di catecolamine che agiscono a livello sistemico determinando vasocostrizione e centralizzazione del circolo. L'ipossiemia determina una vasocostrizione nel circolo polmonare, diminuisce quindi il flusso ai polmoni e all'atrio sx dove sarà quindi presente una pressione inferiore, questo permette un aumento della pressione dello shunt destro-sinistro e un aumento del flusso ematico verso cuore e cervello [9,10]. A livello cerebrale una bassa concentrazione di ossigeno determina un calo delle resistenze vascolari (fino al 50% [11,13]) aumentando il flusso ematico cerebrale e compensando il calo della concentrazione di ossigeno. Il mantenimento di un flusso ematico sufficiente a livello degli organi vitali determina il sacrificio del flusso destinato a organi meno nobili come reni, cute, tessuto muscolare e intestino.

Inoltre, i meccanismi di adattamento hanno un limite, in particolar modo quando la vasodilatazione dei vasi cerebrali non è più sufficiente a garantire un aumento del flusso. Quando ciò accade la richiesta di ossigeno supera l'apporto e comincia il danno neuronale. In aggiunta a ciò, non sempre la redistribuzione del circolo entra in funzione; nello studio di Phelan e colleghi [13] si è dimostrato come in alcuni casi non ci sia stato nessun riadattamento della circolazione; i neonati in questione non hanno manifestato insufficienza d'organo (segno di una mancata diversione del

flusso ematico a protezione di encefalo e cuore), ma tutti hanno presentato paralisi cerebrale infantile causata dall'ipossia cerebrale.

Oltre all'adattamento circolatorio nel feto ci sono altri fattori biologici in grado di preservare la vitalità degli organi vitali. A livello cerebrale nel feto si ha un tasso metabolico inferiore rispetto all'adulto ^[14], ciò si traduce in un consumo di ossigeno e substrati energetici inferiore permettendo un rapporto richiesta/fornitura più favorevole. In aggiunta, il cervello è in grado di utilizzare lattato e chetoni in situazioni di ipossia ^[14-16]. Il miocardio nel feto ha una resistenza maggiore ai danni ischemici rispetto al miocardio adulto ^[17].

La curva di dissociazione dell'emoglobina fetale (HbF) è spostata a sinistra rispetto a quella adulta; ciò comporta che ci sia un minor rilascio di O₂ fisiologicamente ma in condizioni di acidosi indotta dall'ipossia, grazie all'effetto Bohr, il rilascio di ossigeno a livello tissutale aumenta in modo importante. Quest'ultimo consiste in una minore affinità dell'emoglobina per l'ossigeno all'aumentare della concentrazione di ioni H⁺. Al diminuire del pH corrisponderà quindi un aumento del rilascio di ossigeno ai tessuti.

1.1.5 Scambio dei gas feto-placentare

Sia ossigeno che CO₂ diffondono a livello placentare per diffusione semplice secondo il gradiente pressorio, l'alterazione che si viene a creare a causa dell'ipossia contribuisce a determinare nel feto una condizione di acidosi. Quando la richiesta di ossigeno supera l'apporto, le cellule sfruttano la glicolisi anaerobia per la produzione di substrati energetici con conseguente produzione di acido lattico che, accumulandosi, determina un abbassamento del pH. Nel feto la CO₂ prodotta dal metabolismo cellulare viene trasportata in tre forme: all'interno degli eritrociti come bicarbonato, legata all'emoglobina come carbamato e infine come gas disciolto nel plasma. Quest'ultima forma, nonostante sia in proporzione quella inferiore, è la maggiore responsabile degli scambi placentari grazie al fatto che il diossido di carbonio diffonde molto velocemente attraverso le membrane ^[18]. Per via di questo meccanismo, il passaggio di CO₂ dipende in modo preponderante dal flusso ematico, quindi dalle circolazioni materna e fetale. Oltre a ciò, a livello placentare coesistono due fenomeni che facilitano lo scambio gassoso placentare, l'effetto Bohr e l'effetto Haldane. L'effetto Bohr permette un maggior rilascio di O₂ materno in relazione all'abbassamento del pH, quest'ultimo è anche

responsabile di una maggiore efficienza nel legame con la CO₂ fetale che verrà quindi eliminata dai polmoni materni. Per lo stesso effetto, il sangue fetale che si ossigena e diventa più alcalino avrà una maggiore affinità di legame con l'ossigeno portato dal flusso materno. L'effetto Haldane si riferisce ad un processo complementare al precedente che descrive il fenomeno secondo cui il trasporto di CO₂ è influenzato dalla concentrazione di O₂. Più precisamente il legame dell'ossigeno all'emoglobina fetale aumenta il rilascio di CO₂ fetale, determinando un aumento di concentrazione di quest'ultima negli spazi intervillosi rendendola quindi più propensa a diffondere nel sangue materno. Analogamente, quando l'emoglobina materna è deossigenata, maggiori quantità di CO₂ possono essere legate, permettendo quindi una rimozione più efficace da parte del sangue materno.

1.1.6 Acidosi fetale

L'acidosi fetale dipende principalmente da tre condizioni: dall'eccesso di CO₂ e la sua conversione in acido carbonico, dall'eccesso di acidi metabolici fissi (acido lattico, acido urico, chetoni) oppure da una condizione mista caratterizzata dall'aumento sia dell'acido carbonico che degli acidi metabolici fissi. La concentrazione di acido carbonico dipende direttamente dalla concentrazione di CO₂; quest'ultima diffonde molto bene attraverso la placenta per cui la sua eliminazione a livello dei polmoni materni è un processo rapido. Gli acidi fissi invece diffondono molto lentamente a livello placentare, questo determina una acidosi più sostenuta in caso di loro accumulo. Il principale acido metabolico è l'acido lattico che viene prodotto in condizioni di ipossia tramite glicolisi anaerobia; per tale motivo, maggiore è la gravità e la durata dell'evento ipossico, maggiore è la diminuzione del pH.

Si è quindi cercato di definire un valore del pH rilevato a livello dell'arteria ombelicale che fosse in grado di identificare lo stato di asfissia. Tradizionalmente si considera un feto asfittico se il pH è inferiore a 7.2 ^[19], se si è al di sotto di 7 si definisce l'asfissia come severa in quanto il grado di acidosi porta ad un aumentato rischio di sequele neurologiche ^[19,20]. Nonostante questo, secondo lo studio di King e colleghi, circa il 60% di neonati che hanno sperimentato una asfissia severa hanno avuto un parto senza eventi avversi e assenza di conseguenze post-dimissione ^[21].

1.1.7 Danno neuronale da asfissia

Il danno neuronale avviene nel momento in cui, in condizioni di asfissia, i meccanismi di compenso non sono più sufficienti. Possiamo idealmente dividere temporalmente il danno in una prima fase di insulto ischemico e in una seconda fase di danno da ri-perfusione, quest'ultima divisibile ulteriormente in una fase latente e in una secondaria (*Figura 4*).

Nella prima fase di insulto ischemico e quindi in assenza di ossigeno, le cellule utilizzano la glicolisi anaerobia che porta ad una produzione inferiore di composti fosforici ad alta energia (adenosina trifosfato) e ad un accumulo di acido lattico. L'assenza di ATP non permette il corretto funzionamento delle pompe Na^+/K^+ e $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ con conseguente accumulo di acqua intracellulare e rigonfiamento cellulare. Inoltre, si ha l'aumento della concentrazione di calcio intracellulare attraverso i canali voltaggio-dipendenti che funzionano impropriamente a causa del deficit energetico. Quest'aumento della concentrazione di calcio può portare al rilascio di neurotrasmettitori eccitatori come il glutammato che agirà determinando un aumento ulteriore dei livelli intracellulari di Ca^{2+} agendo sui recettori NMDA. L'elevata concentrazione intracellulare di calcio determina un'alterata attivazione di proteasi, lipasi ed endonucleasi che sfocia in danno e morte cellulare [22]. Oltre a ciò, si ha la formazione di radicali liberi, produzione di ossido nitrico e perossidazione delle membrane plasmatiche (*Figura 3*).

La morte cellulare neuronale avviene in due tempi: durante l'insulto ischemico primario si ha necrosi secondo i meccanismi sopracitati: rigonfiamento cellulare, distruzione degli organelli citoplasmatici e perdita dell'integrità della membrana plasmatica. Successivamente, se avviene la ri-perfusione, si entra nella fase latente caratterizzata da un'attività cerebrale marcatamente depressa e da una ipoperfusione latente [51] che perdura dalle 6 alle 15 ore. Può essere succeduta dalla fase di ri-perfusione secondaria in cui si ha una seconda crisi energetica [23]. Durante quest'ultima si ha danno da ri-perfusione con formazione di specie reattive dell'ossigeno, edema citotossico secondario, deterioramento della funzione mitocondriale, infiammazione e apoptosi cellulare [52,53] indotta da meccanismi caspasi-dipendenti, in particolar modo dall'attivazione della caspasi-3.

Grazie a studi di risonanza magnetica nucleare ^[24,25] e a reperti autoptici è stato possibile determinare quali sono le aree cerebrali che vengono più frequentemente colpite nei feti asfittici.

Il pattern più frequente è la morte neuronale selettiva che si può sottoclassificare in diffusa, corticale-nuclei profondi e nuclei profondi-tronco encefalico.

Un altro pattern è la lesione cerebrale parasagittale in cui il danno si localizza nei territori di confine (watershed) tra la perfusione arteriosa della corteccia parieto-occipitale e della materia bianca subcorticale. Il danno può coinvolgere la sostanza bianca periventricolare determinando una leucomalacia periventricolare: questa tipicamente colpisce i nati prematuri ma si è vista anche nei nati a termine colpiti da ipossia-ischemia.

1.1.8 Presentazione clinica

I danni causati dall'asfissia sono strettamente dipendenti dall'epoca di insorgenza e dal grado di quest'ultima. Le modalità di presentazione però possono non essere sempre chiare. Esistono casi in cui si ha una presentazione tipica con necessità di rianimazione, bradicardia franca o arresto cardiaco, un punteggio di APGAR molto basso e una acidosi importante. In questi casi, non vi è dubbio che vada attuata l'ipotermia terapeutica.

Esistono però anche forme subacute in cui il danno può precedere il parto. In questi casi la nascita può essere del tutto priva di complicanze ed il neonato sembrare assolutamente normale, nelle 12-24 successive però compaiono segni di encefalopatia come convulsioni ^[51]. Solitamente, nel caso di un evento asfittico pre-partum, una spia importante è un pH cordonale comunque non normale (ad es. con una quota di acidosi metabolica), seppur a fronte di un neonato tonico, reattivo, e autonomo dal punto di vista respiratorio.

Nei 12-18 mesi successivi alla nascita, una presentazione causata dall'asfissia e associata al danno neuronale è la paralisi cerebrale (PC) che si definisce come un gruppo di sindromi da compromissione motoria, non progressiva, con una incidenza di 1,5 su 1000 (maggiore nei prematuri). Viene diagnosticata nei primi 18 mesi di vita, perché i bambini non acquisiscono le abilità motorie fondamentali o presentano anomalie come asimmetria delle funzionalità motorie grossolane, ipertonìa o ipotonia. La PC può essere ulteriormente caratterizzata in base alle diverse parti del corpo affette in emiparesi, diplegia e tetraplegia. Oppure alla

prevalenza del tipo predominante di disturbo motorio (*Tabella 5*).

Le comorbidità associate comprendono spesso epilessia, difficoltà nell'apprendimento, problemi comportamentali e compromissioni sensoriali. Molti di questi bambini presentano solo il deficit motorio, fra questi alcuni presentano uno sviluppo intellettuale adeguato [50].

Per poter stabilire una potenziale correlazione fra interruzione del flusso placentare intraparto e una paralisi cerebrale sono necessari 4 criteri definiti dall'American Congress of Obstetricians and Gynecologists Task Force on Neonatal Encephalopathy and Cerebral Palsy [1]:

- Riscontro di acidosi metabolica da prelievo di sangue dall'arteria ombelicale con valori di $\text{pH} < 7$ ed eccesso di basi ≥ -12 mmol/l.
- Insorgenza precoce di una moderata/severa encefalopatia neonatale in neonati nati a 34 settimane o più di gestazione
- Presenza di paralisi cerebrale di tipo spastico quadriplegico o di tipo discinetico.
- Esclusione di altre possibili cause fra cui traumi, disordini della coagulazione, infezioni, sepsi e disordini genetici.

1.1.9 Diagnosi

Per definire una condizione di ipossia-ischemia è necessario che ci sia una condizione di scambio gassoso feto-placentare potenzialmente compromessa associata all'evidenza clinica di una disfunzione cerebrale, eventualmente è anche possibile valutare tale disfunzione tramite prove neurofisiologiche (aEEG e RMN) [26].

La prima condizione, ossia quella di uno scambio di gas potenzialmente compromesso è definibile nel momento in cui si avverano le seguenti condizioni:

- Storia di un evento perinatale acuto (es. distacco di placenta).
- Acidemia fetale con $\text{pH} < 7$ [1].
- Apgar score inferiore a 5 sia a 5 che a 10 minuti di vita. Lo score Apgar è uno score clinico che viene eseguito ad 1 minuto e a 5 minuti dal parto (si può ripetere ogni 5 minuti nel caso i problemi persistano). Tiene conto di parametri quali colorito, frequenza cardiaca, riflessi, tono muscolare e respirazione. Ha la funzione di fornire al clinico una stima dell'eventuale stato di compromissione e del miglioramento o peggioramento dopo

rianimazione neonatale. Ad ogni parametro è possibile dare un punteggio da 0 a 2 (*Tabella 2*)^[27] con un punteggio che può andare quindi da 0 a 10. In base al punteggio è possibile classificare il neonato come normale (punteggio 7-10), con una sofferenza di grado medio (punteggio 4-6) oppure severamente compromesso (0-3)^[27].

- Necessità di rianimazione neonatale (in particolare, necessità di supporto ventilatorio invasivo a 10 minuti di vita).

Segue poi la necessità di un'evidenza clinica di disfunzione cerebrale tramite:

- Sarnat score, introdotto per la prima volta nel 1976 e successivamente rivisto e modificato da più autori^[28], resta un ottimo strumento per evidenziare segni di encefalopatia ipossico-ischemica neonatale. I parametri che vengono tenuti in considerazione sono livello di coscienza, attività spontanea, postura, tono, riflessi primitivi e sistema autonomo (*Tabella 3*)^[29].
- Thompson score, introdotto nel 1997 per semplificare e rendere più agile la valutazione post-natale^[30]. Consiste nella valutazione clinica di nove segni a cui è possibile fornire un punteggio da 0 a 3 (fino a 2 per alcuni parametri), ottenendo un punteggio che permette di classificare la gravità dell'asfissia; questa può essere lieve (punteggio 0-10), moderata (11-14) o severa (≥ 15). I segni che vengono considerati sono tono, livello di coscienza, convulsioni, postura, riflesso di Moro, riflesso di prensione palmare, riflesso di suzione, respirazione e tensione della fontanella (*Tabella 4*)^[30].
- Convulsioni.

Infine, è possibile sfruttare prove neurofisiologiche di disfunzione cerebrale come l'aEEG (amplitude-integrated EEG) e valutare il neuroimaging tramite metodiche di risonanza magnetica nucleare.

La traccia aEEG viene estratta da un numero limitato di canali dell'EEG convenzionale, ed è compressa nel tempo e filtrata prima della visualizzazione. Tipicamente, gli elettrodi possono essere posizionati su un singolo paio di posizioni biparietali (P3 e P4) oppure su una coppia di posizioni biparietali (C3 e C4) (*Figura 5*)^[31]. Due studi hanno confrontato le due tecniche e hanno trovato che il metodo biemisferico è superiore, specialmente nei neonati con lesioni cerebrali unilaterali^[32,33]. Le posizioni degli elettrodi a livello del cuoio capelluto sono delineate dal

sistema internazionale (International 10-20 system). Il segnale registrato dagli elettrodi viene poi processato e filtrato per poi essere mostrato sul monitor in cui da 0 a 10 mV la scala è lineare e da 10 a 100 mV la scala è logaritmica. In questo modo viene potenziato un segnale a minore ampiezza, mentre un segnale a maggiore ampiezza viene attenuato. Spesso sullo stesso monitor viene anche visualizzato il tracciato EEG grezzo, questo aiuta il clinico nella valutazione di eventuali convulsioni.

Per rendere l'utilizzo clinico dell'aEEG più fruttuoso e agile sono state messe a punto delle classificazioni che si basano sul riconoscimento di pattern specifici di normalità e di malattia, la più utilizzata è quella messa a punto da Hellström-Westas et al. ^[34] che tiene conto di pattern visivi specifici assieme alla valutazione dei voltaggi (*Figura 6*) ^[31].

Un'altra metodica che sta acquistando sempre più importanza, soprattutto nella valutazione prognostica, è la Risonanza Magnetica Nucleare (RMN). Più in particolare i protocolli utilizzati sono immagini assiali pesate in T1, T2 e DWI (Diffusion Weighted Imaging). Le regioni che sono più suscettibili al danno ipossico-ischemico ^[111] e che quindi vanno valutate sono: zona posteriore della capsula interna (PLIC Posterior Limb Internal Capsule), i gangli della base e il talamo (BGT Basal Ganglia Talamus), la sostanza bianca periventricolare (PVL Periventricular White matter) ed infine la sostanza grigia corticale.

1.1.10 Prognosi

L'interruzione del flusso sanguigno e lo scambio di gas feto-placentare, può, se significativo, innescare una cascata di lesioni neuronali, con il rischio di avere danni a lungo termine. La maggior parte dei bambini che sono esposti a ipossia-ischemia perinatale ha un recupero rapido delle funzioni neurologiche e una sopravvivenza completamente normale, una porzione di neonati però purtroppo soffrirà di un'encefalopatia clinica in evoluzione chiamata encefalopatia ipossico-ischemica (HIE). Le complicanze risultanti dell'HIE sono di vasta portata e possono influenzare l'esito motorio, sensoriale, cognitivo e comportamentale del bambino. L'avvento dell'ipotermia terapeutica come trattamento neuroprotettivo per i neonati con encefalopatia moderata e grave ha migliorato la prognosi. Ad oggi non esiste un metodo preciso ed affidabile per definire quale sarà la prognosi esatta del

neonato. Gli strumenti che sono utilizzati sono la valutazione del pH ombelicale, l'Apgar score, l'aEEG e il Sarnat score.

La presenza di un pH ombelicale inferiore a 7.00 porta nel 50% dei casi ad un outcome anomalo ^[38] ma non è un indice che da solo è in grado di guidare le decisioni cliniche.

Lo score di Apgar ha una bassa sensibilità e specificità, studi hanno infatti dimostrato che l'80% dei neonati con Apgar <7 a 5 minuti avrà un outcome completamente normale ^[38] e che il 20% dei neonati con Apgar 0 a 10 minuti raggiungerà l'età scolastica senza sviluppo di disabilità moderata/grave ^[39].

Nell'utilizzo dell'aEEG i fattori prognostici positivi sono il ritorno alla normalità del ritmo sonno/veglia e la normalizzazione del tracciato ^[35,36]. Per quanto riguarda tracciati anomali si è visto che non è possibile definire una prognosi precisa in quanto alcuni studi dimostrano come tracciati anomali nelle ore di vita possono essere associati con un outcome normale a 2 anni ^[37].

A breve termine le complicanze che possono comparire sono il decesso del neonato e lo sviluppo di encefalopatia ipossico-ischemica accompagnata da convulsioni. Il tasso di mortalità totale è del 9,9% dei neonati con asfissia perinatale, sale al 30% nei neonati che rientrano nei criteri di raffreddamento e sale vertiginosamente al 76,8% nelle forme severe di encefalopatia secondo Sarnat ^[40,41].

Nelle forme di encefalopatia moderata secondo Sarnat circa il 33% sviluppa convulsioni ^[42], queste tipicamente permangono per minuti/ore per poi regredire fino al recupero completo.

Esistono tuttavia complicanze a lungo termine che possono quindi manifestarsi a mesi o anni dalla nascita. Circa il 10-13% dei sopravvissuti ad una encefalopatia severa sviluppano paralisi cerebrale infantile (cerebral palsy) di cui le forme discinetiche e spastiche sono le più frequenti ^[43]. Oltre ai disturbi motori possono anche comparire disturbi sensoriali come perdita dell'udito ^[44] e compromissione della vista ^[45]. Infine, si sono osservati deficit cognitivi della memoria episodica e di lavoro ^[46], deficit dell'attenzione, rendimento scolastico alterato ^[47] e disturbi del comportamento con deficit di attenzione, irritabilità e iperattività ^[48].

Nel 1998 lo studio di Barkovich et. al ^[115] ha proposto uno score basato sulle immagini acquisite con metodiche di risonanza magnetica nucleare per valutare la

prognosi dei neonati con asfissia perinatale (*Tabella 11*). Lo score è composto da sottocategorie: inizialmente sono stati valutati lo score dei gangli della base (BG Basal Ganglia) e lo score della zona “watershed” (W). Successivamente sono stati elaborati due score compositi, il primo che tiene conto di alterazioni sia dei gangli della base che della zona “watershed” (BG/W) ed il secondo che è invece la somma aritmetica degli stessi (BG+W).

Lo studio di Barkovich ha poi analizzato l’outcome e l’ha confrontato con i reperti di imaging arrivando alla conclusione che lo score BG/W è il punteggio più utile per prevedere il risultato a 3 mesi e 12 mesi, perché mostra differenze significative tra i pazienti che hanno outcome neuromotori normali e anormali a 3 (P 5.0007) e 12 (P 5.0001) mesi e tra coloro che hanno un outcome cognitivo normale e anormale a 12 mesi (P 5.007).

Lo score W invece sembra correlare in modo più preciso con l’outcome a 12 mesi. In conclusione, l’ipoteremia terapeutica ha migliorato le prospettive per i neonati con HIE moderata/grave, con una maggiore probabilità di sopravvivenza con un QI normale (RR=1,31) e una migliore sopravvivenza senza anomalie neurologiche (RR=1,6) basandosi su follow-up a 6-7 anni ^[41].

1.1.11 Gestione terapeutica generale

Il trattamento del neonato con ipossia-ischemia prevede il controllo dello stato di acidosi, il mantenimento di uno stato di euglicemia e il controllo pressorio. Devono essere evitate condizioni che possano influenzare negativamente la prognosi quali ipossia, ipo e ipercapnia, disionie e crisi epilettiche ^[112]. Ad oggi l’unico trattamento approvato è l’ipoteremia terapeutica ^[113], con lo scopo di neuroprotezione e quindi di miglioramento dell’outcome inteso sia come mortalità che come morbidità.

Sono state proposte anche altre terapia neuroprotettive ^[114] che si basano su agenti quali melatonina, EPO, allopurinolo, topiramato e gas nobili (Xenon), ma ad oggi mancano le evidenze per il loro utilizzo nella pratica clinica.

1.2 Ipotermia terapeutica

1.2.1 Definizione e cenni storici

L'ipotermia terapeutica è una tecnica che sfrutta il raffreddamento del corpo (ipotermia) per scopi terapeutici. È composta da una fase di raffreddamento attivo che viene mantenuta in genere 72 ore seguita da una fase di riscaldamento passivo fino al ritorno a valori di temperatura corporea fisiologica.

L'idea che il freddo potesse migliorare la prognosi di alcune patologie risale al tempo di Egizi, Greci e Romani ^[54], i primi studi scientifici su animali vennero eseguiti da Bernard verso la fine dell'800 ^[55] per poi essere confermati negli anni '50 da Miller et al. grazie a studi su porcellini d'india raffreddati in cui veniva indotta artificialmente ipossia-ischemia ^[56].

Lo studio su animali è stato fondamentale non solo per comprendere come l'ipotermia migliori la prognosi in caso di insulto ischemico, ma anche per studiare e comprendere timing, durata, intensità e tipo di raffreddamento per garantire l'outcome migliore ^[57].

Come hanno dimostrato studi su maialini ^[58] il timing di inizio dell'ipotermia comporta un effetto terapeutico diverso. È apparso che più precocemente si interviene e maggiore è la neuroprotezione e di conseguenza l'outcome sarà migliore. Si è visto infatti, che un ritardo di 15-45 minuti compromette l'effetto protettivo dell'ipotermia ^[59].

Studi successivi hanno dimostrato che a fronte di un ritardo nell'inizio della terapia è possibile mantenere un ottimo grado di protezione e di successo terapeutico estendendo la durata dell'ipotermia a 72 ore ^[60,61]. Non si sono invece visti miglioramenti dell'efficacia in studi con ipotermia prolungata oltre le 72 ore, al contrario c'è stato un rischio maggiore di eventi avversi ^[62,63].

L'attenzione si è poi spostata sulla entità del raffreddamento e sui suoi possibili effetti, sono stati quindi eseguiti studi su animali che hanno portato al risultato che il range migliore di abbassamento è quello di 3,5-5 °C ^[64] e che raffreddare ulteriormente porta a un grado di acidosi metabolica maggiore, aumento della glicemia e un rischio maggiore di arresto cardiaco ^[65]. È stato eseguito anche uno studio su neonati con un raffreddamento maggiore (32°C) e prolungato (5 giorni) che è stato sospeso prematuramente per la mancanza di risultati positivi ^[98].

Le tecniche di raffreddamento sono principalmente 2: il raffreddamento selettivo

della testa tramite un casco apposito e il raffreddamento total body tramite un lettino apposito. Il cervello fisiologicamente ha una temperatura maggiore nella sua porzione interna rispetto alla zona corticale, il raffreddamento total body porta ad un abbassamento della temperatura più omogeneo nelle varie zone cerebrali rispetto al raffreddamento selettivo della testa [66].

Dopo gli studi su animali sono arrivati i trial su neonati, di cui i più famosi sono il Cool Cap trial [67], NICHD [97] ed il TOBY [68].

1.2.2 Meccanismi protettivi

I meccanismi precisi dell'effetto neuroprotettivo dell'ipotermia sono ancora un campo di studio. In generale, il raffreddamento sopprime molte delle vie che portano alla morte cellulare ritardata. L'ipotermia riduce la domanda metabolica cellulare, l'accumulo di neurotossine e radicali liberi, inibisce la reazione infiammatoria post-ischemica e le vie intracellulari che portano all'apoptosi neuronale [69].

L'abbassamento della temperatura corporea comporta una riduzione del metabolismo cerebrale di circa il 5% per ogni grado Celsius di raffreddamento, l'effetto netto è quindi quello di ritardare la depolarizzazione tipica della cellula in stato di anossia [70].

L'aumento dei livelli di O₂ durante la riperfusione è associato ad un transitorio ma dannoso aumento di specie reattive dell'ossigeno, che porta alla perossidazione dei lipidi della membrana cellulare [71]. Ci sono prove che una riduzione del metabolismo dell'ossigeno grazie al raffreddamento durante questa breve fase può sopprimere l'improvviso aumento dei prodotti di ossidazione [72,73].

Durante la riperfusione, i livelli di neurotrasmettitori tossici calano e il rigonfiamento acuto delle cellule si risolve in circa un'ora [74]. È probabile che questa risoluzione possa essere accelerata dal raffreddamento; misurazioni di microdialisi su un periodo di 5 ore hanno mostrato che l'ipotermia iniziata immediatamente dopo l'ipossia-ischemia nei neonati di suino è associata a livelli ridotti di aminoacidi eccitanti e ridotto ossido nitrico [75].

Dopo la riperfusione, si ha un recupero transitorio del flusso cerebrale, seguito da una fase di ipoperfusione [51]. Quest'ultima non riflette una condizione di scarso apporto di ossigeno cerebrale ma anzi è associata ad un aumento dei livelli di O₂ tissutale [76]. Negli studi su feti di pecora, l'ipotermia terapeutica ha determinato un

aumento della durata della fase di ipoperfusione e questa condizione di riduzione del flusso cerebrale si è vista essere associata ad un migliore outcome di danno neuronale [77].

Il segno della fine della fase di ipoperfusione è il passaggio alla fase di iperperfusione [78], questa fase è fortemente associata al danno neuronale e alla compromissione del funzionamento mitocondriale [53]. A tal proposito si è visto come l'ipotermia sia in grado di diminuire lo sviluppo della fase di iperperfusione [77, 79] e di ridurre il danno alla membrana mitocondriale indotto dalle specie reattive dell'ossigeno [80].

Studi sull'effetto dell'ipotermia sull'accumulo di neurotrasmettitori tossici e di Ca^{++} intracellulare hanno mostrato come non sia in grado di ridurre l'entità, piuttosto l'effetto del raffreddamento è quello di bloccare le conseguenze causate dall'esposizione a questi agenti. Scendendo più nel particolare l'ipotermia previene l'entrata di acqua e ioni nell'ambiente intracellulare prevenendo il rigonfiamento cellulare e quindi l'edema citotossico (*Figura 7*) [81, 84].

L'apoptosi post-ischemia viene innescata dai meccanismi sopra elencati quali tossicità da glutammato, accumulo di Ca^{++} intracellulare, infiammazione e stress ossidativo (*Figura 8*) [84]. La perdita di neuroni apoptotici si aggiunge alla perdita causata dai neuroni necrotici, la somma porta inevitabilmente alla quantità di tessuto perso e quindi alla gravità del quadro clinico. I dati suggeriscono che l'ipotermia abbia un ruolo nel ridurre la morte neuronale da apoptosi, soprattutto nel cervello in via di sviluppo [69]. Studi su suini hanno dimostrato come il raffreddamento riduce la morte neuronale apoptotica ma non quella necrotica, in feti di pecora, infine, si è vista una neuroprotezione correlata alla diminuzione dell'attivazione della caspasi-3 [82].

La lesione cerebrale ischemica porta all'attivazione della cascata infiammatoria con un aumento del rilascio di citochine e interleuchine [83]. Si ritiene che questi composti esacerbino le lesioni nella fase secondaria (*Figura 4*), sia per neurotossicità diretta e induzione di apoptosi sia stimolando le risposte proinfiammatorie delle cellule endoteliali e l'adesione leucocitaria permettendo l'infiltrazione cerebrale. L'ipotermia è un potente inibitore della proliferazione, della produzione di superossido e ossido nitrico da parte delle microglia e riduce l'attivazione microgliale dopo l'evento ischemico transitorio nei feti di pecora [69].

Questi dati suggeriscono che la protezione data dall'ipotermia contro il danno neuronale post-ischemico può essere, in parte, il risultato della soppressione dell'attivazione microgliale.

La distruzione della barriera ematoencefalica è causata da deficit funzionali e strutturali delle sue componenti, quali tight-junctions, proteine di trasporto, proteine di membrana, cellule endoteliali, astrociti, periciti e neuroni. L'ipotermia previene l'attivazione di metalloproteinasi che degradano queste componenti, prevenendo quindi anche il danno alla BEE [86].

Sebbene sia stato dimostrato che l'ipotermia terapeutica influenza varie pathway coinvolte nelle fasi acute e sub-acute dell'ipossia-ischemia, meno è stato studiato per la fase cronica [85]. Recenti lavori si sono concentrati sul fatto se l'ipotermia terapeutica può fornire effetti duraturi, e se possa influenzare il recupero e i meccanismi di riparazione che si verificano nel cervello a lungo termine.

Dopo l'insulto ischemico, i neuroni danneggiati perdono le connessioni sinaptiche e vanno incontro a morte cellulare. Nella fase cronica si è vista una importante attivazione dei processi riparativi endogeni, con effetto netto di neurogenesi e sinaptogenesi [87]. Tuttavia, l'influenza dell'ipotermia terapeutica su questo processo non è ancora chiara. Ci sono alcuni studi [88] che dimostrano che l'ipotermia terapeutica può migliorare sia la maturazione delle cellule progenitrici neurali sia la proliferazione delle cellule staminali neurali. Al contrario, un altro studio [89] ha dimostrato che l'ipotermia non ha avuto alcun effetto sulla neurogenesi. Queste discrepanze potrebbero suggerire che il raffreddamento potrebbe essere utile ma solo se applicato nelle finestre di tempo critiche per fornire effetti sulla neurogenesi post-ischemica significativi. Queste finestre temporali sfortunatamente devono ancora essere definite.

Si pensa che la produzione di nuovi astrociti e l'angiogenesi contribuiscano alla rigenerazione del cervello dopo una lesione cerebrale. Gli astrociti rappresentano la più grande popolazione di cellule nella zona ischemica durante la fase subacuta e cronica [90]. Gli astrociti reattivi costituiscono la componente principale della cicatrice gliale. Si pensa che questa gliosi reattiva e la formazione di cicatrici possano ostruire il processo riparativo anche se non è ancora chiaro il meccanismo esatto [91]. La gliosi può anche esacerbare l'infiammazione e aumentare le risposte al danno ischemico [92].

L'effetto dell'ipotermia sulla gliogenesi non è ancora chiaro, esiste un solo studio [93] che mostra come l'ipotermia sembrerebbe prevenire la gliosi reattiva post-ischemica e la formazione della cicatrice gliale.

È stato dimostrato che l'ipotermia ha un effetto netto di aumento del processo di angiogenesi [94,95] ma il suo significato è ancora poco chiaro. Infatti, alcuni studi suggeriscono che l'angiogenesi può essere dannosa per la riparazione del cervello, in quanto questi vasi di nuova formazione potrebbero non funzionare normalmente [96]. Altri invece suggeriscono un effetto positivo dell'ipotermia [86]. Per chiarire questi effetti incerti ma presumibilmente positivi dell'ipotermia, sono necessarie ulteriori ricerche.

1.2.3 Criteri di inclusione

Nel 2010 l'ILCOR (International Liaison Committee on Resuscitation) ha pubblicato le linee guida secondo cui i neonati a termine con segni di asfissia perinatale da moderata a severa dovrebbero essere sottoposti ad ipotermia terapeutica [99] basandosi sui trial, in particolar modo sui tre principali: il Cool Cap trial [67], NICHD [97] ed il TOBY [68].

In questi studi i metodi di valutazione del grado di asfissia perinatale sono stati diversi (*Tabella 6*) [102], in particolar modo il NICHD non ha utilizzato l'aEEG basandosi esclusivamente su criteri clinici molto stringenti. In tutti gli studi sono stati esclusi i neonati con asfissia perinatale lieve (definita come un SARNAT 1 oppure un tracciato aEEG normale).

Nel complesso, le indicazioni per eseguire l'ipotermia terapeutica nei neonati asfittici sono dettate dalle linee guida ILCOR [99]: neonati con età gestazionale > 35 settimane, peso alla nascita > 1800 g, che hanno meno di 6 ore di vita, e soddisfano i seguenti criteri.

Prova di asfissia perinatale: emogas da sangue del cordone ombelicale che mostra un pH <7.0 o un eccesso di basi (EB) < -16. In alternativa storia di un evento acuto perinatale (distacco placentare, prolasso del cordone), oppure un punteggio Apgar di cinque o meno al quinto e al decimo minuto di vita, oppure necessità di ventilazione a pressione positiva oltre il decimo minuto di vita.

Evidenza di encefalopatia da moderata a grave prima delle 6 h di vita evidenziando alterazioni fra le seguenti: convulsioni, livello di coscienza, attività spontanea, postura, tono, riflessi, e sistema autonomo (*Figura 9*)^[100]. Uno studio di Cochrane ha dimostrato come il protocollo appena descritto sia associato ad un miglioramento dell'outcome dei neonati trattati con ipotermia. In questo riesame sono stati inclusi un totale di 11 studi controllati randomizzati e 1505 bambini con encefalopatia da moderata a grave ed evidenza di asfissia intra-partum. L'ipotermia terapeutica ha portato ad una riduzione statisticamente significativa e clinicamente importante nel risultato combinato di morte o grave ritardo dello sviluppo neurologico a 18 mesi di età^[101].

Nel corso degli anni si è però cercato di espandere i criteri di inclusione in modo da raggiungere una quota maggiore di neonati e potenzialmente quindi salvare più vite o migliorare la qualità di vita di più bambini. Il gruppo di Thoresen^[102] ha trattato con ipotermia sei sottogruppi al di fuori dei criteri di inclusione precedenti; questi gruppi comprendevano neonati raffreddati dopo 6 ore dall'inizio dell'asfissia, neonati pretermine (34-35 settimane gestazionali), neonati con collasso post-natale, emorragia cranica maggiore, malattia cardiaca congenita e patologie che necessitano di attenzione chirurgica. Confrontando l'outcome di questi sei sottogruppi rispetto al gruppo di neonati che rientrava nei criteri si è visto che la proporzione di neonati che è andata incontro a un outcome negativo è sovrapponibile (36% vs 35%). Analizzando i sottogruppi singolarmente (*Tabella 7*) si è però visto che il gruppo con emorragia cerebrale ha avuto un pessimo outcome in 4 su 5 neonati per cui si consiglia prima di raffreddare il neonato di stabilizzarlo dal punto di vista emodinamico^[102].

1.2.4 Indicazioni cliniche

Nei neonati asfittici con encefalopatia da moderata a grave, il raffreddamento deve iniziare entro 6 ore dalla nascita, la temperatura core deve essere mantenuta a 34,5 °C (Cool Cap) o 33,5 °C (NICHD e TOBY), e il raffreddamento deve durare 72 ore, seguito da riscaldamento ad una velocità di 0,5 °C/h^[102].

La decisione iniziale per il gruppo Cool Cap di iniziare entro le 5,5 ore si è basata su studi animali, in particolare su quello di Gunn et. al su feti di pecora^[82]. Inoltre,

studi su animali ^[58,59], ma anche su neonati ^[103] hanno dimostrato come l'intervenire precocemente con l'ipotermia migliora l'outcome, soprattutto quello motorio.

L'attuale protocollo di raffreddamento di 72 ore si basa su una base di solidi studi meccanicistici ed empirici. Studi su grandi animali hanno dimostrato che la fase secondaria di convulsioni, edema e la morte cellulare si risolve nelle 48-72 ore dopo l'evento ischemico. Coerentemente con ciò, il raffreddamento per lo stesso periodo ha migliorato i risultati senza peggiorare l'outcome dopo il riscaldamento ^[51,60]. Studi su feti ovini hanno dimostrato come l'estensione della durata porti a un danno neuronale maggiore ^[63, 104], infine lo studio di Shankaran et. al che ha testato durate differenti in neonati, ha mostrato come prolungare il periodo di raffreddamento non porti ad un beneficio ^[98]. Lo stesso studio ha messo in luce come il raffreddamento al di sotto dei 32 °C sia futile e potenzialmente dannoso.

I criteri di inclusione prevedono che il neonato sia a termine, lo studio di Thoresen ^[102] ha mostrato come neonati lievemente prematuri (34-35 settimane gestazionali) traggano beneficio dall'ipotermia (*Tabella 7*), tendenza confermata anche dallo studio di Rakesh et. al ^[106].

1.2.5 Risultati della terapia

Dai primi tre studi clinici sull'ipotermia, ossia il Cool Cap trial ^[67], NICHD ^[97] ed il TOBY ^[68] sono stati eseguiti altri trial clinici con la finalità di valutare l'efficacia del trattamento ipotermico nei neonati asfittici. Alcuni esempi sono lo studio neo.nEURO.network ^[107], il China Study Group ^[108] e lo studio ICE (Infant Cooling Evaluation) ^[109]. I miglioramenti dell'outcome dei neonati coinvolti in questi studi sono stati sorprendentemente coerenti ^[57]. Tutti i pazienti coinvolti hanno iniziato il raffreddamento entro 6 ore dalla nascita (il raffreddamento è stato cominciato in media tra 4 e 5 ore), sia con raffreddamento selettivo della testa, sia con raffreddamento total body per un massimo di 72 ore.

Ad esempio, nella sperimentazione Coolcap ^[67], I neonati con encefalopatia ipossico-ischemica da moderata a grave sono stati randomizzati in un gruppo trattato con ipotermia terapeutica (temperatura rettale 34-35 °C, n = 116), o in un gruppo trattato con cure convenzionali (n = 118). La morte o grave invalidità a 18 mesi è stata ridotta nei neonati con modificazioni all'aEEG. Tuttavia, non c'era alcun beneficio nei neonati che avevano convulsioni con una soppressione profonda dell'aEEG prima dell'inizio del raffreddamento. Il miglioramento nei neonati con

encefalopatia moderata è correlato a una riduzione di oltre il 50% della disabilità neuromotoria grave nei sopravvissuti e ha migliorato i punteggi BSID-II, senza cambiamenti nella mortalità infantile precoce (*Tabella 8*).

Allo stesso modo, nel trial multicentrico National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) ^[97] 208 bambini sono stati arruolati sulla base di criteri clinici e di laboratorio coerenti con l'esposizione a grave ipossia perinatale associata ad encefalopatia moderata o grave. I bambini del gruppo sperimentale (n=102) sono stati raffreddati ad una temperatura rettale di $33,5 \pm 0,5$ °C per 72 ore utilizzando una coperta di raffreddamento (ipotermia whole body). L'incidenza della morte o della disabilità da moderata a grave a 18 mesi è stata significativamente ridotta nei neonati raffreddati (44%) rispetto ai bambini tenuti ad una temperatura normale (62%) (*Tabella 9*).

Studi successivi hanno avuto risultati simili.

Lo studio TOBY ^[68] ha confrontato il raffreddamento whole body a $33,5 \pm 0,5$ °C per 72 h (n = 163) contro le cure standard (n = 162). Non ci sono stati effetti significativi sulla morte o disabilità a 18 mesi di età, ma la sopravvivenza senza anomalie neurologiche è stata migliorata. Il rischio di paralisi cerebrale è stato ridotto nei sopravvissuti, con miglioramenti nell'indice di sviluppo mentale e nell'indice di sviluppo psicomotorio secondo le Bayley Scales of Infant Development II.

Analogamente, lo studio neo.nEURO.network ^[107] ha confrontato i neonati a termine con encefalopatia ipossico-ischemica randomizzati in un gruppo raffreddato a 33.5 ± 0.05 °C con una cooling blanket per 72 h (n=53) seguita da un riscaldamento lento con il gruppo trattato invece con cure standard (temperatura interna 37 ± 0.5 °C, n=58). A tutti i neonati è stata somministrata analgesia con morfina o fentanil. C'è stata una significativa riduzione della morte o grave disabilità (51% nel gruppo di ipotermia vs 83% nel gruppo di normotermia), e ci sono state meno convulsioni cliniche nel gruppo trattato con ipotermia. Non è noto se la sedazione di routine abbia contribuito al miglioramento clinico.

Il China Study Group ^[108] ha studiato il comportamento di neonati raffreddati con la tecnica head cooling associata ad una temperatura rinofaringea di $34 \pm 0,2$ °C e una temperatura rettale di $34,5-35,0$ °C per 72 h (n = 100) rispetto a neonati trattati con cure standard (temperatura rettale $36,0-37,5$ °C, n = 94). Il raffreddamento è

stato associato a un ridotto rischio di morte o disabilità (31% dopo il raffreddamento vs 49% dopo cura standard).

Infine, lo studio Infant Cooling Evaluation (ICE) ^[109] ha valutato il raffreddamento whole body, indotto dallo spegnimento della lampada radiante e dall'applicazione di impacchi di gel refrigerati, per ottenere una temperatura rettale di $33,5 \pm 0,5$ °C per 72 ore (n=110) vs cure standard (37 °C, n=111). Il raffreddamento è stato associato a un ridotto rischio di morte o di grave disabilità sensoriale a 2 anni di età (Tabella 10).

I dati dei più grandi studi sull'effetto dell'ipotermia terapeutica nei neonati asfittici sono stati analizzati nelle metanalisi di Jacobs et. al prima nel 2007 ^[110] e successivamente nel 2013 ^[101]. I risultati delle metanalisi sono stati di una importante riduzione della mortalità e della disabilità legata al neurosviluppo a 18 e 24 mesi.

Tutti gli studi precedenti hanno valutato un outcome a medio termine (fino ai 24 mesi), Azzopardi dopo aver guidato lo studio TOBY ^[68] ha guidato un altro studio con lo scopo di valutare gli stessi pz a 6 o 7 anni di età in modo da avere dei riscontri sull'outcome a lungo termine ^[41]. Dei 325 neonati entrati nello studio TOBY i dati disponibili riguardano 280 bambini di cui 96 sono morti prima dei 6-7 anni e 184 sono sopravvissuti. La frequenza di sopravvivenza con un punteggio QI di 85 o Superiore era del 52% (75 su 145 Bambini) nel gruppo trattato con ipotermia rispetto al 39% (52 su 132 Bambini) nel gruppo di controllo. Il tasso di mortalità non differisce significativamente tra il gruppo ipotermico (in cui sono morti 47 dei 163 bambini [29%]) e il gruppo di controllo (in cui sono morti 49 dei 162 bambini [30%]). Significativamente più bambini nel gruppo ipotermico che nel gruppo di controllo sono sopravvissuti senza anomalie neurologiche (65 su 145 [45%] vs. 37 su 132 [28%]). Inoltre, fra i sopravvissuti, i bambini del gruppo ipotermico avevano tassi significativamente ridotti di paralisi cerebrale (21% vs. 36%, P = 0,03) e disabilità moderata o grave (22% vs. 37%, P = 0,03) e avevano punteggi significativamente migliori per la funzione motoria grossolana e la capacità manuale.

Oltre alle prove cliniche sono stati eseguiti anche degli studi su immagini tratte da RMN per dimostrare come l'ipotermia terapeutica riduca il danno neuronale a livello cerebrale [111, 116-118].

In conclusione, è possibile affermare che l'ipotermia terapeutica riduce la mortalità e la morbilità per molti neonati asfittici. Tuttavia, per alcuni di questi il rischio di morte e sequele neurologiche è ancora troppo elevato, dimostrando la necessità di associare altre strategie neuroprotettive e di comprendere con maggiore precisione quali neonati possono beneficiare di questa terapia.

1.3 Metabolomica

1.3.1 Definizione

La metabolomica si definisce come lo studio del metaboloma, ossia l'insieme di entità chimiche molecolari coinvolte nel metabolismo di un campione biologico (glucidi, lipidi, peptidi, vitamine e amminoacidi). Al contrario delle tecniche standard, che analizzano un solo metabolita per volta, nella metabolomica si analizzano centinaia o migliaia di metaboliti a peso molecolare (<1KDa) andando a definire un fenotipo metabolico. Quest'ultimo, utile alla caratterizzazione di patologie, alla scoperta di nuovi biomarkers diagnostici, di nuovi obiettivi terapeutici, di monitorare il funzionamento di un trattamento farmacologico e infine di permettere un approccio terapeutico personalizzato [119]. L'impronta metabolica può essere generata da diverse tecniche analitiche, come la spettroscopia NMR, gascromatografia-spettroscopia GC-MS e cromatografia liquida-spettrometria di massa LC-MS [120]. Il cambiamento di queste impronte metaboliche è ciò che può permettere di evidenziare l'insorgenza delle patologie. Bisogna inoltre considerare che il fenotipo metabolico è determinato dall'interazione fra ambiente (dieta, età, stile di vita, farmaci, patologie) e genoma individuale, questo dà vita al trascrittoma, proteoma e infine al metaboloma che rappresenta una e vera e propria immagine di cosa sta accadendo al momento del prelievo.

1.3.2 Metodi di analisi

Il metaboloma può essere analizzato mediante approcci targeted e untargeted ^[121]. Le tecniche untargeted misurano centinaia di metaboliti, con il vantaggio di rilevare delle perturbazioni metaboliche impreviste connesse con una certa malattia. Questo tipo di approccio è quindi utile per trovare nuove pathway metaboliche o nuovi biomarcatori. L'identità chimica dei metaboliti misurati non è necessariamente nota prima dell'inizio dell'esperimento e l'identificazione di questi ultimi viene quindi eseguita successivamente. In questo scenario quindi, l'analisi è senza ipotesi e le limitazioni in termini di copertura del metaboloma sono esclusivamente strumentali ^[122].

Gli approcci targeted, d'altra parte, sono studi in cui i piccoli insiemi predefiniti di metaboliti vengono misurati nel campione in esame, mettendo a fuoco tipicamente solo su alcuni pathway di interesse. I vantaggi di questo tipo di approccio includono un grado più elevato di sensibilità rispetto agli approcci non mirati e la quantificazione assoluta (anziché relativa) dei metaboliti.

1.3.3 Ruolo nell'asfissia perinatale

Il ruolo potenziale della metabolomica nell'asfissia perinatale è un argomento molto interessante che sta acquisendo sempre maggiore importanza e che si pone come obiettivo quello di scoprire nuovi biomarcatori in grado di definire la variabilità interindividuale nei neonati asfittici e quindi di permettere una terapia personalizzata mirata al garantire il miglior outcome possibile. In particolar modo in ambito di HIE l'interesse è maggiore nei confronti di quei metaboliti rilevabili nelle prime sei ore di vita, ossia l'intervallo cruciale per la decisione se sottoporre il neonato all'ipotermia terapeutica o meno.

Il biomarcatore ideale deve essere facile da misurare, deve fornire informazioni nuove rispetto ad altri biomarcatori già noti ed essere in grado di modificare la gestione clinica di un gruppo di pazienti, in termini di diagnostica ma anche di terapia. In aggiunta caratteristiche positive sono un rapporto costi beneficio favorevole ed una sicurezza nel prelievo.

Per l'identificazione dei biomarcatori possono essere utilizzati fluidi biologici differenti. Le misurazioni effettuate sul plasma consentono informazioni veloci e spesso in tempo reale, ma la raccolta del sangue nei neonati può essere difficoltosa da eseguire e rimane relativamente invasiva dato il loro basso volume totale di

sangue. Il sangue del cordone ombelicale è facile da raccogliere ed è disponibile in grandi volumi che consentono analisi multiple; tuttavia, analizza solo la situazione al momento del parto. Gli studi dei biomarcatori su sangue del cordone ombelicale combinati con la successiva analisi di quelli plasmatici sembrano fornire un approccio più interessante e inclusivo ^[128].

La raccolta di urina in teoria è facile e non invasiva, ma può dipendere dalla funzione renale del neonato e in particolare, i neonati con asfissia perinatale sono spesso oligurici o anurici con la conseguenza che possono essere necessarie diverse ore per raccogliere sufficienti quantità di urina (a meno di non procedere a cateterismo vescicale). Questo potrebbe rappresentare un problema, in quanto l'obiettivo è comprendere se il neonato possa beneficiare dell'ipotermia entro sei ore dalla nascita.

I metaboliti più comuni considerati come potenziali biomarcatori includono metaboliti correlati al metabolismo energetico (lattato, piruvato, glicerolo, N-acetilglucosamina, glucosio, galattosio e lattosio), ammine, aminoacidi e intermedi del metabolismo degli aminoacidi (acilcarnitine, corpi chetonici, metaboliti del ciclo di Krebs, metaboliti della biosintesi degli ormoni steroidei) e altri metaboliti misurati nelle urine (aconitato, formiato e acido chinurenico) ^[128].

2. OBIETTIVO

Abbiamo condotto uno studio longitudinale monocentrico il cui obiettivo principale è stato descrivere i cambiamenti dinamici metabolici nel tempo in una coorte di neonati asfittici, con particolare riguardo alle differenze tra fase pre-ipotermia, fase intra-ipotermia e fase post-ipotermia.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Pazienti

Sono stati arruolati nello studio neonati con più di 35 SG con segni e sintomi alla nascita di asfissia perinatale, sottoposti ad IT secondo le raccomandazioni 2012 della Società Italiana di Neonatologia e ricoverati presso la TIN del Dipartimento Salute Donna e Bambino dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova, da maggio 2015 a febbraio 2021. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico del nostro Ospedale (riferimento 4332/AO/17) ed è stato ottenuto un consenso informato scritto da parte dei genitori prima dell'arruolamento.

Tutti i pazienti sono stati categorizzati per età gestazionale, peso neonatale, sesso, indice di APGAR, tipo di parto, necessità e tipo di rianimazione neonatale, interessamento multiorgano, Sarnat-score a 60 minuti, pH e BE (eccesso basi) alla nascita e ad un'ora di vita. Tutti i neonati hanno eseguito monitoraggio neurofisiologico con aEEG e V-EEG ed approfondimento con RMc tra il quarto ed il settimo giorno di vita.

3.2 Campionamento

Sono stati raccolti campioni di urine, almeno 2 ml, attraverso l'utilizzo non invasivo di un batuffolo di cotone. Metodiche invasive di campionamento sono state praticate solo nei neonati che necessitavano di cateterismo urinario per motivi clinici. Successivamente, l'urina è stata raccolta all'interno di un contenitore sterile e congelata a -80°C sino all'analisi.

Tutti i neonati arruolati sono stati sottoposti a campionamento secondo le seguenti tempistiche: alla nascita entro sei ore (pre-IT), durante l'IT (6-72 ore vita), nelle 72 ore post-riscaldamento e dopo la prima settimana di vita. I campioni in ipotermia sono stati categorizzati in T1, se raccolti tra le 6 e le 24 ore di vita, T2 se tra le 24 e 48 ore di vita e T3 se tra le 48 e le 72 ore di vita.

Nei medesimi tempi sovra-riportati sono stati inoltre raccolti campioni di plasma, a partire da circa 1 ml di sangue intero, ottenuto in corso di procedure invasive (posizionamento di catetere venoso ombelicale / catetere arterioso ombelicale /

catetere venoso centrale e/o esecuzione di esami ematochimici da prelievo venoso/arterioso). Il sangue è stato poi centrifugato ed il plasma risultante conservato a -80°C prima di essere analizzato.

Sono stati inoltre raccolti campioni di urina e plasma in una popolazione di neonati sani a termine nei primi tre giorni di vita (controlli). Mentre le urine sono state sempre raccolte attraverso l'utilizzo non invasivo di un batuffolo di cotone (vedi sopra), il plasma è stato ottenuto dalla centrifugazione di sangue ricavato da prelievo capillare attraverso la puntura del calcagno (praticato routinariamente per la determinazione dell'ematocrito, della bilirubina, della glicemia e per l'esecuzione degli screening neonatali).

3.3 Analisi metabolomica: preparazione dei campioni ed analisi tramite cromatografia liquida e spettrometria di massa

L'analisi è stata eseguita presso il Laboratorio di Spettrometria di Massa e Metabolomica dell'Università di Padova, Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, con sede nell'Istituto di Ricerca Pediatrica (IRP), Città della Speranza. Per la preparazione, i campioni di urina sono stati scongelati lentamente prima a +4°C e successivamente a temperatura ambiente. Ogni campione è stato miscelato e centrifugato a 3600 g per 10 minuti a 10°C, e 60 µL di ogni surnatante sono stati trasferiti nei relativi pozzetti di una piastra da 384 pozzetti. Ad ogni posizione sono stati aggiunti 240 µL di soluzione acquosa di acido formico (FA) allo 0,1% (volume finale 300 µL) per ottenere una diluizione di 1:5 del campione. La preparazione è stata gestita tramite un sistema robotico automatizzato Multiprobe II Ex (Perkin Elmer).

Il profilo metabolomico untargeted dei campioni di urina è stato ottenuto tramite un sistema di cromatografia liquida ad alte prestazioni Acquity (ultra performance liquid chromatography, UPLC) (Waters MS Technologies, Ltd., Manchester, UK) accoppiato ad uno spettrometro di massa ad alta risoluzione quadrupolare con rivelatore a tempo di volo (QToF), nello specifico un Synapt G2 HDMS (Waters MS Technologies, Ltd., Manchester, Regno Unito) con una sorgente elettrospray (ESI) che operava in modalità di ionizzazione positiva e negativa. La scansione di massa era in continuo (profile mode), in un intervallo di scansione di 20-1200 m/z,

con velocità di acquisizione di 0.3 s, e con scansioni di massa ogni 10 s. La correzione di massa durante l'analisi è stata ottenuta con un sistema di LockSpray che infondeva una soluzione di leucina encefalina (20µg/L).

La cromatografia è stata condotta con una colonna a fase inversa Acquity HSS T3 (1.7 µm, 2.1 x 100 mm) (Waters Corporation, Milford, CT, USA) termostata a 50 °C.

La fase mobile era composta da 2 fasi: acqua con lo 0.1% di FA (fase A) e metanolo con acetonitrile 90:10 con 0.1% FA (fase B). La durata di una corsa era di 11 minuti con un flusso di 0.5 mL/min. Il gradiente cromatografico iniziava con una fase isocratica di un minuto al 5% di B, un aumento lineare in 2 minuti e mezzo al 30% di B, un successivo aumento lineare in 3 minuti a 95% di B, una fase isocratica al 95% di B per un minuto e mezzo, e una fase di equilibratura al 5% di B per tre minuti, per tornare alle condizioni cromatografiche iniziali.

Campioni di controllo qualità (QC) e campioni di soluzione di standard (Mix) sono stati utilizzati per valutare la riproducibilità e l'accuratezza dell'analisi e per esaminare il contenuto dei metaboliti dei campioni. I QC sono stati preparati da un'aliquota (50 µL) di ciascun campione, miscelati insieme e diluiti con una soluzione di FA allo 0,1% in acqua, la stessa usata per diluire i campioni, con quattro diverse diluizioni (1:2, 1:3, 1:5, e 1:7).

La miscela di Mix consisteva di nove composti standard noti, iniettati nelle stesse condizioni dei campioni per determinare il tempo di ritenzione e la massa nelle suddette condizioni di analisi. I QC e i Mix sono stati quindi iniettati a intervalli regolari di 15 campioni durante la sequenza, per determinare accuratezza di massa e precisione cromatografica, insieme a campioni di Blank (soluzione acquosa allo 0,1% di FA), per identificare ioni specifici dalla fase mobile ed eventuali contaminanti. I campioni sono stati iniettati in modo casuale (secondo una sequenza costruita in Excel) per evitare qualsiasi classificazione spuria derivante dalla posizione del campione nella sequenza.

3.4 Elaborazione dei dati: “Peak picking and pre-processing”

I dati sono stati processati utilizzando il software Progenesis (Waters Corporation, Milford, CT, U.S.A) generando due data-set, uno per la modalità a ionizzazione positiva (ESI+ data set) e l'altro per la modalità a ionizzazione negativa (ESI- data set). I parametri utilizzati per l'estrazione dei dati sono stati ottimizzati attraverso il processamento preliminare dei QC. Abbiamo impostato un filtro a 0.5 e 0.2 per importare dati grezzi dei campioni in Progenesis, rispettivamente per la modalità di ionizzazione positiva e negativa, ed un QC a metà sequenza come riferimento per l'allineamento automatico di tutte le corse nella sequenza.

La sensibilità dell'algoritmo automatizzato per il peak picking era impostata a 5, in un range cromatografico da 0.4 a 8 minuti. Sono stati così estratti i due dataset contenenti le variabili “rt_mass” (dove “rt” è tempo di ritenzione e “mass” è il rapporto massa carica m/z del composto organico).

Le variabili con più del 20% dei dati mancanti sono state eliminate per evitare modelli statistici spuri generati da combinazioni non verosimili delle variabili misurate. Per ogni variabile che passava questo tipo di filtro, i dati mancanti sono stati riempiti con un numero casuale tra zero ed il valore minimo misurato per la variabile. Le intensità di ioni per ogni picco rilevato sono state normalizzate sulla base di modelli di calibrazione ottenuti per i QC con quattro differenti fattori di diluizione (1:2, 1:3, 1:5 e 1:7). Successivamente è stata eseguita una normalizzazione del quoziente probabilistico per tener conto degli effetti della diluizione.

3.5 Analisi statistica

I dati demografici e clinici dei soggetti reclutati sono stati analizzati mediante test esatto di Fisher nel caso di dati qualitativi e mediante test di Mann-Whitney per i dati quantitativi.

I dati ottenuti dall'analisi metabolomica sono stati analizzati mediante analisi dati univariata e tecniche di analisi dati multivariata. In particolare, poiché per uno stesso caso sono stati collezionati almeno un campione di urina nelle tre fasi, è stato necessario applicare tecniche per misure ripetute.

Nel caso univariato, si è applicato linear mixed-effects modelling considerando la fase del trattamento come effetto fisso ed il soggetto per il quale sono state ripetute le misure come effetto casuale. Inoltre, poiché è stato testato più di un metabolita, si è tenuto conto della possibilità di ottenere falsi positivi controllando i risultati del testing secondo il metodo di false discovery rate proposto da Benjamini-Hochberg ^[178].

L'analisi esplorativa è stata realizzata applicando Principal Component Analysis (PCA) ^[179]. La tecnica PCA è una tecnica multivariata che permette di riassumere il contenuto informativo di una tabella di dati, che contiene un elevato numero di variabili descrittive, mediante la costruzione di un piccolo numero di variabili, chiamate componenti principali, che sono ottenute mediante combinazione lineare delle variabili descrittive stesse. In questo modo, una complessa tabella di dati dove le variabili possono essere correlate, ridondanti e affette da forte rumore casuale, può essere studiata attraverso la sua rappresentazione semplificata prodotta dalle componenti principali. Il modello PCA può essere interpretato attraverso utili grafici. In particolare, lo score scatter plot è utilizzato per esplorare le relazioni di similarità fra le osservazioni.

Non esistendo modelli multivariati che tengano conto delle misure ripetute in modo rigoroso, si è proceduto sviluppando un nuovo tipo di modello che combina linear mixed-effects modelling e Partial Least Squares (PLS) regression ^[180].

L'approccio è molto simile a quello recentemente pubblicato in Peila et al. ^[181] ed è descritto nel seguito. Il contributo legato al soggetto è stato stimato per ciascuna variabile utilizzando il modello linear mixed-effects modelling impiegato per l'analisi univariata codificando il fattore fisso qualitativo "fase del trattamento" come descritto nel riferimento ^[182] per i probability-data. La trasformazione isometric log-ratio è stata utilizzata per trasformare i probabilitydata nel fattore fisso del modello. In questo modo è stato possibile stimare il contributo X_{random} alla variabilità totale della matrice dati X ottenuta dall'analisi metabolomica considerando gli effetti casuali del modello univariato come elementi di X_{random} . La matrice residua $Y = X - X_{\text{random}}$, che contiene gli effetti legati alla fase di trattamento, è stata poi investigata mediante PLS considerando come risposta la matrice degli effetti fissi del modello linear mixed-effects modelling. Il numero di componenti del modello PLS è stato stimato mediante randomization

test sugli autovalori del problema di minimizzazione locale PLS2 assumendo una significatività $\delta=0.05$. La post-trasformazione del modello e la procrustes analysis applicata al modello post-trasformato ha permesso di ottenere i fattori latenti del modello che è pertanto risultato avere la forma $X=FPt + X_{random} + E$ dove F e P sono la matrice dei fattori latenti e quella dei relativi loading, rispettivamente, ed E è la matrice dei residui.

Le variabili rilevanti sono state identificate analizzando il biplot ottenuto dal modello. Questo grafico è costruito calcolando la correlazione di Pearson fra le variabili misurate e i due fattori latenti del modello scelti come riferimento, e scalando tali fattori in modo tale che la massima distanza dall'origine di una osservazione sia 1. Nel grafico sono pertanto riportate sia le variabili che le osservazioni all'interno di un cerchio di raggio unitario. Più il punto rappresentativo di una variabile è vicino ad una osservazione, più quella variabile assume valori elevati per quella osservazione. Inoltre, più l'immagine di una variabile ottenuta mediante inversione rispetto al centro del grafico è vicina ad una osservazione, più quella variabile assume valori bassi per quella osservazione. Queste relazioni sono credibili tanto più i punti si avvicinano alla circonferenza limite del grafico. La significatività della correlazione fra variabile e fattore latente è stata ottenuta calcolandone il p-value mediante randomization test del modello multivariato (1000 permutazioni casuali).

Poiché l'analisi dati univariata e quella multivariata esplorano proprietà diverse delle variabili misurate risultando fra loro complementari, si è proceduto unendo le variabili rilevanti nei due approcci in un unico insieme di variabili rilevanti sottoponendo poi tale insieme a over-representation pathway analysis.

La piattaforma R 4.0.4 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) è stata utilizzata per implementare apposite function per l'analisi dati mentre la pathway analysis è stata realizzata con la piattaforma web Metaboanalyst 5.0 (www.metaboanalyst.ca).

4. RISULTATI

4.1 Caratteristiche della popolazione

Per 12 soggetti sono stati collezionati campioni di urina prima della fase di ipotermia (T0), durante la fase di ipotermia (IPO) e dopo ipotermia (PT). In particolare, 4 soggetti hanno presentato danni rilevati mediante MRI e 8 nessun danno rilevabile mediante MRI. A scopo dimostrativo, sono stati reclutati anche 22 soggetti sani che non differiscono per la distribuzione di età gestazionale, peso alla nascita, tipo di parto e sesso rispetto ai casi.

In *Tabella 12* sono riportate le caratteristiche principali dei soggetti studiati.

Qualora fossero presenti più di un campione per fase, è stato calcolato il profilo mediano del metaboloma urinario determinato mediante spettrometria di massa. Di conseguenza, è stato ottenuto un data set composto da 36 osservazioni e 1791 variabili `time@mass`. L'annotazione delle variabili ha permesso di identificare (annotazione a livello 1) 96 metaboliti, le cui variabili sono state le sole ad essere considerate nell'analisi dati che segue. A scopo dimostrativo, le variabili annotate per i casi sono state determinate anche nei campioni di urina dei soggetti sani ed il data set risultante è stato esplorato mediante PCA. Dopo aver autoscalato le variabili è stato ottenuto un modello che ha presentato 2 componenti principali, $R^2 = 0.54$ e $Q^2 = 0.45$. Lo score scatter plot relativo è riportato in *figura 10*. Si può notare come i campioni dei soggetti sani e quelli dei soggetti sottoposti a ipotermia occupino regioni diverse dello spazio descritto dalle due componenti del modello dimostrando una chiara differenza a livello dei metaboliti misurati. Inoltre, il gruppo dei sani risulta disperso in una regione più ampia rispetto a quella dei casi indicando una maggiore variabilità a livello di metaboloma urinario.

4.2 Risultati dell'analisi metabolomica

Si è proceduto poi all'analisi statistica relativa ai soli campioni dei casi, vero obiettivo di interesse per lo studio. L'analisi dati univariata basata su linear mixed effect modelling tenendo conto della correzione per false discovery rate e assumendo una significatività $\delta=0.05$, ha permesso di rilevare 23 metaboliti che modificano il loro comportamento nelle tre fasi investigate.

L'analisi multivariata basata su PLS considerando le variabili autoscalate ha permesso di costruire un modello che ha presentato 2 componenti, $R^2Y1=0.45$, $R^2Y2=0.55$ e $p=0.022$. Assumendo un livello di significatività $\delta=0.05$, l'analisi del biplot riportato in *figura 11* ha permesso di selezionare 23 metaboliti come rilevanti nello spiegare le differenze a livello di metaboloma urinario durante le tre fasi. Come si può notare osservando il biplot, i campioni di urina dei soggetti studiati occupano regioni di spazio che corrispondono alle diverse fasi provando che il metaboloma urinario si modifica da una fase all'altra.

Unendo i risultati dell'analisi dati univariata e multivariata, 31 metaboliti sono risultati essere rilevanti nella descrizione dei cambiamenti a livello di metaboloma urinario durante le tre fasi investigate. In *tabella 13* sono riportati i metaboliti ed il loro comportamento in termini di fold change (FC) calcolati rimuovendo gli effetti casuali ottenuti dall'analisi di tipo linear mixed-effects modelling.

I metaboliti rilevanti sono stati investigati mediante over-representation pathway analysis al fine di evidenziare quali pathway metabolici risultano perturbati durante le tre fasi. I risultati dell'analisi ottenuti considerando i pathway inclusi in Small Molecule Pathway Database (SMPDB) sono riportati in *Figura 12*. In particolare, i pathway relativi a steroidogenesis, lysine degradation e carnitine synthesis hanno presentato $p<0.10$.

5. DISCUSSIONE

In questo studio, lo scopo è stato quello di valutare le variazioni del metaboloma urinario nel neonato asfittico prima (T0), durante (IPO) e dopo (PT) il trattamento con ipotermia terapeutica. Il gruppo di lavoro è già stato in grado, grazie all'analisi metabolomica untargeted su campioni raccolti esclusivamente durante l'ipotermia, di dimostrare l'esistenza di un profilo specifico nel metaboloma urinario capace di discriminare i neonati asfittici con danno neurologico confermato dal neuroimaging dai neonati asfittici con neuroimaging normale.

La più recente analisi statistica su campioni T0, IPO e PT; tramite la combinazione di analisi univariata e multivariata è stata in grado di mostrare come il metaboloma a T0 dei pz asfittici sia estremamente differente da quello dei pz sani (nido). Inoltre, è stata in grado di evidenziare 31 metaboliti rilevanti nel descrivere la variazione del metaboloma urinario nelle tre fasi e di evidenziare due pathways metabolici che sembrano essere rilevanti nel processo di risposta al danno ipossico-ischemico. Questi sono rispettivamente il pathway di steroidogenesi e quello di degradazione della lisina. Sono poi risultate perturbate altre due classi di metaboliti, relativi al metabolismo energetico mitocondriale (beta ossidazione) e al catabolismo del triptofano.

5.1 Metaboloma urinario patologico e sano

Dall'analisi metabolomica sui pazienti reclutati, tenendo conto dei campioni urinari prelevati prima dell'ipotermia (T0) e quindi entro le sei ore dalla nascita, è stato possibile determinare come il metaboloma urinario dei neonati asfittici è significativamente diverso dal metaboloma urinario dei neonati sani (campioni prelevati al nido, *Figura 10*). Anche lo studio di Locci et. al ^[127] ha descritto un comportamento sovrapponibile, questo studio ha analizzato campioni di urine di neonati con encefalopatia ipossico-ischemica raccolti alla nascita, durante l'ipotermia, al termine dell'ipotermia, ad una settimana di vita ed infine ad un mese di vita. L'analisi multivariata dei campioni alla nascita confrontati con campioni di neonati sani ha dimostrato come ci sia una importante differenza fra i due profili metabolomici, il che rende ragione del potenziale della metabolomica nel caratterizzare dal punto di vista metabolico un assetto clinico molto diverso.

Tenendo invece conto delle tre misurazioni temporali (T0, IPO e PT) è interessante notare come la variabilità del metaboloma urinario sia maggiore nelle fasi pre-

ipotermia (T0) e post-ipotermia (PT) mentre nella fase di ipotermia (IPO) tale variabilità è diminuita notevolmente (*Figura 11*); questo potrebbe indicare come l'intervento terapeutico ipotermico avvicini in termini metabolomici sia i neonati con danno che senza danno.

È possibile che questo comportamento possa essere spiegato considerando l'effetto dell'intervento medico durante l'ipotermia, che sposta tutti i pazienti verso la stessa condizione di equilibrio, modificando di fatto il loro metaboloma urinario.

Questo comportamento è stato descritto anche nello studio di Piñeiro-Ramos et al. ^[129] dove il metaboloma urinario dei soggetti reclutati ha mostrato delle differenze importanti nella fase pre-ipotermia, differenze che sono però quasi del tutto scomparse durante la fase di ipotermia e ricomparse 24 ore dopo la fine del trattamento.

5.2 Analisi dei pathway

L'analisi metabolomica sui campioni raccolti prima (T0), durante (IPO) e dopo l'ipotermia (PT) analizzati tramite la combinazione delle analisi univariata e multivariata ha permesso di evidenziare 31 metaboliti rilevanti (*Tabella 13*).

L'analisi dei pathway mira a disporre la lista apparentemente disgiunta dei metaboliti alterati in un contesto biologico più ampio assegnando i metaboliti alle vie metaboliche pertinenti, fornendo quindi una rete di interazione e spunti per studi futuri di metabolomica targeted. Lo studio di Piñeiro-Ramos et al. ^[129] ha trovato alterazioni per un totale di dieci vie metaboliche interessate, comprendenti intermedi del metabolismo degli amminoacidi, dei lipidi, di cofattori e vitamine, della biosintesi dei glicani e degli acidi nucleici. Inoltre, confrontando i dati con quelli di uno studio precedente sempre guidato da Piñeiro-Ramos ^[130] si è notato come alcune pathway alterate nel metaboloma urinario siano alterate anche nel metaboloma plasmatico, in particolare metabolismo dell'arginina e della prolina, la degradazione della lisina, il metabolismo dell'azoto e la biosintesi degli ormoni steroidei. La concordanza fra profilo urinario e plasmatico potrebbe quindi indicare che lo sviluppo di lesioni cerebrali secondarie all'asfissia influenzi ampiamente il metabolismo.

In questo studio l'analisi dei pathway ha messo in luce due pathway principali: il pathway di steroidogenesi e il pathway di degradazione della lisina (*Figura 12*). È interessante notare come ci sia una concordanza con gli studi di Piñeiro-Ramos et

al. ^[129,130] per quanto riguarda le pathway di steroidogenesi e di degradazione della Lisina.

L'analisi metabolomica ha messo in luce anche altre due classi di metaboliti, coinvolti nel metabolismo energetico associato alla β -ossidazione e nel catabolismo del triptofano.

5.2.1 Pathway di steroidogenesi

Con steroidogenesi si intende la biosintesi degli steroidi negli organismi viventi. Gli ormoni steroidei regolano vari processi biologici, fra cui equilibrio idro-salino, sviluppo sessuale, funzione riproduttiva, risposta immunitaria e risposta allo stress ^[134]. Gli ormoni steroidei possono essere raggruppati secondo il loro legame recettoriale in progestinici, androgeni, estrogeni, mineralcorticoidi e glucocorticoidi. Una volta che gli steroidi sono prodotti nei tessuti steroidogenici (gonadi, surreni, placenta e cervello) ^[135,136], entrano nella circolazione e sono convertiti in un gran numero di metaboliti dal fegato e dai tessuti periferici prima di essere escreti nelle urine. In questo modo, tutti questi processi contribuiscono alla formazione del metaboloma steroideo, che può essere caratterizzato analizzando campioni di sangue o urina.

Durante la vita fetale gli steroidi sono prodotti principalmente nella zona fetale delle ghiandole surrenali, nei testicoli (le ovaie sono quiescenti), a livello placentare e cerebrale ^[137,138]. La zona fetale è una porzione della corticale del surrene che nel periodo fetale è deputata alla sintesi di androgeni e che subito dopo la nascita scompare per aumentata apoptosi, portando quindi ad una rapida involuzione delle ghiandole surrenali e a una diminuzione della secrezione di androgeni ^[139]. Lo studio di Dhayat et al. ^[140] ha cercato di descrivere il metaboloma urinario riguardante il metabolismo steroideo in bambini sani tramite uno studio longitudinale su 44 bambini, sono stati analizzati campioni raccolti dalla prima settimana di vita fino alla quarantanovesima per un totale di tredici punti temporali. Lo studio è arrivato alla misurazione di 67 steroidi a livello urinario con la conclusione che l'escrezione di steroidi urinaria è elevata per i primi due mesi di vita con un picco a tre settimane, segue poi un calo dell'escrezione pari all'80% alla venticinquesima settimana ^[140].

In questo studio, l'analisi del metaboloma urinario ha identificato otto steroidi come significativi (aldosterone, pregnenolone, 17 α -hydroxypregnenolone,

tetrahydrodeoxycorticosterone, cortolone, 21-deoxycortisol, 7 α -hydroxydehydroepiandrosterone, 3 α ,21-Dihydroxy-5 β -pregnane-11,20-dione), sette di questi hanno mostrato una riduzione durante la fase di ipotermia e nella successiva fase di riscaldamento (FC<1, *Tabella 13*) e solamente il 7 α -hydroxydehydroepiandrosterone presenta una tendenza inversa, tendente a salire leggermente dal tempo T0 alla fase PT.

Fra gli steroidi, parlando di asfissia perinatale, acquistano particolare importanza gli steroidi neuroattivi NASs (NeuroActive Steroids). Questi ultimi sono prodotti a livello dei surreni, delle ovaie, del tessuto cerebrale e a livello dell'unità fetoplacentare ^[142] a partire dal metabolismo di deossicortisone, testosterone e progesterone ^[141].

Fra i NASs l'allopregnanolone sembra avere un ruolo chiave nella vita fetale e nella risposta al danno ipossico ischemico ^[143]. La sua concentrazione è molto elevata soprattutto nella fase tardiva della gravidanza grazie alla presenza di elevate concentrazioni di precursori forniti dalla placenta ^[144], in studi animali su modelli ovini e su porcellini d'india, inoltre, si è visto come a livello cerebrale ci sia un aumento della concentrazione degli enzimi di sintesi nella fase finale della gravidanza ^[145,146]. Il ruolo nella risposta al danno ipossico-ischemico è stato dimostrato grazie ad esperimenti su ovini ^[147,148] in cui in seguito ad induzione di una condizione ipossico-ischemica tramite occlusione del cordone ombelicale si è visto un importante aumento della concentrazione di allopregnanolone a livello sia della sostanza bianca che grigia cerebrali. Inoltre, è stato somministrato in una porzione di campioni ovini finasteride (inibitore della 5- α -reduttasi II) andando quindi a bloccare la produzione di allopregnanolone, in questa popolazione si è visto un aumento della morte cellulare indotta dall'insulto ipossico-ischemico. Come trattato nella parte introduttiva, la presenza di convulsioni peggiora l'outcome del pz, in quanto queste portano ad un aumento del metabolismo cerebrale e ad una redistribuzione locale del flusso ematico sacrificando quello alle zone danneggiate. Inoltre, le convulsioni sono associate alla produzione di molecole neurotossiche (citochine infiammatorie, glutammato, lattato, specie reattive dell'ossigeno) ^[153]. L'allopregnanolone agisce modulando i recettori GABA_A riducendo l'eccitazione neuronale e di conseguenza sopprimendo l'attività convulsiva determinando quindi una riduzione di tali meccanismi nocivi.

Fisiologicamente, dopo il parto e quindi la rimozione della placenta, nel bambino si ha un rapido calo dell'allopregnanolone; questo sembra avere il ruolo di rimuovere la depressione tonica del SNC tipica della fase uterina. Nei neonati con danno ipossico-ischemico però la riattivazione GABAergica predispone allo sviluppo di convulsioni e quindi al danno neuronale.

Oltre alla modulazione del segnale GABAergico, l'allopregnanolone lega e attiva i recettori di membrana del progesterone mPRs (membrane Progesterone Receptors) ^[149] determinando una azione antiapoptotica ^[150, 151]. Questa azione sui recettori mPRs è condivisa anche dal ganalozone ossia un neurosteroido sintetico analogo all'allopregnanolone che sta venendo studiato in ambito terapeutico per trattare le convulsioni neonatali e che sembra avere un ruolo neuroprotettivo antiapoptotico ^[152]. Proprio il ganalozone viste le proprietà che sono in esame negli studi citati potrebbe essere una molecola in grado di coadiuvare l'ipotermia terapeutica, e rappresenta quindi un ottimo spunto per studi successivi.

Analizzando i nostri dati, abbiamo osservato una tendenza abbastanza omogenea di abbassamento dei livelli di steroidi urinari dalla fase T0 verso la fase PT (valori di FC<1 in *Tabella 13*). Questa alta concentrazione di steroidi urinari nelle fasi di insulto ipossico-ischemico seguita da un declino potrebbe essere interpretata come un meccanismo iniziale di neuroprotezione endogena successivamente attenuato dalle misure terapeutiche esterne, in primis il trattamento ipotermico. Un altro potenziale fattore che potrebbe spiegare il calo di steroidi urinari è il loro utilizzo nei processi di neuroprotezione e riparazione a livello cerebrale in risposta all'insulto ipossico-ischemico.

Curiosamente, la concentrazione urinaria di 7-hydroxydehoepiandrosterone (7 α -OH-DHEA) ha mostrato una tendenza ad aumentare leggermente nel tempo nei nostri pazienti, in particolare nella fase PT. Questo NAS agisce come antiossidante ^[154-156] e anti-glucocorticoide ^[157-159], promuovendo la risposta immunitaria ^[160-162] e, come già chiarito, neuroprotezione (in particolare contro il danno ipossico-ischemico). Ha inoltre un ruolo nello stimolare la neurogenesi e la sopravvivenza dei neuroni di nuova formazione contro la soppressione indotta dal corticosterone. Una possibile spiegazione della sua persistenza nel tempo nelle urine analizzate, a differenza delle altre classi di steroidi, è che i derivati del

DHEA sono i NAS circolanti più rappresentati nell'uomo ^[157] e hanno un'emivita relativamente lunga rispetto ad altri composti steroidei ^[163].

Anche Piñeiro-Ramos et al. ^[129], hanno trovato una significativa perturbazione nella via della biosintesi degli ormoni steroidei, più pronunciata a 24 ore dall'inizio dell'ipotermia terapeutica.

Questi risultati insieme indicano l'opportunità di indagare il potenziale ruolo neuroprotettivo del NAS somministrato in modo esogeno ai neonati asfittici.

5.2.2 Pathway di degradazione della lisina

La lisina è un amminoacido essenziale incorporato in quasi tutte le proteine del nostro organismo, è noto come sia espressa a livello cerebrale in misura maggiore rispetto ad altri organi. È direttamente coinvolta nella modulazione dell'espressione genica e ciò porta ad uno spettro di azioni molto vasto che comprende modulazione dei processi di proliferazione cellulare, differenziazione ed eccitabilità, nonché interazione intercellulare attraverso sistemi neurotrasmettitoriali ^[131].

Studi animali eseguiti su modelli murini da Kondoh et al. ^[132] e Cheng et al. ^[133] suggeriscono che l'amminoacido L-lisina possa avere un ruolo neuroprotettivo ^[132], antinfiammatorio ^[133] e di modulazione della risposta allo stress ^[131].

Nello studio di Kandoh et al. si è inoltre studiato l'effetto della somministrazione di L-lisina in topi sottoposti ad insulto ipossico-ischemico confrontando l'outcome (misurato tramite RMN) con un gruppo di controllo. Ne è risultato che la somministrazione di L-lisina porta ad una diminuzione dell'edema cerebrale con un effetto dose dipendente, soprattutto nella regione della corteccia ^[132]. Lo stesso studio ha mostrato come la somministrazione di L-lisina nella stessa popolazione murina ha portato alla diminuzione della zona infartuale causata dall'insulto ipossico-ischemico. Inoltre, si è anche visto come la somministrazione di L-lisina sia correlata ad una diminuzione dell'attività glutammatergica andando quindi a diminuire la concentrazione di Ca^{++} intracellulare e di conseguenza anche il danno neuronale.

Questi studi su modelli animali pongono le basi per successivi studi che potrebbero portare ad una comprensione migliore degli effetti della L-lisina nella risposta agli insulti ipossico-ischemici e alla possibilità di un suo utilizzo terapeutico in combinazione con l'ipotermia.

In questo studio fra i metaboliti pertinenti che descrivono le variazioni del metaboloma nel tempo, la L-lisina mostra un trend di diminuzione costante da T0 a IPO e da IPO alla fase di PT. Parallelamente a questa diminuzione, i prodotti di degradazione della lisina (oxoglutaric acid, aminoapodic acid) mostrano un aumento costante e significativo tra T0, IPO e PT (FC[IPO/T0] 1.31, FC [PT/T0] 2.85 per l'acido ossoglutarico e 1.99 e 2.39 per l'acido aminoapodico, rispettivamente). Questa tendenza è spiegabile ipotizzando un'attivazione della via di degradazione della lisina, come mostrato nella *Figura 12*.

Confrontando solo le urine ottenute durante il trattamento ipotermico nella stessa coorte originaria di pazienti, in precedenza abbiamo notato che la lisina intatta era più alta nelle urine dei pazienti senza encefalopatia ipossico-ischemica alla risonanza magnetica cerebrale; inoltre, questa tendenza persisteva per tutta la fase dell'ipotermia terapeutica. Queste osservazioni depongono per un potenziale ruolo neuroprotettivo e neuromodulante di questo amminoacido, come riportato nei modelli animali precedentemente citati.

Anche gli studi di metabolomica di Piñeiro-Ramos et al. ^[129,130] hanno mostrato un aumento dei metaboliti della via di degradazione della lisina nei pazienti con danno neurologico rispetto a quelli che non hanno sviluppato danno, sia su urine che su plasma.

Tenendo conto di queste considerazioni è possibile teorizzare come la L-lisina nella sua forma intatta possa avere un ruolo neuroprotettivo importante nel danno ipossico-ischemico cerebrale e che i suoi prodotti di degradazione siano un indice di danno ipossico-ischemico neuronale.

5.2.3 Metabolismo energetico e β -ossidazione

L'analisi dei metaboliti nelle tre fasi dell'ipotermia ha dimostrato una perturbazione significativa nell'ambito del metabolismo energetico. I metaboliti rilevanti sono amminoacidi acetilati (N-Acetylvaline, N-Acetyl-L-tyrosine, N-Acetyl-L-aspartic acid, N-Acetylglutamic acid) e acetilcarnitine (Butyrylcarnitine, L-Octanoylcarnitine, Valerylcarnitine). Tutti, ad eccezione della butirril-carnitina, hanno dimostrato un aumento nelle fasi da T0 a IPO e da IPO a PT.

Le acetil-carnitine rappresentano un gruppo interessante di studio, derivano dall'associazione di una molecola di carnitina con un Acetil-CoA.

La L-carnitina è un composto naturale presente nella maggior parte, se non in tutti, i tessuti dei mammiferi, compreso il cervello ^[164]. Mentre gli acidi grassi a catena media e corta possono entrare liberamente nei mitocondri per diffusione attraverso le membrane ^[164], la L-carnitina ha un ruolo essenziale nel trasferimento di acidi grassi a catena lunga attivati (acidi grassi a catena lunga legati al CoA) all'interno dei mitocondri in una serie di reazioni chiamate "carnitine shuttle" in modo che possano andare incontro a β -ossidazione ^[164-165].

Più nel dettaglio a livello del citosol la L-carnitina viene associata ad un Acetil-CoA formando Acetil-Carnitina, questa viene trasportata nell'ambiente mitocondriale dove viene scissa nuovamente nelle sue due parti dall'enzima carnitina-palmitoil-transferasi II. Successivamente l'Acetil-CoA andrà incontro alla β -ossidazione mentre la carnitina verrà portata nuovamente nel citosol (*Figura 13*) ^[166].

Oltre al ruolo energetico la L-carnitina è coinvolta anche in altri meccanismi a livello cerebrale, più nel dettaglio il gruppo acetile trasportato nell'ambiente mitocondriale è utilizzato, oltre che per la β -ossidazione, anche per la produzione di neurotrasmettitori quali GABA e glutammato (*Figura 13*) ^[166]. Inoltre, il "carnitine shuttle" è fondamentale per evitare l'accumulo intracellulare di acidi grassi, condizione associata a neurotossicità ^[177].

L'accumulo di acetilcarnitine e amminoacidi acetilati che abbiamo riscontrato in questo studio potrebbero essere indice del blocco del metabolismo cellulare associato al processo ipossico-ischemico, con incapacità da parte dei neuroni di utilizzare tali substrati energetici da cui deriva l'accumulo nelle urine in seguito alla morte neuronale. Quest'ultima potrebbe inoltre essere facilitata dal blocco del "carnitine shuttle" che porta all'accumulo di acidi grassi a catena lunga nell'ambiente intracellulare determinando neurotossicità.

Negli ultimi anni vi è stato un notevole interesse per il potenziale terapeutico della L-carnitina e della sua forma acetilata acetil-L-carnitina (ALCAR) nel campo della neuroprotezione ^[166]. Ad oggi gli studi sull'applicazione di queste due molecole, nell'ambito di ipossia-ischemia nel periodo neonatale, sono stati eseguiti solamente su modelli murini. Wainwright et al. ^[167] hanno dimostrato che il pretrattamento di cuccioli di ratto (7 giorni di vita) con L-carnitina (16 mmol/kg) 30 minuti prima di indurre ipossia-ischemia ha portato a risultati migliori a 7 e 28 giorni dopo insulto.

Il pretrattamento con L-carnitina ha portato a una perdita di tessuto significativamente minore nell'emisfero ipsilaterale, rispetto ai controlli sia a 7 giorni che a 28 giorni. Altri studi hanno dimostrato un effetto protettivo simile in caso di somministrazione di ALCAR (100 mg/Kg sottocute), si è vista una riduzione delle dimensioni della lesione cerebrale alla risonanza magnetica nucleare e minori deficit motori e dello sviluppo neurologico [166, 168-169].

La neuroprotezione è mediata dall'attenuazione dell'infiammazione, dal controllo dell'insufficienza energetica, dalla prevenzione del danno ossidativo alle proteine cellulari e mitocondriali, dal mantenimento delle funzioni neuronali e gliali e le capacità biosintetiche. Sia la L-carnitina che ALCAR sembrano in grado di mediare questi effetti a livello cerebrale. Inoltre, l'ALCAR ha la capacità aggiuntiva di fornire un acetil-CoA che può essere ossidato a scopo energetico, utilizzato come precursore per l'acetilcolina o incorporato nel glutammato, glutammina, GABA e nei lipidi per la mielinizzazione e la crescita cellulare [166].

In letteratura non esistono studi di metabolomica su neonati che si sono concentrati sulla carnitina, è interessante però il lavoro su modello murino di Takenouchi et al. [170] in cui si è visto un aumento della carnitina nel metaboloma di cuccioli di topo in cui è stata indotta ischemia e sottoposti a ipotermia, suggerendo che uno dei meccanismi protettivi alla base del funzionamento del trattamento ipotermico potrebbe essere il controllo della concentrazione di Acetil-CoA intracellulare.

5.2.4 Metabolismo del triptofano

Il triptofano è un amminoacido essenziale, precursore biochimico per due importanti vie metaboliche: la sintesi della serotonina e il pathway della chinurenina che porta alla produzione di nicotinammide adenina dinucleotide (NAD⁺) (*Figura 14*) [171,176].

La via serotonergica sembra essere alterata a livello cerebrale dopo un insulto di tipo ipossico-ischemico ma sono necessari altri studi che ne identifichino il ruolo [172-173]. Uno di questi potrebbe essere la sua capacità di essere convertita in melatonina che è una sostanza con azione neuroprotettiva naturale, che ha la capacità di rimuovere le specie radicali dell'ossigeno e che promuove la produzione di altri enzimi antiossidanti [174]. In questo studio abbiamo rilevato due metaboliti inerenti al metabolismo del triptofano che sono la L-chinurenina (L-kynurenine) e l'acido chinurenico (kynurenic acid) che sono rispettivamente un prodotto

intermedio e un prodotto finale del processo di degradazione del triptofano. Fra i due l'acido chinurenico è quello con maggiore azione neuroprotettiva, agendo sia a livello della neurotossicità indotta da neurotrasmettitori che sul danno causato dalle specie reattive dell'ossigeno (*Figura 15*) [175].

L'acido chinurenico è noto sin dagli anni '80 per la sua azione antagonista sui recettori glutammatergici NMDA [175]. Come detto in precedenza, l'attivazione anomala dei recettori glutammatergici causata dall'escrezione di neurotrasmettitori eccitatori in seguito al fenomeno ipossico comporta un aumento della concentrazione di Ca^{++} intracellulare che porta ad un'alterata attivazione di proteasi, lipasi ed endonucleasi e di conseguenza danno e morte cellulare apoptotica. L'azione dell'acido chinurenico è quindi neuroprotettiva andando a diminuire l'attivazione di questi recettori e come diretta conseguenza abbassando la concentrazione di Ca^{++} intracellulare. Oltre a ciò, ha anche una azione inibitoria verso le specie reattive dell'ossigeno, anche questo contribuisce a proteggere le cellule neuronali dal danno da riperfusione dopo un fenomeno ipossico-ischemico [175].

5.2.5 Limiti e prospettive future

Questo studio non è esente da limiti. Rispetto alla coorte iniziale solamente 12 pazienti avevano campioni di urina raccolti nelle tre fasi temporali indagate (prima, durante e dopo l'ipotermia). Questa numerosità non ha permesso di suddividere ulteriormente i pazienti sulla base dello sviluppo di encefalopatia ipossico-ischemica rilevata tramite le indagini radiologiche eseguite con risonanza magnetica nucleare.

Tuttavia, è stato possibile valutare l'andamento del metaboloma urinario prima, durante e dopo il trattamento ipotermico; questo ha portato all'identificazione di vie metaboliche coinvolte nei meccanismi di neuroprotezione (steroidogenesi e catabolismo triptofano), di alterazione del metabolismo energetico (beta ossidazione) e più in generale di danno ipossico-ischemico neuronale (degradazione della lisina).

6. CONCLUSIONI

In questo studio abbiamo descritto l'andamento del metaboloma urinario in neonati asfittici sottoposti ad ipotermia analizzando campioni raccolti in tre fasi specifiche: prima dell'ipotermia (T0), durante l'ipotermia (IPO) e al termine dell'ipotermia (PT). La combinazione dell'analisi univariata e multivariata ha permesso di identificare 31 metaboliti rilevanti nel descrivere l'andamento del metaboloma urinario in queste tre fasi.

La pathway analysis ha permesso di identificare le vie metaboliche perturbate nelle tre fasi, di particolare importanza sono il pathway di steroidogenesi ed il pathway di degradazione della lisina. Sono risultati perturbati anche il metabolismo energetico associato alla β -ossidazione ed il metabolismo del triptofano con particolare attenzione alla chinurenina e all'acido chinurenico.

Le alterazioni riscontrate pongono le basi per valutare potenziali strategie di neuroprotezione nei neonati con encefalopatia ipossico-ischemica. A tal proposito sono necessari studi randomizzati controllati che possano definire se questi metaboliti possano essere impiegati dal clinico come uno strumento efficace nella decisione terapeutica di utilizzo dell'ipotermia terapeutica nei neonati asfittici.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Rainaldi MA, Perlman JM. Pathophysiology of Birth Asphyxia. *Clin Perinatol*. 2016 Sep;43(3):409-22. doi: 10.1016/j.clp.2016.04.002. Epub 2016 Jun 17. PMID: 27524444.
2. American Congress of Obstetricians and Gynecologists (ACOG). Committee Opinion. Number 326. Inappropriate use of the terms fetal distress and birth asphyxia. *Obstet Gynecol* 2005;106:1469–70.
3. Nicolaides K, Economides D, Soothill P. Blood gases, pH, and lactate in appropriate-and small-for-gestational-age fetuses. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161(4):996–1001.
4. Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC. Fanaroff and Martin's neonatal-perinatal medicine: diseases of the fetus and infant. 9th edition. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2011.
5. Walker J, Turnbull EN. Haemoglobin and red cells in the human foetus and their relation to the oxygen content of the blood in the vessels of the umbilical cord. *Lancet* 1953;262(6781):312–8.
6. Li H, Gudmundsson S, Olofsson P. Clinical significance of uterine artery blood flow velocity waveforms during provoked uterine contractions in high-risk pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2004;24(4):429–34.
7. Stuart B, Drumm J, Fitzgerald D, et al. Fetal blood velocity waveforms in uncomplicated labour. *BJOG* 1981;88(9):865–9.
8. Mir IN, Johnson-Welch SF, Nelson DB, et al. Placental pathology is associated with severity of neonatal encephalopathy and adverse developmental outcomes following hypothermia. *Am J Obstet Gynecol* 2015;213(6):849.e1-7.
9. Rudolph AM, Heymann MA. The circulation of the fetus in utero methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood flow. *Circ Res* 1967;21(2):163–84.
10. Rudolph A, Yuan S. Response of the pulmonary vasculature to hypoxia and H1 ion concentration changes. *J Clin Invest* 1966;45(3):399.
11. Koehler RC, Jones M, Traystman RJ. Cerebral circulatory response to carbon monoxide and hypoxic hypoxia in the lamb. *Am J Physiol* 1982;243(1):H27–32.
12. Ashwal S, Dale PS, Longo LD. Regional cerebral blood flow: studies in the fetal lamb during hypoxia, hypercapnia, addosis, and hypotension. *Pediatr Res* 1984;18(12):1309–16.
13. Phelan JP, Alen MO, Korst L, et al. Intrapartum fetal asphyxial brain injury with absent multiorgan system dysfunction. *J Matern Fetal Med* 1998;7(1):19–22.
14. Cremer JE. Substrate utilization and brain development. *J Cereb Blood Flow Metab* 1982;2(4):394–407.
15. Vannucci RC, Yager JY. Glucose, lactic acid, and perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatr Neurol* 1992;8(1):3–12.

16. Yager JY, Heitjan DF, Towfighi J, et al. Effect of insulin-induced and fasting hypoglycemia on perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatr Res* 1992;31(2): 138–42.
17. Oski FA. The unique fetal red cell and its function. E. Mead Johnson Award address. *Pediatrics* 1973;51(3):494–500.
18. Cowett RM. Principles of perinatal-neonatal metabolism. New York: Springer Science & Business Media; 2012.
19. Goldaber K, Gilstrap L III, Leveno K, et al. Pathologic fetal acidemia. *Obstet Gynecol* 1991;78(6):1103–7.
20. Sehdev HM, Stamilio DM, Macones GA, et al. Predictive factors for neonatal morbidity in neonates with an umbilical arterial cord pH less than 7.00. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177(5):1030–4.
21. King TA, Jackson GL, Josey AS, et al. The effect of profound umbilical artery acidemia in term neonates admitted to a newborn nursery. *J Pediatr* 1998; 132(4):624–9.
22. Calvert JW, Zhang JH. Pathophysiology of an hypoxic–ischemic insult during the perinatal period. *Neurol Res* 2005;27(3):246–60.
23. Vannucci RC, Towfighi J, Vannucci SJ. Secondary energy failure after cerebral hypoxia-ischemia in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24(10): 1090–7.
24. Sie LT, van der Knaap MS, Oosting J, et al. MR patterns of hypoxic-ischemic brain damage after prenatal, perinatal or postnatal asphyxia. *Neuropediatrics* 2000; 31(3):128–36.
25. Sie LT, van der Knaap MS, Oosting J, et al. MR patterns of hypoxic-ischemic brain damage after prenatal, perinatal or postnatal asphyxia. *Neuropediatrics* 2000; 31(3):128–36.
26. Laptook AR. Birth Asphyxia and Hypoxic-Ischemic Brain Injury in the Preterm Infant. *Clin Perinatol*. 2016 Sep;43(3):529-45. doi: 10.1016/j.clp.2016.04.010. Epub 2016 Jun 10. PMID: 27524452.
27. The Apgar Score. *Pediatrics*. 2015 Oct;136(4):819-22. doi: 10.1542/peds.2015-2651. PMID: 26416932.
28. Sarnat HB, Flores-Sarnat L, Fajardo C, Leijser LM, Wusthoff C, Mohammad K. Sarnat Grading Scale for Neonatal Encephalopathy after 45 Years: An Update Proposal. *Pediatr Neurol*. 2020 Dec;113:75-79. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2020.08.014. Epub 2020 Aug 27. PMID: 33069006.
29. Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol*. 1976;33:696e705.
30. Thompson CM, Puterman AS, Linley LL, Hann FM, van der Elst CW, Moltano CD, Malan AF. The value of a scoring system for hypoxic ischaemic encephalopathy in predicting neurodevelopmental outcome. *Acta Paediatr*. 1997 Jul;86(7):757-61. doi: 10.1111/j.1651-2227.1997.tb08581.x. PMID: 9240886.
31. Tao JD, Mathur AM. Using amplitude-integrated EEG in neonatal intensive care. *J Perinatol*. 2010 Oct;30 Suppl:S73-81. doi: 10.1038/jp.2010.93. PMID: 20877412.

32. Lavery S, Shah DK, Hunt RW, Filan PM, Doyle LW, Inder TE. Single versus bihemispheric amplitude-integrated electroencephalography in relation to cerebral injury and outcome in the term encephalopathic infant. *J Paediatr Child Health* 2008; 44: 285–290.
33. van Rooij LG, de Vries LS, van Huffelen AC, Toet MC. Additional value of 2-channel amplitude integrated EEG recording in full-term infants with unilateral brain injury. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2010; 95(3): F160–F168.
34. Hellstrom-Westas L RI, de Vries LS, Greisen G. Amplitude-integrated EEG classification and interpretation in preterm and term infants. *Neoreviews* 2006; 7: e76–e87.
35. de Vries LS, Hellström-Westas L. Role of cerebral function monitoring in the newborn. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005 90: F201-F207 [PMID: 15846008 DOI: 10.1136/adc.2004.062745]
36. Osredkar D, Toet MC, van Rooij LG, van Huffelen AC, Groenendaal F, de Vries LS. Sleep-wake cycling on amplitudeintegrated electroencephalography in term newborns with hypoxicischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2005; 115: 327-332 [PMID: 15687440 DOI: 10.1542/peds.2004-0863]
37. Murray DM, Boylan GB, Ryan CA, Connolly S. Early EEG findings in hypoxic-ischemic encephalopathy predict outcomes at 2 years. *Pediatrics* 2009; 124: e459-e467 [PMID: 19706569 DOI:10.1542/peds.2008-2190]
38. Murray DM, Boylan GB, Ali I, Ryan CA, Murphy BP, Connolly S. Defining the gap between electrographic seizure burden, clinical expression and staff recognition of neonatal seizures. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008; 93: F187-F191 [PMID: 17626147 DOI: 10.1136/adc.2005.086314]
39. Natarajan G, Shankaran S, Laptook AR, Pappas A, Bann CM, McDonald SA, Das A, Higgins RD, Hintz SR, Vohr BR. Apgar scores at 10 min and outcomes at 6-7 years following hypoxicischaemic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2013; 98: F473-F479 [PMID: 23896791 DOI: 10.1136/archdischild-2013-303692]
40. Lee AC, Kozuki N, Blencowe H, Vos T, Bahalim A, Darmstadt GL, Niermeyer S, Ellis M, Robertson NJ, Cousens S, Lawn JE. Intrapartum-related neonatal encephalopathy incidence and impairment at regional and global levels for 2010 with trends from 1990. *Pediatr Res* 2013; 74 Suppl 1: 50-72 [PMID: 24366463 DOI: 10.1038/pr.2013.206]
41. Azzopardi D, Strohm B, Marlow N, Brocklehurst P, Deierl A, Eddama O, Goodwin J, Halliday HL, Juszczak E, Kapellou O, Levene M, Linsell L, Omar O, Thoresen M, Tusor N, Whitelaw A, Edwards AD. Effects of hypothermia for perinatal asphyxia on childhood outcomes. *N Engl J Med* 2014; 371: 140-149 [PMID: 25006720 DOI: 10.1097/01.ogx.0000458787.40317.4a]
42. Glass HC, Glidden D, Jeremy RJ, Barkovich AJ, Ferriero DM, Miller SP. Clinical Neonatal Seizures are Independently Associated with Outcome in Infants at Risk for Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *J Pediatr* 2009; 155: 318-323 [PMID: 19540512 DOI:10.1016/j.jpeds.2009.03.040]

43. Rennie JM, Hagmann CF, Robertson NJ. Outcome after intrapartum hypoxic ischaemia at term. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007; 12: 398-407 [PMID: 17825633 DOI: 10.1016/j.siny.2007.07.006]
44. 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: 225-238 [PMID: 8557479 DOI: 10.1016/0165-5876(95)01213-3]
45. Mercuri E, Anker S, Guzzetta A, Barnett AL, Haataja L, Rutherford M, Cowan F, Dubowitz L, Braddick O, Atkinson J. Visual function at school age in children with neonatal encephalopathy and low Apgar scores. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004; 89: F258-F262 [PMID: 15102732 DOI: 10.1136/adc.2002.025387]
46. Gadian DG, Aicardi J, Watkins KE, Porter DA, Mishkin M, Vargha-Khadem F. Developmental amnesia associated with early hypoxic-ischaemic injury. *Brain* 2000; 123 Pt 3: 499-507 [PMID: 10686173 DOI: 10.1093/brain/123.3.499]
47. 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 [PMID: 2976068]
48. Marlow N, Rose AS, Rands CE, Draper ES. Neuropsychological and educational problems at school age associated with neonatal encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005; 90: F380-F387 [PMID: 16113154 DOI: 10.1136/adc.2004.067520]
49. Graham EM, Ruis KA, Hartman AL, Northington FJ, Fox HE. A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:587–95. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.06.094>.
50. Marcdante, Karen J.; Kliegman, Robert M.; Nelson, Richard W.; Cassio, Alessandra; Perilongo, Giorgio; Plebani, Alessandro; Schiavetti, Amalia. *Nelson Manuale di Pediatria - 8 ed. (Italian Edition)* (p.145). Edra.
51. 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;99:248e56.
52. Lorek A, Takei Y, Cady EB, et al. Delayed (“secondary”) cerebral energy failure after acute hypoxiaemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res* 1994;36:699e706.
53. Bennet L, Roelfsema V, Pathipati P, Quaedackers J, Gunn AJ. Relationship between evolving epileptiform activity and delayed loss of mitochondrial activity after asphyxia measured by near-infrared spectroscopy in preterm fetal sheep. *J Physiol* 2006;572:141e54.
54. Celcus, AC. *On Medicine, Books 1-4. Vol. 1-100 AD.* Harvard University Press, Loeb Classical Library; p. 1-512.
55. Bernard, C. *Leçons sur la Chaleur Animale.* J. B. Baillière; Paris: 1876. p. 1-471.
56. Miller JA Jr. Effects of variations in body temperature upon resistance to asphyxia in the neonatal guinea pig. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1954; 19:152–4. [PubMed: 13291198]

57. Gunn, A. J., Laptook, A. R., Robertson, N. J., Barks, J. D., Thoresen, M., Wassink, G., & Bennet, L. (2017). Therapeutic hypothermia translates from ancient history in to practice. *Pediatric research*, 81(1-2), 202–209. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.198>
58. Laptook AR, Corbett RJ, Sterett R, Burns DK, Garcia D, Tollefsbol G. Modest hypothermia provides partial neuroprotection when used for immediate resuscitation after brain ischemia. *Pediatr Res*. 1997; 42:17–23. [PubMed: 9212032]
59. Laptook AR, Corbett RJ, Burns DK, Sterett R. A limited interval of delayed modest hypothermia for ischemic brain resuscitation is not beneficial in neonatal swine. *Pediatr Res*. 1999; 46:383–9. [PubMed: 10509357]
60. Thoresen M, Penrice J, Lorek A, et al. Mild hypothermia after severe transient hypoxia-ischemia ameliorates delayed cerebral energy failure in the newborn piglet. *Pediatr Res*. 1995; 37:667–70. [PubMed: 7603788]
61. Sirimanne ES, Blumberg RM, Bossano D, et al. The effect of prolonged modification of cerebral temperature on outcome after hypoxic-ischemic brain injury in the infant rat. *Pediatr Res*. 1996; 39:591–7. [PubMed: 8848330]
62. Colbourne F, Corbett D. Delayed postischemic hypothermia: a six month survival study using behavioral and histological assessments of neuroprotection. *J Neurosci*. 1995; 15:7250–60. [PubMed: 7472479]
63. Colbourne F, Corbett D, Zhao Z, Yang J, Buchan AM. Prolonged but delayed postischemic hypothermia: a long-term outcome study in the rat middle cerebral artery occlusion model. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000; 20:1702–8. [PubMed: 11129786]
64. Alonso-Alconada D, Broad KD, Bainbridge A, et al. Brain cell death is reduced with cooling by 3.5 degrees C to 5 degrees C but increased with cooling by 8.5 degrees C in a piglet asphyxia model. *Stroke*. 2015; 46:275–8. [PubMed: 25424475]
65. Kerenyi A, Kelen D, Faulkner SD, et al. Systemic effects of whole-body cooling to 35 degrees C, 33.5 degrees C, and 30 degrees C in a piglet model of perinatal asphyxia: implications for therapeutic hypothermia. *Pediatr Res*. 2012; 71:573–82. [PubMed: 22314664]
66. Laptook AR, Shalak L, Corbett RJ. Differences in brain temperature and cerebral blood flow during selective head versus whole-body cooling. *Pediatrics*. 2001; 108:1103–10. [PubMed: 11694688]
67. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi S, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* 2005; 365:4995.
68. Azzopardi, D., Brocklehurst, P., Edwards, D., Halliday, H., Levene, M., Thoresen, M., Whitelaw, A., & TOBY Study Group (2008). The TOBY Study. Whole body hypothermia for the treatment of perinatal asphyxial encephalopathy: a randomised controlled trial. *BMC pediatrics*, 8, 17. <https://doi.org/10.1186/1471-2431-8-17>
69. Wassink G, Gunn ER, Drury PP, Bennet L, Gunn AJ. The mechanisms and treatment of asphyxial encephalopathy. *Front Neurosci*. 2014; 8:40. [PubMed: 24578682]

70. Nakashima K, Todd MM, Warner DS. The relation between cerebral metabolic rate and ischemic depolarization. A comparison of the effects of hypothermia, pentobarbital, and isoflurane. *Anesthesiology*. 1995; 82:1199–208. [PubMed: 7741295]
71. Haynes RL, Baud O, Li J, Kinney HC, Volpe JJ, Folkerth DR. Oxidative and nitrative injury in periventricular leukomalacia: a review. *Brain Pathol* 2005;15:225e33.
72. Kubota M, Nakane M, Narita K, et al. Mild hypothermia reduces the rate of metabolism of arachidonic acid following postischemic reperfusion. *Brain Res* 1998;779:297e300.
73. Lei B, Adachi N, Arai T. The effect of hypothermia on H₂O₂ production during ischemia and reperfusion: a microdialysis study in the gerbil hippocampus. *NeurosciLett* 1997;222:91e4.
74. Tan WK, Williams CE, During MJ, et al. Accumulation of cytotoxins during the development of seizures and edema after hypoxicischemic injury in late gestation fetal sheep. *Pediatr Res* 1996;39:791e7.
75. Thoresen M, Satas S, Puka-Sundvall M, et al. Post-hypoxic hypothermia reduces cerebrocortical release of NO and excitotoxins. *Neuroreport* 1997;8:3359e62.
76. Jensen EC, Bennet L, Hunter CJ, Power GG, Gunn AJ. Post-hypoxic hypoperfusion is associated with suppression of cerebral metabolism and increased tissue oxygenation in near-term fetal sheep. *J Physiol* 2006;572:131e9.
77. Gunn AJ, Gunn TR, Gunning MI, Williams CE, Gluckman PD. Neuroprotection with prolonged head cooling started before postischemic seizures in fetal sheep. *Pediatrics* 1998;102:1098e106.
78. Karlsson BR, Groggaard B, Gerdin B, Steen PA. The severity of postischemic hypoperfusion increases with duration of cerebral ischemia in rats. *Acta Anaesthesiol Scand* 1994;38:248e53.
79. Marks KA, Mallard EC, Roberts I, et al. Delayed vasodilation and altered oxygenation after cerebral ischemia in fetal sheep. *Pediatr Res* 1996;39:48e54.
80. Huang CH, Chen HW, Tsai MS, et al. Antiapoptotic cardioprotective effect of hypothermia treatment against oxidative stress injuries. *Acad Emerg Med* 2009;16:872e80.
81. Zeevalk GD, Nicklas WJ. Hypothermia and metabolic stress: narrowing the cellular site of early neuroprotection. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;279:332e9.
82. Roelfsema V, Bennet L, George S, et al. The window of opportunity for cerebral hypothermia and white matter injury after cerebral ischemia in near-term fetal sheep. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004; 24:877–86. [PubMed: 15362718]
83. Mallard C, Davidson JO, Tan S, et al. Astrocytes and microglia in acute cerebral injury underlying cerebral palsy associated with preterm birth. *Pediatr Res*. 2014; 75:234–40. [PubMed: 24336433]
84. Kurisu, Kota & Yenari, Midori. (2017). Therapeutic hypothermia for ischemic stroke; pathophysiology and future promise. *Neuropharmacology*. 134. 10.1016/j.neuropharm.2017.08.025.

85. Lee, J.E., Yoon, Y.J., Moseley, M.E., Yenari, M.A., 2005. Reduction in levels of matrix metalloproteinases and increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in response to mild hypothermia therapy in experimental stroke. *J. Neurosurg.* 103, 289e297.
86. Yenari, M.A., Han, H.S., 2012. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 267e278.
87. Kernie, S.G., Parent, J.M., 2010. Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol. Dis.* 37, 267e274.
88. Xiong, M., Cheng, G.Q., Ma, S.M., Yang, Y., Shao, X.M., Zhou, W.H., 2011. Postischemic hypothermia promotes generation of neural cells and reduces apoptosis by Bcl-2 in the striatum of neonatal rat brain. *Neurochem. Int.* 58, 625e633.
89. Lasarzik, I., Winkelheide, U., Thal, S.C., Benz, N., Lorscher, M., Jahn-Eimermacher, A., Werner, C., Engelhard, K., 2009. Mild hypothermia has no long-term impact on postischemic neurogenesis in rats. *Anesth. Analg.* 109, 1632e1639.
90. Li, L., Harms, K.M., Ventura, P.B., Lagace, D.C., Eisch, A.J., Cunningham, L.A., 2010. Focal cerebral ischemia induces a multilineage cytogenic response from adult subventricular zone that is predominantly gliogenic. *Glia* 58, 1610e1619.
91. Gao, Z., Zhu, Q., Zhang, Y., Zhao, Y., Cai, L., Shields, C.B., Cai, J., 2013. Reciprocal modulation between microglia and astrocyte in reactive gliosis following the CNS injury. *Mol. Neurobiol.* 48, 690e701.
92. Trendelenburg, G., Dirnagl, U., 2005. Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. *Glia* 50, 307e320.
93. Kurisu, K., Abumiya, T., Ito, M., Gekka, M., Osanai, T., Shichinohe, H., Nakayama, N., Kazumata, K., Houkin, K., 2016a. Transarterial regional hypothermia provides robust neuroprotection in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion with transient collateral hypoperfusion. *Brain Res.* 1651, 95e103.
94. Kuo, J.R., Lo, C.J., Chang, C.P., Lin, H.J., Lin, M.T., Chio, C.C., 2010. Brain cooling-stimulated angiogenesis and neurogenesis attenuated traumatic brain injury in rats. *J. Trauma* 69, 1467e1472.
95. Xie, Y.C., Li, C.Y., Li, T., Nie, D.Y., Ye, F., 2007. Effect of mild hypothermia on angiogenesis in rats with focal cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* 422, 87e90.
96. Manoonkitiwongsa, P.S., Schultz, R.L., McCreery, D.B., Whitter, E.F., Lyden, P.D., 2004. Neuroprotection of ischemic brain by vascular endothelial growth factor is critically dependent on proper dosage and may be compromised by angiogenesis. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 24, 693e702.
97. Shankaran, S., Laptook, A. R., Ehrenkranz, R. A., Tyson, J. E., McDonald, S. A., Donovan, E. F., Fanaroff, A. A., Poole, W. K., Wright, L. L., Higgins, R. D., Finer, N. N., Carlo, W. A., Duara, S., Oh, W., Cotten, C. M., Stevenson, D. K., Stoll, B. J., Lemons, J. A., Guillet, R., Jobe, A. H., ... National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network (2005). Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic

- encephalopathy. *The New England journal of medicine*, 353(15), 1574–1584. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp050929>
98. Shankaran S, Laptook AR, Pappas A, McDonald SA, Das A, Tyson JE, et al. Effect of depth and duration of cooling on deaths in the NICU among neonates with hypoxic ischemic encephalopathy: a randomized clinical trial. *JAMA* 2014;312:2629e39.
 99. Perlman M, Wyllie J, Kattwinkel J, Atkins DL, Chameides L, Goldsmith JP, et al. Part 11: Neonatal resuscitation: 2010 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science with Treatment Recommendations. *Circulation* 2010;122:S516e38.
 100. Silveira, R. C., & Procianoy, R. S. (2015). Hypothermia therapy for newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. *Jornal de pediatria*, 91(6 Suppl 1), S78–S83. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2015.07.004>.
 101. Jacobs SE, Berg M, Hunt R, Tarnow-Mordi WO, Inder TE, Davis PG. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;1:CD003311.
 102. Thoresen M. (2015). Who should we cool after perinatal asphyxia?. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 20(2), 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2015.01.002>
 103. Thoresen M, Tooley J, Liu X, Jary S, Fleming P, Luyt K, et al. Time is brain: starting therapeutic hypothermia within three hours after birth improves motor outcome in asphyxiated newborns. *Neonatology* 2013;104:228e33.
 104. Gunn AJ, Gluckman PD, Gunn TR. Selective head cooling in newborn infants after perinatal asphyxia: a safety study. *Pediatrics* 1998;102:885e92.
 105. Rao, R., Trivedi, S., Vesoulis, Z., Liao, S. M., Smyser, C. D., & Mathur, A. M. (2017). Safety and Short-Term Outcomes of Therapeutic Hypothermia in Preterm Neonates 34-35 Weeks Gestational Age with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *The Journal of pediatrics*, 183, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.11.019>
 106. Wyatt JS, Gluckman PD, Liu PY, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, et al. Determinants of outcomes after head cooling for neonatal encephalopathy. *Pediatrics* 2007;119:912e21.
 107. Laptook A. R. (2010). The neo.nEURO.network Hypothermia Randomized Controlled Trial. *Pediatrics*, 126(4), e965–e966. <https://doi.org/10.1542/peds.2010-2075>
 108. Zhou, W. H., Cheng, G. Q., Shao, X. M., Liu, X. Z., Shan, R. B., Zhuang, D. Y., Zhou, C. L., Du, L. Z., Cao, Y., Yang, Q., Wang, L. S., & China Study Group (2010). Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a multicenter randomized controlled trial in China. *The Journal of pediatrics*, 157(3), 367–372.e3723. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2010.03.030>
 109. Jacobs, S. E., Morley, C. J., Inder, T. E., Stewart, M. J., Smith, K. R., McNamara, P. J., Wright, I. M., Kirpalani, H. M., Darlow, B. A., Doyle, L. W., & Infant Cooling Evaluation Collaboration (2011). Whole-body hypothermia for term and near-term newborns with

- hypoxic-ischemic encephalopathy: a randomized controlled trial. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 165(8), 692–700. <https://doi.org/10.1001/archpediatrics.2011.43>
110. Jacobs, S., Hunt, R., Tarnow-Mordi, W., Inder, T., & Davis, P. (2007). Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *The Cochrane database of systematic reviews*, (4), CD003311. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003311.pub2>
111. Rutherford M, Ramenghi LA, Edwards AD, et al. Assessment of brain tissue injury after moderate hypothermia in neonates with hypoxic-ischaemic encephalopathy: a nested substudy of a randomised controlled trial. *Lancet Neurol*. 2010; 9(1):39-45.
112. Hill A, Volpe JJ. Perinatal asphyxia: Clinical aspects. *Clin Perinatol* 1989;16:435–57. [https://doi.org/10.1016/s0095-5108\(18\)30640-7](https://doi.org/10.1016/s0095-5108(18)30640-7).
113. Ancora G, Pomero G, Ferrari F. Raccomandazioni per l'assistenza al neonato con encefalopatia ipossico ischemica possibile candidato al trattamento ipotermico 2012.
114. Nair J, Kumar V. Current and Emerging Therapies in the Management of Hypoxic Ischemic Encephalopathy in Neonates. *Children* 2018;5:99. <https://doi.org/10.3390/children5070099>.
115. Barkovich, A. J., Hajnal, B. L., Vigneron, D., Sola, A., Partridge, J. C., Allen, F., & Ferriero, D. M. (1998). Prediction of neuromotor outcome in perinatal asphyxia: evaluation of MR scoring systems. *AJNR. American journal of neuroradiology*, 19(1), 143–149.
116. Rutherford MA, Azzopardi D, Whitelaw A, et al. Mild hypothermia and the distribution of cerebral lesions in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics*. 2005;116(4):1001-1006.
117. Inder TE, Hunt RW, Morley CJ, et al. Randomized trial of systemic hypothermia selectively protects the cortex on MRI in term hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr*. 2004;145(6):835-837
118. Cheong, J. L., Coleman, L., Hunt, R. W., Lee, K. J., Doyle, L. W., Inder, T. E., Jacobs, S. E., & Infant Cooling Evaluation Collaboration (2012). Prognostic utility of magnetic resonance imaging in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: substudy of a randomized trial. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 166(7), 634–640. <https://doi.org/10.1001/archpediatrics.2012.284>
119. Clish CB. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. 2015;1(1):a000588. doi:10.1101/mcs.a000588
120. Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Soc Rev*. 2011;40:387–426
121. Menni, C., Zierer, J., Valdes, A. et al. Mixing omics: combining genetics and metabolomics to study rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 13, 174–181 (2017). <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.5>

122. Sánchez-Illana Á, Piñeiro-Ramos JD, Kuligowski J. Small molecule biomarkers for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2020 Apr;25(2):101084. doi: 10.1016/j.siny.2020.101084. Epub 2020 Jan 16. PMID: 31983670.
123. Bardanzellu, F., Fanos, V. How could metabolomics change pediatric health?. *Ital J Pediatr* 46, 37 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13052-020-0807-7>
124. Fanos V, Noto A, Caboni P, Pintus MC, Liori B, Dessì A, Mussap M. Urine metabolomic profiling in neonatal nephrology. *Clin Biochem.* 2014;47: 708–10.
125. Longini M, Giglio S, Perrone S, Vivi A, Tassini M, Fanos V, Sarafidis K, Buonocore G. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine samples in preterm asphyctic newborn: a metabolomic approach. *Clin Chim Acta.* 2015;444:250–6.
126. Noto A, Pomero G, Mussap M, Barberini L, Fattuoni C, Palmas F, Dalmazzo C, Delogu A, Dessì A, Fanos V, Gancia P. Urinary gas chromatography mass spectrometry metabolomics in asphyxiated newborns undergoing hypothermia: from the birth to the first month of life. *Ann Transl Med.* 2016; 4:417.
127. Locci E, Noto A, Puddu M, Pomero G, Demontis R, Dalmazzo C, Delogu A, Fanos V, d'Aloja E, Gancia P. A longitudinal 1H-NMR metabolomics analysis of urine from newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy undergoing hypothermia therapy. Clinical and medical legal insights. *PLoS ONE.* 2018;13: e0194267.
128. Debuf MJ, Carkeek K, Piersigilli F. A Metabolomic Approach in Search of Neurobiomarkers of Perinatal Asphyxia: A Review of the Current Literature. *Front Pediatr.* 2021 Jun 25;9:674585. doi: 10.3389/fped.2021.674585. PMID: 34249811; PMCID: PMC8267248.
129. Piñeiro-Ramos JD, Cascant MM, Núñez-Ramiro A, López-González Á, SolazGarcía Á, Albiach-Delgado A, et al. Noninvasive monitoring of evolving urinary metabolic patterns in neonatal encephalopathy. *Pediatr Res* 2021:1–8. <https://doi.org/10.1038/s41390-021-01553-z>.
130. Piñeiro-Ramos, J. D. et al. Metabolic phenotypes of hypoxic-ischemic encephalopathy with normal vs. pathologic magnetic resonance imaging outcomes. *Metabolites* 10, 109 (2020).
131. Severyanova LA, Lazarenko VA, Plotnikov DV, Dolgintsev ME, Kriukov L-Lysine as the Molecule Influencing Selective Brain Activity in Pain-Induced Behavior of Rats. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 17;20(8):1899. doi: 10.3390/ijms20081899. PMID: 30999611; PMCID: n.d
132. Kondoh T, Kameishi M, Mallick HN, Ono T, Torii K. Lysine and arginine reduce the effects of cerebral ischemic insults and inhibit glutamate-induced neuronal activity in rats. *Front Integr Neurosci* 2010;4:1–10. <https://doi.org/10.3389/fnint.2010.00018>.
133. Cheng J, Tang JC, Pan MX, Chen SF, Zhao D, Zhang Y, et al. L-lysine confers neuroprotection by suppressing inflammatory response via microRNA575/PTEN signaling after mouse intracerebral hemorrhage injury. *Exp Neurol* 2020;327:113214. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113214>.

134. Dhayat, N. A., Frey, A. C., Frey, B. M., d'Uscio, C. H., Vogt, B., Rousson, V., Dick, B., & Flück, C. E. (2015). Estimation of reference curves for the urinary steroid metabolome in the first year of life in healthy children: Tracing the complexity of human postnatal steroidogenesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *154*, 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.07.024>
135. S. Mesiano, R.B. Jaffe, Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex, *Endocr. Rev.* 18 (1997) 378–403.
136. B. Stoffel-Wagner, Neurosteroid metabolism in the human brain, *Eur. J. Endocrinol./Eur. Fed. Endocr. Soc.* 145 (2001) 669–679.
137. C.H. Shackleton, J.W. Honour, N.F. Taylor, Metabolism of fetal and neonatal adrenal steroids, *J. Steroid Biochem.* 11 (1979) 523–529.
138. S. Mesiano, R.B. Jaffe, Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex, *Endocr. Rev.* 18 (1997) 378–403.
139. Ishimoto H, Jaffe RB. Development and function of the human fetal adrenal cortex: a key component in the feto-placental unit. *Endocr Rev.* 2011;32(3):317-355. doi:10.1210/er.2010-0001
140. Dhayat, N. A., Frey, A. C., Frey, B. M., d'Uscio, C. H., Vogt, B., Rousson, V., Dick, B., & Flück, C. E. (2015). Estimation of reference curves for the urinary steroid metabolome in the first year of life in healthy children: Tracing the complexity of human postnatal steroidogenesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *154*, 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.07.024>
141. Purdy RH, Morrow AL, Blinn JR, Paul SM. Synthesis, metabolism, and pharmacological activity of 3-alpha-hydroxysteroids which potentiate GABA receptor mediated chloride ion uptake in rat cerebral cortical synaptosomes. *J Med Chem* (1990) 33:1572–81. doi:10.1021/jm00168a008
142. Reddy DS. Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Prog Brain Res* (2010) 186(113–137):2010. doi:10.1016/B978-0-444-53630-3.00008
143. Hirst JJ, Kelleher MA, Walker DW, Palliser HK. Neuroactive steroids in pregnancy: key regulatory and protective roles in the foetal brain. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014 Jan;139:144-53. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.04.002. Epub 2013 May 10. PMID: 23669456.
144. J.J. Hirst, H.K. Palliser, D.M. Yates, T. Yawno, D.W. Walker, Neurosteroids in the fetus and neonate: potential protective role in compromised pregnancies, *Neurochemistry International* 52 (4–5) (2008) 602–610.
145. M.A. Kelleher, H.K. Palliser, D.W. Walker, J.J. Hirst, Sex-dependent effect of a low neurosteroid environment and intrauterine growth restriction on foetal guinea pig brain development, *Journal of Endocrinology* 208 (3) (2011) 301–309.
146. S. Petratos, J.J. Hirst, S. Mendis, P. Anikijenko, D.W. Walker, Localization of P450scc and 5alpha-reductase type-2 in the cerebellum of fetal and newborn sheep, *Brain Research. Developmental Brain Research* 123 (1) (2000) 81–86.

147. T. Yawno, E.B. Yan, D.W. Walker, J.J. Hirst, Inhibition of neurosteroid synthesis increases asphyxia-induced brain injury in the late gestation fetal sheep, *Neuroscience* 146 (4) (2007) 1726–1733, Jun 8.
148. P.N. Nguyen, E.B. Yan, M. Castillo-Melendez, D.W. Walker, J.J. Hirst, Increased allopregnanolone levels in the fetal sheep brain following umbilical cord occlusion, *Journal of Physiology* 560 (Pt 2) (2004) 593–602.
149. Thomas, P., & Pang, Y. (2020). Anti-apoptotic Actions of Allopregnanolone and Ganaxolone Mediated Through Membrane Progesterone Receptors (PAQRs) in Neuronal Cells. *Frontiers in endocrinology*, 11, 417. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00417>.
150. Thomas P, Pang Y. Membrane progesterone receptors (mPRs): evidence for neuroprotective neurosteroid signaling and neuroendocrine functions in neuronal cells. *Neuroendocrinology*. (2012) 96:162–71. doi: 10.1159/000339822.
151. Pang Y, Dong J, Thomas P. Characterization, neurosteroid binding and brain distribution of human membrane progesterone receptors δ and ϵ (mPR δ and mPR ϵ) and mPR δ involvement in neurosteroid inhibition of apoptosis. *Endocrinology*. (2013) 154:283–95. doi: 10.1210/en.2012-1772.
152. Yawno, T., Miller, S. L., Bennet, L., Wong, F., Hirst, J. J., Fahey, M., & Walker, D. W. (2017). Ganaxolone: A New Treatment for Neonatal Seizures. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11, 246. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00246>
153. Gunn, A. J., and Bennet, L. (2009). Fetal hypoxia insults and patterns of brain injury: insights from animal models. *Clin. Perinatol.* 36, 579–593. doi: 10.1016/j.clp.2009.06.007
154. Gallo M, Aragno M, Gatto V, Tamagno E, Brignardello E, Manti R, Danni O, Boccuzzi G. Protective effect of dehydroepiandrosterone against lipid peroxidation in a human liver cell line. *Eur J Endocrinol* 1999; 141: 35-39.
155. Aragno M, Brignardello E, Tamagno E, Gatto V, Danni O, Boccuzzi G. Dehydroepiandrosterone administration prevents the oxidative damage induced by acute hyperglycemia in rats. *J Endocrinol* 1997; 155: 233-240.
156. Pelissier MA, Trap C, Malewiak MI, Morfin R. Antioxidant effects of dehydroepiandrosterone and 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat colon, intestine and liver. *Steroids* 2004; 69: 137-144.
157. Kalimi M, Shafagoj Y, Loria R, Padgett D, Regelson W. Anti-glucocorticoid effects of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Mol Cell Biochem* 1994; 131: 99- 104.
158. Chmielewski V, Drüpt F, Morfin R. Dexamethasone-induced apoptosis of mouse thymocytes: prevention by native 7 α -hydroxysteroids. *Immunol Cell Biol* 2000; 78: 238-246.
159. Morfin R. Involvement of steroids and cytochromes P(450) species in the triggering of immune defenses. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 80: 273- 290.
160. Loria RM, Padgett DA, Huynh PN. Regulation of the immune response by dehydroepiandrosterone and its metabolites. *J Endocrinol* 1996; 150: S209- S220.

161. Ben-Nathan D, Lachmi B, Lustig S, Feuerstein G. Protection of dehydroepiandrosterone (DHEA) in mice infected with viral encephalitis. *Arch Virol* 1991; 120: 263-271.
162. Morfin R, Courchay G. Pregnenolone and dehydroepiandrosterone as precursors of active 7-hydroxylated metabolites which increase the immune response in mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994; 50: 91-100.
163. Maingat FG, Maria JP, Amber MP, Pornpun V, Farshid N, Samir A, et al. Neurosteroid-mediated regulation of brain innate immunity in HIV/AIDS: DHEA-S suppresses neurovirulence. *FASEB J* (2013) 27:725–37.
164. Jones LL, McDonald DA, Borum PR. Acylcarnitines: role in brain. *Prog Lipid Res.* 2010; 49:61–75. [PubMed: 19720082]
165. Szabo K, Nagy Z, Juhasz V, Zolnerciks JK, Csorba A, Timar Z, Molnar E, Padar P, Johnson W, Beery E, Krajcsi P. Species specificity profiling of rat and human organic cation/carnitine transporter Slc22a5/SLC22A5 (Octn2/OCTN2). *Drug Metab Pharmacokinet.* 2016
166. Ferreira GC, McKenna MC. L-Carnitine and Acetyl-L-carnitine Roles and Neuroprotection in Developing Brain. *Neurochem Res.* 2017 Jun;42(6):1661-1675. doi: 10.1007/s11064-017-2288-7. Epub 2017 May 16. PMID: 28508995; PMCID: PMC5621476.
167. Wainwright MS, Mannix MK, Brown J, Stumpf DA. L-carnitine reduces brain injury after hypoxia-ischemia in newborn rats. *Pediatr Res.* 2003; 54:688–95. [PubMed: 12904603]
168. Xu S, Waddell J, Zhu W, Shi D, Marshall AD, McKenna MC, Gullapalli RP. In vivo longitudinal proton magnetic resonance spectroscopy on neonatal hypoxic-ischemic rat brain injury: Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine. *Magn Reson Med.* 2015; 74:1530–1542. [PubMed: 25461739]
169. Tang S, Xu S, Lu X, Gullapalli RP, McKenna MC, Waddell J. Neuroprotective Effects of Acetyl-L-Carnitine on Neonatal Hypoxia Ischemia-Induced Brain Injury in Rats. *Dev Neurosci.* 2016; 38:384–396. [PubMed: 28226317]
170. Takenouchi, T., Sugiura, Y., Morikawa, T., Nakanishi, T., Nagahata, Y., Sugioka, T., Honda, K., Kubo, A., Hishiki, T., Matsuura, T., Hoshino, T., Takahashi, T., Suematsu, M., & Kajimura, M. (2015). Therapeutic hypothermia achieves neuroprotection via a decrease in acetylcholine with a concurrent increase in carnitine in the neonatal hypoxia-ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(5), 794–805. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.253>
171. Denihan, N. M., Kirwan, J. A., Walsh, B. H., Dunn, W. B., Broadhurst, D. I., Boylan, G. B., & Murray, D. M. (2019). Untargeted metabolomic analysis and pathway discovery in perinatal asphyxia and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 39(1), 147–162. <https://doi.org/10.1177/0271678X17726502>

172. Reinebrant HE, Wixey JA, Gobe GC, et al. Differential effects of neonatal hypoxic-ischemic brain injury on brainstem serotonergic raphe nuclei. *Brain Res* 2010; 1322: 124–133.
173. Buller KM, Wixey JA and Reinebrant HE. Disruption of the serotonergic system after neonatal hypoxia-ischemia in a rodent model. *Neurol Res Int* 2012; 2012: 650382.
174. Reiter R, Tang L, Garcia JJ, et al. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 1997; 60: 2255–2271.
175. Stone T. W. (2020). Does kynurenic acid act on nicotinic receptors? An assessment of the evidence. *Journal of neurochemistry*, 152(6), 627–649. <https://doi.org/10.1111/jnc.14907>
176. Denihan NM, Kirwan JA, Walsh BH, Dunn WB, Broadhurst DI, Boylan GB, Murray DM. Untargeted metabolomic analysis and pathway discovery in perinatal asphyxia and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2019 Jan;39(1):147-162. doi: 10.1177/0271678X17726502. Epub 2017 Aug 25. PMID: 28840775; PMCID: PMC6311668.
177. Schönfeld P, Reiser G. How the brain fights fatty acids' toxicity. *Neurochem Int.* 2021 Sep;148:105050. doi: 10.1016/j.neuint.2021.105050. Epub 2021 May 1. PMID: 33945834.
178. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 57 (1995) 289–300.
179. Jolliffe IT. *Principal component analysis*. In Springer Series in Statistics, 2nd ed.; Springer: New York, NY, USA, 2002.
180. Stocchero M, Locci E, d'Aloja E, Nioi M, Baraldi E, Giordano G. PLS2 in Metabolomics. *Metabolites* 9 (2019) 51.
181. Peila C, Sottemano S, Cesare Marincola F, Stocchero M, Pusceddu NG, Dessì A, Baraldi E, Fanos V, Bertino E. NMR metabonomic profile of preterm human milk in the first month of lactation: from extreme to moderate prematurity. *Foods* 11 (2022) 345.
182. Stocchero M, De Nardi M, Scarpa B. PLS for classification. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 216 (2021) 104374.

8. TABELLE

Tabella 1	
Cause di asfissia perinatale	
Materne	Placentari/Cordone ombelicale
Diabete mellito	Distacco di placenta
Iperensione	Emorragia feto-materna
Preeclampsia	Compressione del cordone (prolasso, cordone nucale, nodo)
Ipotensione/shock	Infezioni
Rottura uterina	Infiammazione
Anemia Severa	Inserzione velamentosa del funicolo
Infezione	--

Tabella 2									
Apgar score									
The Apgar Score, Pediatrics, 2015.									
Apgar Score				Gestational age _____ weeks					
Sign	0	1	2	1 minute	5 minute	10 minute	15 minute	20 minute	
Color	Blue or Pale	Acrocyanotic	Completely Pink						
Heart rate	Absent	<100 minute	>100 minute						
Reflex irritability	No Response	Grimace	Cry or Active Withdrawal						
Muscle tone	Limp	Some Flexion	Active Motion						
Respiration	Absent	Weak Cry; Hypoventilation	Good, Crying						
Total									
Comments:				Resuscitation					
				Minutes	1	5	10	15	20
				Oxygen					
				PPV/NCPAP					
				ETT					
				Chest Compressions					
				Epinephrine					

Tabella 3

Sarnat score

Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study. Arch Neurol. 1976;33:696-705.

Clinical Feature	Stage 1	Stage 2	Stage 3
Level of consciousness	Hyperalert	Lethargic or obtunded	Stuporous
Neuromuscular control			
Muscle tone	Normal	Mild hypotonia	Flaccid
Posture	Mild distal flexion	Strong distal flexion	Intermittent decerebration
Stretch reflexes	Overactive	Overactive	Decreased or absent
Segmental myoclonus	Present	Present	Absent
Complex reflexes			
Suck	Weak	Weak or absent	Absent
Moro	Strong; low threshold	Weak; incomplete; high threshold	Absent
Oculovestibular	Normal	Overactive	Weak or absent
Tonic neck	Slight	Strong	Absent
Autonomic function	Generalized sympathetic	Generalized parasympathetic	Both systems depressed
Pupils	Mydriasis	Miosis	Variable; often unequal; poor light reflex
Heart rate	Tachycardia	Bradycardia	Variable
Bronchial and salivary secretions	Sparse	Profuse	Variable
Gastrointestinal motility	Normal or decreased	Increased; diarrhea	Variable
Seizures	None	Common; focal or multifocal	Uncommon (excluding decerebration)
Electroencephalogram findings	Normal (awake)	Early: low-voltage continuous delta and theta. Later: periodic pattern (awake). Seizures: focal 1 to 1 1/2 Hz spike and wave	Early: periodic pattern with isopotential phases. Later: totally isopotential
Duration	Less than 24 hr	Two to 14 days	Hours to weeks

Tabella 4

Thompson score

Thompson CM, Puterman AS, Linley LL, Hann FM, van der Elst CW, Molteno CD, Malan AF. The value of a scoring system for hypoxic ischaemic encephalopathy in predicting neurodevelopmental outcome. Acta Paediatr. 1997 Jul;86(7):757-61. doi: 10.1111/j.1651-2227.1997.tb08581.x. PMID: 9240886.

Sign	Score 0	1	2	3	Day 1	Day 2	Day 3
Tone	Normal	Hyper	Hypo	Flaccid			
LOC	Normal	Hyper alert, stare	Lethargic	Comatose			
Fits	None	Intreq < 3 d ⁻¹	Frequent > 2/day				
Posture	Normal	Fisting, cycling	Strong, distal flexion	Decerebrate			
Moro	Normal	Partial	Absent				
Grasp	Normal	Poor	Absent				
Suck	Normal	Poor	Absent ± bites				
Resp.	Normal	Hypervent	Brief apnoea	IPPV (apnoea)			
Font'l	Normal	Full, not tense	Tense				
Total score per day _____							

Tabella 5

Classificazione delle paralisi cerebrali in base al tipo di disturbo motorio.

Marcadante, Karen J.; Kliegman, Robert M.; Nelson, Richard W.; Cassio, Alessandra; Perilongo, Giorgio; Plebani, Alessandro; Schiavetti, Amalia. Nelson Manuale di Pediatria - 8 ed. (Italian Edition) (p.145). Edra.

Paralisi cerebrale spastica: la più comune forma di paralisi cerebrale, rappresenta il 70-80% dei casi. È determinata da un danno del I motoneurone del tratto piramidale. Può occasionalmente essere bilaterale. È caratterizzata da almeno due tra: anomalo pattern motorio, tono aumentato, riflessi patologici (ad esempio, riflesso di Babinski, iperreflessia).

Paralisi cerebrale discinetica: avviene nel 10-15% dei casi. È caratterizzata da un pattern motorio anomalo e da movimenti involontari, incontrollati, ricorrenti.

Paralisi cerebrale atassica: in meno del 5% dei casi. Questa forma è determinata da un danno cerebellare e si caratterizza per una postura o movimento anomali e dalla perdita della regolare coordinazione muscolare o da entrambi.

Paralisi cerebrale distonica: anche questa non comune. È caratterizzata da scarsa attività e movimenti rigidi (ipocinesia) e ipotonia.

Paralisi cerebrale coreoatetotica: rara ora che l'iperbilirubinemia è aggressivamente prevenuta e trattata. Questa forma si caratterizza per movimenti esagerati e violenti (iperreflessia) e per ipotonia.

Tabella 6

Criteria di inclusione e risultati dei primi sei studi sull'efficacia dell'ipotermia terapeutica in neonati con asfissia perinatale.

Thoresen M. (2015). Who should we cool after perinatal asphyxia?. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 20(2), 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2015.01.002>

68

M. Thoresen / *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 20 (2015) 66–71

Table 1

Entry criteria for the first six trials to select infants with encephalopathy of hypoxic-ischemic origin.

Study criteria	CoolCap (n = 235) (23 sites)	TOBY (n = 325) (43 sites)	NICHD trial (n = 208) (31 sites)	Eicher trial (n = 67) (6 sites)	neo.nNeur (n = 129) (24 sites)	ICE (542 screened) (n = 204) (28 sites)
Gestation (weeks)	≥36	≥36	≥36	≥35	≥36	≥35
Start cooling (hours)	≤5.5	≤6.0	≤6.0	≤6.0 h or after postnatal insult	≤6.0	≤6.0
A criteria						
Metabolic	1 out of 4	1 out of 4	1 out of 4	1 out of 5	1 out of 4	2 out of 4
Apgar at 10 min	≤5	≤5	≤5	≤5	≤5	≤5
pH	<7.00	<7.00	<7.00	<7.00/7.1 (initial infant gas)	<7.00	<7.00
Base excess (mmol/L)	≤-16	≤-16	≤-16	≤-13	≤-16	≤-12
Ventilated or resuscitated at 10 min	Yes	Yes	Yes	Yes at 5 min	Yes	Yes
Other				Heart rate <80 bpm for ≥15 min postnatal HI event with oxygen desaturation <70% or arterial oxygen tension <35 mmHg for 20 min with evidence of ischemia (chest compressions, hypotension, hemorrhage)		
B criteria						
Neurology	Depressed consciousness AND 1 out of 3: Hypotonia; Abnormal reflexes (including oculomotor or pupillary abnormalities); Abnormal suck AND	Depressed consciousness AND 1 out of 3: Hypotonia; Abnormal reflexes (including oculomotor or pupillary abnormalities); Abnormal suck AND	3 out of 6: Depressed consciousness; Tone; Autonomic reflexes; Primitive reflexes; Activity; Posture	2 out of 6: Consciousness; Tone; Autonomic dysfunction; Reflexes; Posture; Seizures	Encephalopathy with lethargy, stupor or coma AND at least 1 out of 4: Hypotonia; Abnormal reflexes (incl oculomotor or pupillary abnormalities); Abnormal suck; Clinical seizures AND	Moderate or severe Sarnat encephalopathy modified by Finer NN, <i>J Pediatr</i> 1981;98:112–117) Defined as two or more of: Alteration of consciousness; Global hypotonia or hypertonia; Abnormal Moro reflex; Grasp and suck reflexes
C criteria						
Seizures or aEEG	Clinical seizures or abnormal aEEG	Clinical seizures or abnormal aEEG	Clinical seizures, no aEEG	Clinical seizures, no aEEG	Clinical seizures or abnormal standard EEG or aEEG	Seizures or aEEG not included in entry criteria
Poor outcome HT	55%	48%	49%	52%	49%	51%
Poor outcome NT	66%	53%	63%	84%	83%	66%
Mortality % HT	33%	26%	24%	31%	38	25%
Mortality % NT	38%	27%	37%	42%	57	38%
% infants included with Grade I encephalopathy or normal aEEG (if aEEG)	3%	None reported	None reported	None reported	None reported	None reported
Outcome assessment methods and age	At 18 months: MDI Bayley II <70 and/or GMFCS 3–5, and or severe visual or hearing loss	At 18 months: MDI Bayley II <70 and/or GMFCS 3–5, and or severe visual or hearing loss	At 18–22 months: Severe disability: MDI Bayley II <70 and/or GMFCS 3–5, and/or severe visual or hearing loss Moderate disability: MDI Bayley II 70–84, and/or GMFCS 2, and or hearing impairment with no amplification or a persistent seizure disorder	At 12 months using the BSIDII, Cognitive Adaptive Test/Clinical Linguistic and Auditory Milestone Scale (CAT/CLAMS) or Vineland examinations. Severely abnormal scores were defined as >2 SD from mean, moderately abnormal as >1 and ≤2 SD, and mildly abnormal to normal as ≤1 SD on neurodevelopmental tests of motor function (Bayley PDI, Vineland gross motor) and cognitive function (Bayley MDI/CAT/CLAMS) in both groups	At 18–21 months Severe disability: GMFCS 3–5, a development quotient of <2 SD, severe bilateral cortical visual deficit, or any combination of the above	At 24 months using both Bayley II and III with <-2 SD in different domains as poor outcome or GMFCS 3–5, and or severe visual or hearing loss

aEEG, amplitude-integrated electroencephalogram; HI, hypoxic-ischemic; HT, hypothermia; NT, normothermia; MDI, Mental Developmental Index; GMCSF, Gross Motor Function Classification System (a 5 level classification system); BSIDII, Bayley Scales of Infant Development II; PDI, Psychomotor Development Index.

	Infants not fulfilling the entry criteria						Sub-categories combined		P-value comparing last 2 columns
	Cooled >6 h (n = 11)	Postnatal collapse (n = 10)	Preterm <36/40 (n = 6)	Major cranial hemorrhage (n = 5)	Cardiac diagnosis (n = 2)	Surgical diagnosis (n = 2)	Entry criteria not fulfilled (n = 36)	Entry criteria fulfilled (n = 129)	
Gestational age in weeks, mean (SD)	40 ⁺⁵ (0 ⁶)	39 ⁺⁶ (1 ⁺³)	34 ⁺⁶ (0 ⁺⁵)	38 ⁺⁶ (1 ⁺²)	38 ⁺⁴ (0 ⁺⁵)	39 ⁺¹ (0 ⁺²)	39 (2 ⁺²)	39 ⁺⁶ (1 ⁺⁴)	NS
10 min Apgar score, median (IQR)	8 (7–9)	9 (7–10)	6 (4–10)	8 (5–9)	7	5	8 (5–9)	6 (4–8)	0.002
Worst pH in first postnatal hour or first hour post collapse, mean (SD)	6.92 (0.17)	7 (0.3)	6.93 (0.17)	7.02 (0.22)	6.86 (0.12)	6.95 (0.06)	6.99 (0.2)	6.96 (0.7)	NS
Worst BE in first postnatal hour or first hour post collapse mEq/L, mean (SD)	–15.7 (5.6)	–16.1 (6.4)	–19.2 (7.5)	–13.3 (7.8)	–18.9 (0.7)	–12.6 (6.3)	–15.6 (6.3)	–15.5 (6.3)	NS
Persistent pulmonary hypertension, n (%)	2 (18)	0	1 (17)	0	0	1 (50)	4 (11)	13 (10)	NS
Hypotension requiring inotropic support, n (%)	6 (55)	9 (90)	4 (67)	4 (80)	2 (100)	2 (100)	27 (75)	86 (67)	NS
Seizures treated with anticonvulsants, n (%)	5 (45)	9 (90)	3 (50)	5 (100)	1 (50)	1 (50)	24 (67)	88 (68)	NS
First hour hypoglycemia <46.8 mg/L (<2.6 mmol/L) n(%)	2 (18)	5 (50)	2 (33)	3 (60)	1 (50)	1 (50)	14 (39)	36 (28)	NS
Coagulopathy, n (%)	0	5 (50)	3 (50)	5 (100)	1 (50)	0	14 (39)	37 (29)	NS
Thrombocytopenia, n (%)	0	2 (20)	3 (50)	2 (40)	1 (50)	1 (50)	9 (25)	24 (19)	NS
Culture-proven sepsis, n (%)	1 (9)	1 (10)	0	0	0	1 (50)	3 (8)	3 (2)	NS
Length of stay on NICU for survivors, median (IQR)	12 (9–16)	13 (10–17)	15 (9–36)	34 (14–68)	17	38	12 (10–19)	11 (9–13)	0.019
Died, n (%)	1	0	0	2	1	0	4 (11)	20 (16)	
MDI <70, PDI ≥70	0	2	0	1	0	0	3	4	
PDI <70, MDI ≥70	1	1	0	1	0	1	4	9	
MDI and PDI <70	1	0	1	0	0	0	2	9	
% poor outcome (death or MDI and/or PDI <70)	31	38	25	80	50	50	13 (36)	45 (35)	

SD, standard deviation; NS, non-significant; IQR, interquartile range; BE, base excess; NICU, neonatal intensive care unit; MDI, Mental Developmental Index; PDI, Psychomotor Development Index; BSIDII, Bayley Scales of Infant Development II.

Tabella 8

Outcome primari e secondari Cool Cap

Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi S, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* 2005; 365:4995.

	Cooling	Control	Odds ratio (95% CI)	p value
Died or severe disability at 18 months	59/108 (55%)	73/110 (66%)	0.61 (0.34–1.09)	0.10
Died	36/108 (33%)	42/110 (38%)	0.81 (0.47–1.41)	0.48
Severe neuromotor disability	14/72 (19%)	21/68 (31%)	0.54 (0.25–1.17)	0.12
Bayley MDI† <70	21/70 (30%)	24/61 (39%)	0.66 (0.32–1.36)	0.27
Bilateral cortical visual impairment	7/72 (10%)	11/64 (17%)	0.52 (0.19–1.39)	0.22
Secondary outcomes				
Multi-organ dysfunction	97/116 (84%)	95/118 (81%)	1.24 (0.64–2.40)	0.61
Multiple disabilities	15/70 (21%)	20/65 (31%)	0.61 (0.29–1.32)	0.24
Bayley PDI <70	21/69 (30%)	23/56 (41%)	0.63 (0.30–1.31)	0.26
Bilateral sensorineural Hearing loss	5/64 (8%)	3/55 (6%)	1.47 (0.37–5.84)	0.72
Epilepsy	11/72 (15%)	11/67 (16%)	0.92 (0.38–2.24)	1.00
Continuous BSID II scores, median (range)				
Bayley MDI §	84.5 (49–116)	77.0 (49–121)		0.11
Bayley PDI	87.0 (49–127)	79.5 (49–125)		0.06

†Nine surviving patients did not have Bayley MDI scores at 18 months; four of the nine were also missing bilateral cortical visual impairment data. However, all nine had unfavourable primary outcome due to GMF ≥ 3 (GMF=5 for eight of the nine and GMF=4 for the other one). §Incidence compared by Fisher's exact test. Continuous BSID II scores compared by Cox regression analysis including baseline aEEG parameters. Data are number of patients (%) unless otherwise stated.

Table 3: Primary and secondary outcomes and components

Tabella 9

Outcome primari e secondari NICHD

Shankaran, S., Laptook, A. R., Ehrenkranz, R. A., Tyson, J. E., McDonald, S. A., Donovan, E. F., Fanaroff, A. A., Poole, W. K., Wright, L. L., Higgins, R. D., Finer, N. N., Carlo, W. A., Duara, S., Oh, W., Cotten, C. M., Stevenson, D. K., Stoll, B. J., Lemons, J. A., Guillet, R., Jobe, A. H., ... National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network (2005). Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *The New England journal of medicine*, 353(15), 1574–1584. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp050929>

Table 4. Outcome at 18 to 22 Months of Age.*

Variable	Hypothermia Group (N=102) no. (%)	Control Group (N=106) no. (%)	Relative Risk (95% CI)†	P Value
Primary outcome				
Death or moderate or severe disability‡	45 (44)	64 (62)	0.72 (0.54–0.95)	0.01
Secondary outcomes				
Death	24 (24)	38 (37)	0.68 (0.44–1.05)	0.08
Death or disability§				
Among infants with moderate encephalopathy	22 (32)	30 (48)	0.69 (0.44–1.07)	0.09
Among infants with severe encephalopathy	23 (72)	34 (85)	0.85 (0.64–1.13)	0.24
Survival	78 (76)	68 (66)		
Bayley Mental Development Index score¶				
≥85	39 (52)	25 (40)	1.24 (0.83–1.83)	0.27
70–84	17 (23)	13 (21)	1.08 (0.57–2.05)	0.81
<70	19 (25)	24 (39)	0.71 (0.43–1.17)	0.18
Bayley Psychomotor Developmental Index score				
≥85	46 (62)	34 (55)	1.10 (0.82–1.48)	0.53
70–84	8 (11)	6 (10)	1.19 (0.38–3.76)	0.77
<70	20 (27)	22 (35)	0.80 (0.48–1.33)	0.39
Disabling cerebral palsy**	15 (19)	19 (30)	0.68 (0.38–1.22)	0.20
Blindness††	5 (7)	9 (14)	0.50 (0.17–1.44)	0.20
Severe hearing impairment **	3 (4)	4 (6)	0.54 (0.10–3.02)	0.47

* Percentages are based on the number of infants for whom data were available.

† Relative risks shown are adjusted according to center. CI denotes confidence interval.

‡ Data were unobtainable for three patients in the control group. Severe disability was defined as any of the following: Mental Development Index score below 70, Gross Motor Function Classification System (GMFCS) grade level 3 to 5, hearing impairment requiring hearing aids, or blindness. Moderate disability was defined as a Mental Development Index score of 70 to 84 and one or more of the following: GMFCS grade of level 2, hearing impairment with no amplification, or a persistent seizure disorder.

§ Sixty-nine infants in the hypothermia group and 63 in the control group had moderate encephalopathy, and 32 infants in the hypothermia group and 40 in the control group had severe encephalopathy.

¶ Data were unavailable for 3 of 78 infants who survived in the hypothermia group and 6 of 68 who survived in the control group.

|| Data were unavailable for four infants in the hypothermia group and six in the control group.

** Data were unavailable for one infant in the hypothermia group and four in the control group.

†† Data were unavailable for three infants in the hypothermia group and five in the control group.

Tabella 10

Outcome primari e secondari ICE

Jacobs, S. E., Morley, C. J., Inder, T. E., Stewart, M. J., Smith, K. R., McNamara, P. J., Wright, I. M., Kirpalani, H. M., Darlow, B. A., Doyle, L. W., & Infant Cooling Evaluation Collaboration (2011). Whole-body hypothermia for term and near-term newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy: a randomized controlled trial. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 165(8), 692–700. <https://doi.org/10.1001/archpediatrics.2011.43>

Table 3. Other Outcomes of Therapeutic Hypothermia for Infants in the Infant Cooling Evaluation Trial

Outcome	Cooled Group		Control Group		RR (95% CI)	P Value
	No. (%)	Total No.	No. (%)	Total No.		
During intervention period						
Arrhythmia requiring treatment		0		0		
Prolonged QT interval	31 (43.0)	72	13 (19.7)	66	2.19 (1.26-3.81)	.006
Hypotension treated with inotropes	51 (46.4)	110	52 (47.3)	110	0.98 (0.74-1.30)	.89
Overt bleeding or thrombosis	3 (2.7)	110	0	110	Not applicable	.25 ^a
Treated coagulopathy	20 (18.2)	110	12 (10.9)	110	1.67 (0.86-3.24)	.13
Platelet count <150 × 10 ³ /μL	56 (50.9)	110	49 (45.4)	108	1.12 (0.85-1.48)	.41
Hypoxia in fraction of inspired oxygen 1.0		0		0		
Oliguria	32 (34.0)	94	24 (27.0)	89	1.26 (0.81-1.97)	.30
Hepatic dysfunction	36 (34.6)	104	47 (44.8)	105	0.77 (0.55-1.09)	.14
Gastrointestinal tract impairment ^b	4 (3.6)	110	2 (1.8)	110	2.00 (0.37-10.70)	.42
Death	13 (11.8)	110	19 (17.3)	110	0.68 (0.36-1.32)	.26
Primary hospitalization						
Mortality	23 (20.9)	110	35 (31.8)	110	0.66 (0.42-1.04)	0.07
Sepsis ^c	6 (5.5)	110	8 (7.3)	110	0.75 (0.27-2.10)	.59
Survivors sucking all feeds at discharge	60 (87.0)	69	47 (88.7)	53	0.98 (0.86-1.12)	.77
2-y Postnatal age						
Anticonvulsants	6 (7.6)	79	2 (3.4)	58	2.20 (0.46-10.52)	.32
Feeding support since discharge	11 (13.9)	79	9 (15.5)	58	0.90 (0.40-2.02)	.79

Abbreviations: CI, confidence interval; RR, risk ratio.

SI conversion factor: To convert platelet count to ×10⁹/L, multiply by 1.0.

^aAnalyzed using the Fisher exact test.

^bDefined as sloughing of gastrointestinal tract mucosa, rectal bleeding, or necrotizing enterocolitis.

^cSepticemia was diagnosed on initial blood culture in 7 infants, 4 allocated to hypothermia and 3 to the control group. Late-onset sepsis was diagnosed in 7 infants, 2 allocated to hypothermia and 5 to the control group.

Tabella 11

Barkovich Score

Barkovich, A. J., Hajnal, B. L., Vigneron, D., Sola, A., Partridge, J. C., Allen, F., & Ferriero, D. M. (1998). Prediction of neuromotor outcome in perinatal asphyxia: evaluation of MR scoring systems. *AJNR. American journal of neuroradiology*, 19(1), 143–149.

Score	Finding
Basal ganglia (BG)	
0 =	Normal or isolated focal cortical infarct
1 =	Abnormal signal in thalamus
2 =	Abnormal signal in thalamus and lentiform nucleus
3 =	Abnormal signal in thalamus, lentiform nucleus, and perirolandic cortex
4 =	More extensive involvement
Watershed (W)	
0 =	Normal
1 =	Single focal infarction
2 =	Abnormal signal in anterior or posterior watershed white matter
3 =	Abnormal signal in anterior or posterior watershed cortex and white matter
4 =	Abnormal signal in both anterior and posterior watershed zones
5 =	More extensive cortical involvement
Basal ganglia/watershed (BG/W)	
0 =	Normal
1 =	Abnormal signal in basal ganglia or thalamus
2 =	Abnormal signal in cortex
3 =	Abnormal signal in cortex and basal nuclei (basal ganglia or thalami)
4 =	Abnormal signal in entire cortex and basal nuclei
Summation (S)	
Arithmetic sum of BG and W	
Enhancement (E)	
0 =	No enhancement
1 =	Enhancement in white matter only
2 =	Enhancement in deep gray matter nuclei
3 =	Enhancement in cerebral cortex
4 =	Enhancement in cortex and deep gray matter or white matter

Tabella 12**Caratteristiche dei soggetti studiati**

Characteristic	Value
Sex, male (female)	8 (4)
Gestational age [range] days	[243,292]
Birth weight [range] (g)	[2500,4134]
Delivery mode, vaginal (caesarean section)	7 (5)
SARNAT 60 min median [range]	2 [1;3]
Apgar 1 min median [range]	3 [1;9]
Apgar 5 min median [range]	5.5 [2;8]
Apgar 10 min median [range]	7 [4;9]
Hypoglycemia at birth, yes (no)	3 (9)
pH median [range]	6.9 [6.8;7.1]
BE median [range]	-15.6 [-21.5;-7.5]
pH at 1 h median [range]	7.1 [7.0;7.2]
EB at 1 h median [range]	-16.4 [-22.7;-8.5]
Platelet transfusion, yes (no)	7 (5)

Tabella 13

Metaboliti che modificano il loro profilo prima, durante e dopo l'ipotermia; *annotation* indica l'annotazione del segnale registrato, HMDB l'identificativo del metabolita relativo a *Human Metabolome DataBase*, m/z il rapporto massa/carica dello ione, Rt è il tempo di ritenzione del picco cromatografico, FC[IPO/T0] è il rapporto fra la mediana del segnale registrato durante ipotermia e la mediana dello stesso segnale prima dell'ipotermia mentre FC[PT/T0] è il rapporto fra la mediana del segnale dopo ipotermia e quella del segnale prima dell'ipotermia.

Annotation	HMDB	m/z	Rt	FC[IPO/T0]	FC[PT/IPO]
p-Hydroxyphenylacetic acid	HMDB0000020	151.0397	3.322	5.31	6.98
Aldosterone	HMDB0000037	361.2020	5.759	0.52	0.78
Glycolic acid	HMDB0000115	75.0077	0.613	4.03	3.34
Glycocholic acid	HMDB0000138	466.3169	6.619	1.73	3.00
L-Histidine	HMDB0000177	110.0723	0.661	2.86	7.91
L-Lysine	HMDB0000182	130.0873	0.523	0.60	0.02
L-Cystine	HMDB0000192	241.0311	0.591	3.04	4.52
Oxoglutaric acid	HMDB0000208	145.0136	0.784	1.37	3.10
Pregnenolone	HMDB0000253	299.2379	6.443	0.60	0.38
Pyroglutamic acid	HMDB0000267	130.0509	0.982	0.93	1.38
17a-Hydroxypregnenolone	HMDB0000363	509.2751	6.442	0.85	0.52
5-Hydroxymethyluracil	HMDB0000469	125.0353	0.773	1.95	2.19
Amino adipic acid	HMDB0000510	144.0665	0.656	2.22	2.78
Gamma-Butyrolactone	HMDB0000549	85.0286	0.613	2.40	2.11
Homocitrulline	HMDB0000679	190.1198	0.843	1.00	0.59
L-Kynurenine	HMDB0000684	192.0666	1.912	0.94	1.99
Kynurenic acid	HMDB0000715	190.0509	3.589	0.59	0.91
Pseudouridine	HMDB0000767	245.0778	0.773	1.31	1.56
L-Octanoylcarnitine	HMDB0000791	288.2175	5.241	2.90	1.94
N-Acetyl-L-aspartic acid	HMDB0000812	174.0401	0.832	1.39	3.05
N-Acetyl-L-tyrosine	HMDB0000866	222.0767	3.263	1.74	3.36
Tetrahydrodeoxycorticosterone	HMDB0000879	317.2484	6.432	0.77	0.43
N-Acetylglutamic acid	HMDB0001138	188.0558	1.046	1.42	2.54
Butyrylcarnitine	HMDB0002013	232.1555	2.403	0.46	0.37
1-Methyluric acid	HMDB0003099	181.0362	1.869	0.65	0.33
Cortolone	HMDB0003128	331.2273	6.069	0.49	0.54
21-Deoxycortisol	HMDB0004030	347.2219	5.829	0.85	0.94
7a-Hydroxydehydroepiandrosterone	HMDB0004611	271.2063	6.229	1.08	1.41
3a,21-Dihydroxy-5b-pregnane-11,20-dione	HMDB0006755	349.2368	5.930	0.87	1.03
N-Acetylvaline	HMDB0011757	158.0818	3.360	1.09	1.47
Valerylcarnitine	HMDB0013128	246.1710	3.231	1.50	1.58

9. FIGURE

Figura 1

Fetal circulation

Circulatory pathways through fetal liver and heart and sites of blood flow measurement in current study (arrows). Oxygenated blood (red) enters through umbilical vein (UV) and is distributed to liver or shunted through ductus venosus (DV) and directed as a preferential streaming through foramen ovale (FO) to left atrium (LA) supplying coronary and cerebral circuits via aorta (AO) (traditional via sinistra): Deoxygenated blood from abdominal inferior vena cava (IVC) and superior vena cava (SVC) is directed predominantly to right atrium (RA) to form viadextra (blue) that bypasses lungs via ductus arteriosus (DA) and is main provider of blood to descending aorta. CCA, Common carotid arteries; PA, pulmonary artery; FOV, foramen ovale valve; LHV, left hepatic vein; LV, left ventricle; MHV, medial hepatic vein; P, portal vein; PV, pulmonary vein; RHV, right hepatic vein; RV, right ventricle.

(Torvid MD, Svein MD. Blood flow and the degree of shunting through the ductus venosus in the human fetus, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2000).

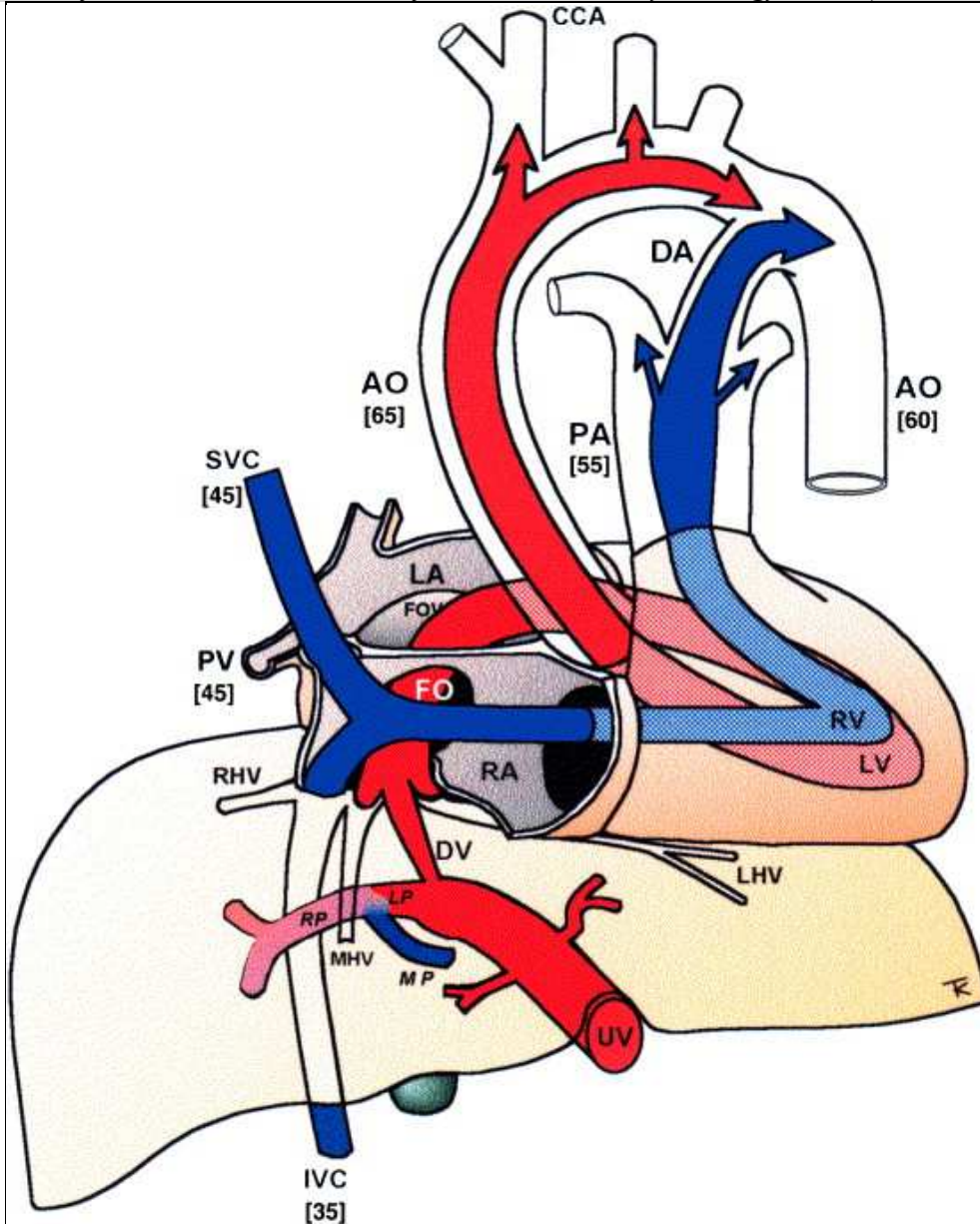


Figura 2

Adaptive mechanisms and systemic consequences of interruption of placental blood flow. DIC, disseminated intravascular coagulation; NEC, necrotizing enterocolitis; NRBC, nucleated red blood cells; PPHN, persistent pulmonary hypertension of the newborn; SIADH, syndrome of inappropriate antidiuretic hormone release.

(Rainaldi MA, Perlman JM. Pathophysiology of Birth Asphyxia, 2016).

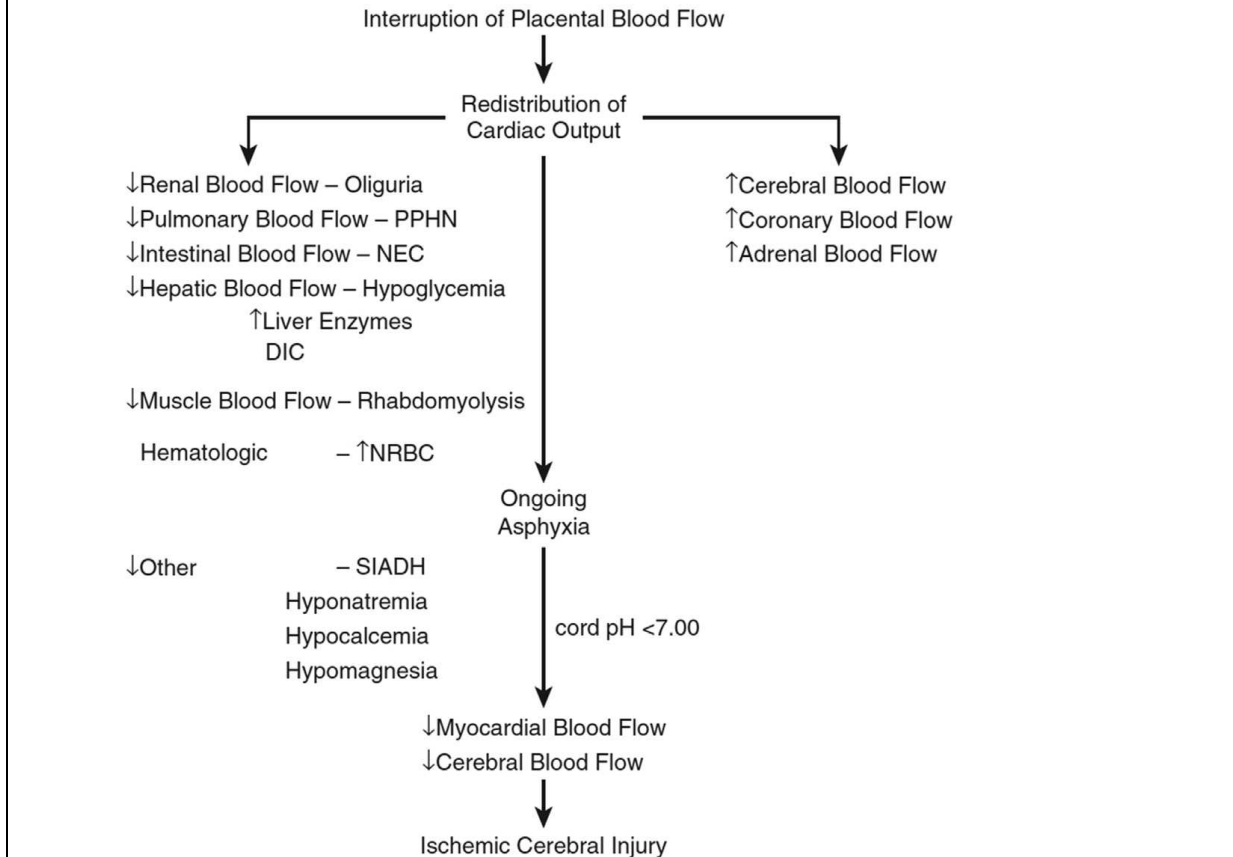


Figura 3

Potential biochemical mechanisms of hypoxic–ischemic brain injury. ATP, adenosine triphosphate.

(Rainaldi MA, Perlman JM. Pathophysiology of Birth Asphyxia, 2016).

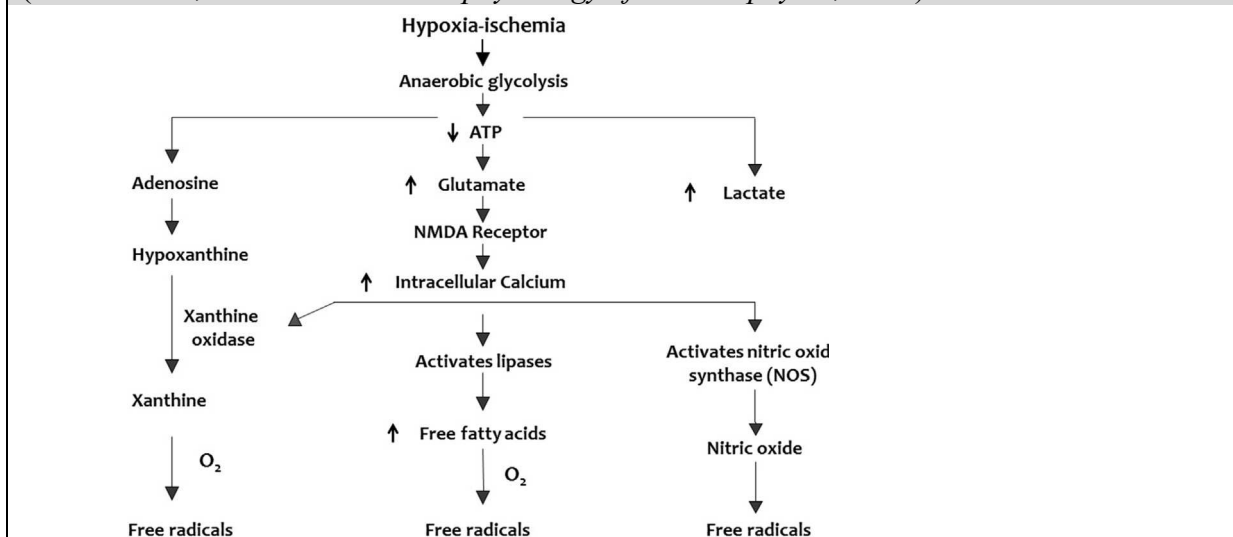


Figura 4

Drury, P. P., Gunn, E. R., Bennet, L., & Gunn, A. J. (2014). Mechanisms of hypothermic neuroprotection. *Clinics in perinatology*, 41(1), 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2013.10.005>

Phases of Cerebral Injury

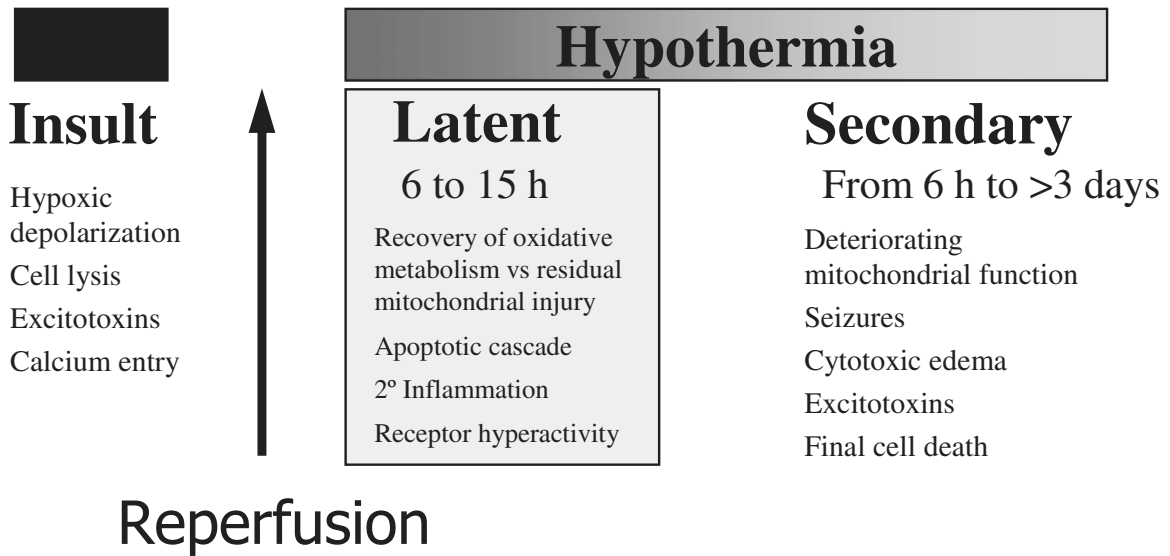


Figura 5

Tao JD, Mathur AM. Using amplitude-integrated EEG in neonatal intensive care. *J Perinatol*. 2010 Oct;30 Suppl:S73-81. doi: 10.1038/jp.2010.93. PMID: 20877412.

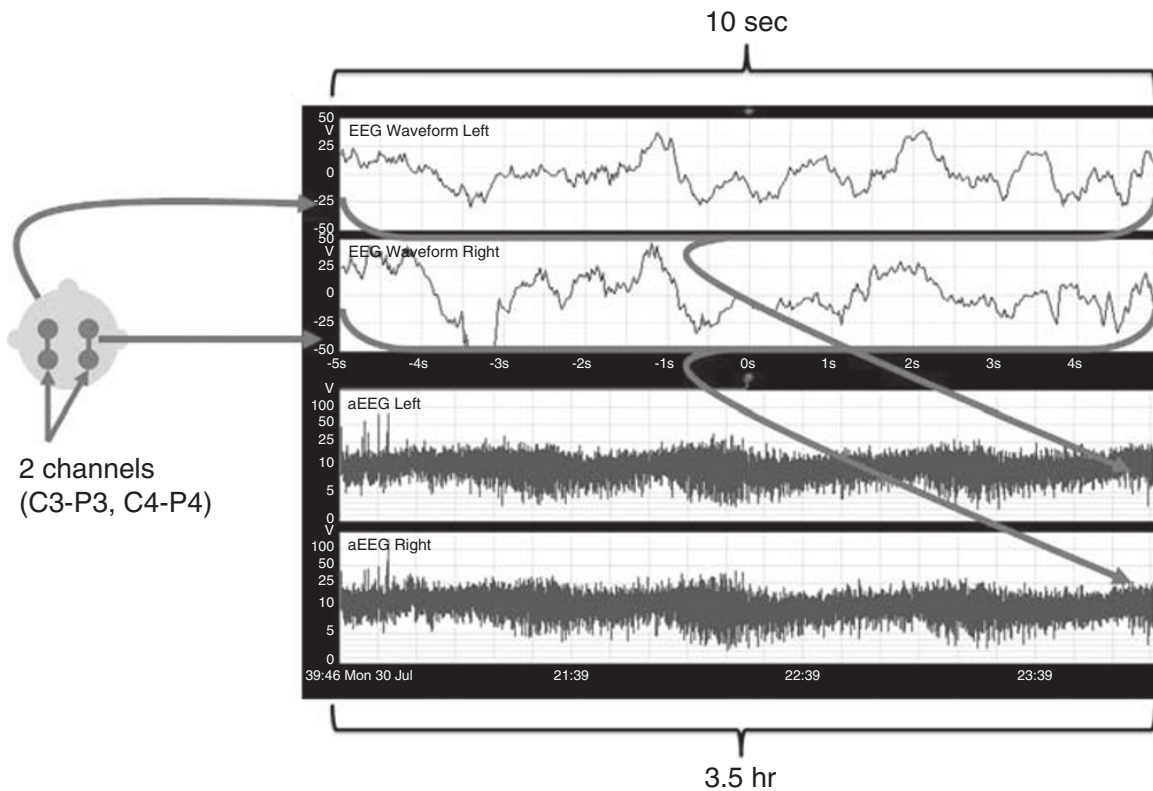


Figura 6

Tao JD, Mathur AM. Using amplitude-integrated EEG in neonatal intensive care. *J Perinatol.* 2010 Oct;30 Suppl:S73-81. doi: 10.1038/jp.2010.93. PMID: 20877412.

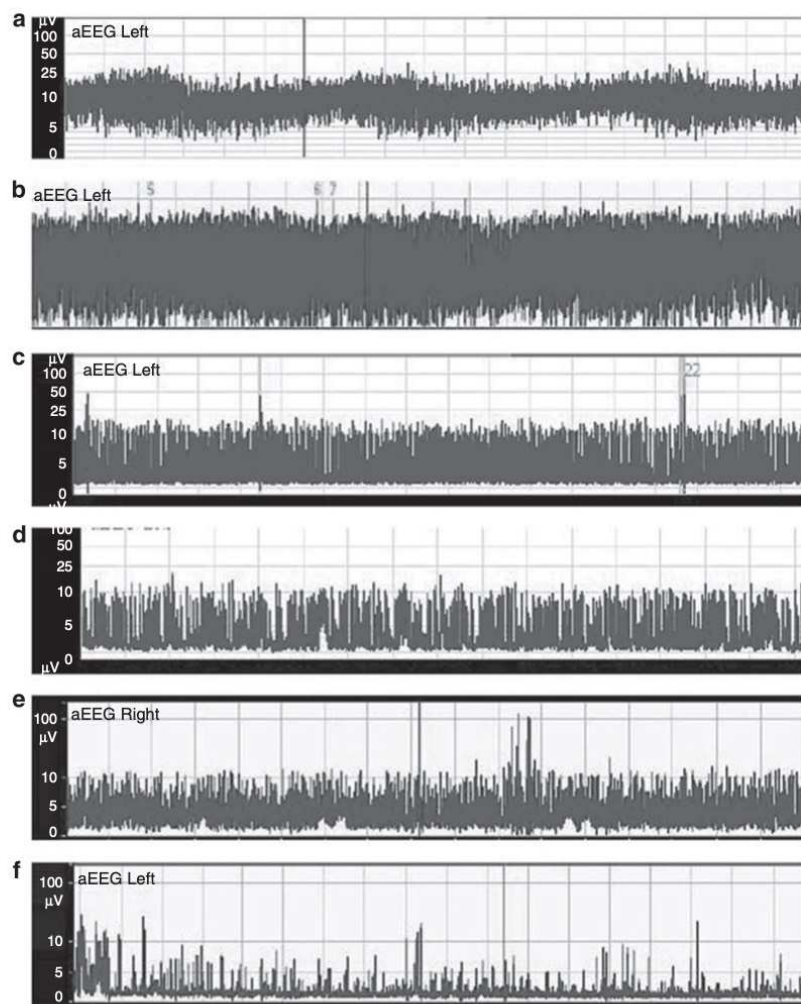


Figure 5 (a) Continuous background pattern, with prominent SWC: upper-margin voltage is $>10 \mu\text{V}$ and lower margin voltage is $>5 \mu\text{V}$. (b) Discontinuous background pattern: upper margin is $>10 \mu\text{V}$ and lower margin is $<5 \mu\text{V}$. (c, d) Burst suppression pattern: upper and lower margin voltages are <10 and $<5 \mu\text{V}$, respectively, with >100 bursts per hour (c) and <100 bursts per hour (d). (e) Continuous low voltage: upper margin is $<10 \mu\text{V}$ and lower margin is $<5 \mu\text{V}$. Occasional spikes are seen over $10 \mu\text{V}$. (f) Isoelectric or flat tracing: both margins are $<5 \mu\text{V}$ and prominent spikes are likely due to patient movement. aEEG, amplitude-integrated electroencephalography.

Figura 7

Kurusu, Kota & Yenari, Midori. (2017). Therapeutic hypothermia for ischemic stroke; pathophysiology and future promise. *Neuropharmacology*. 134. 10.1016/j.neuropharm.2017.08.025.

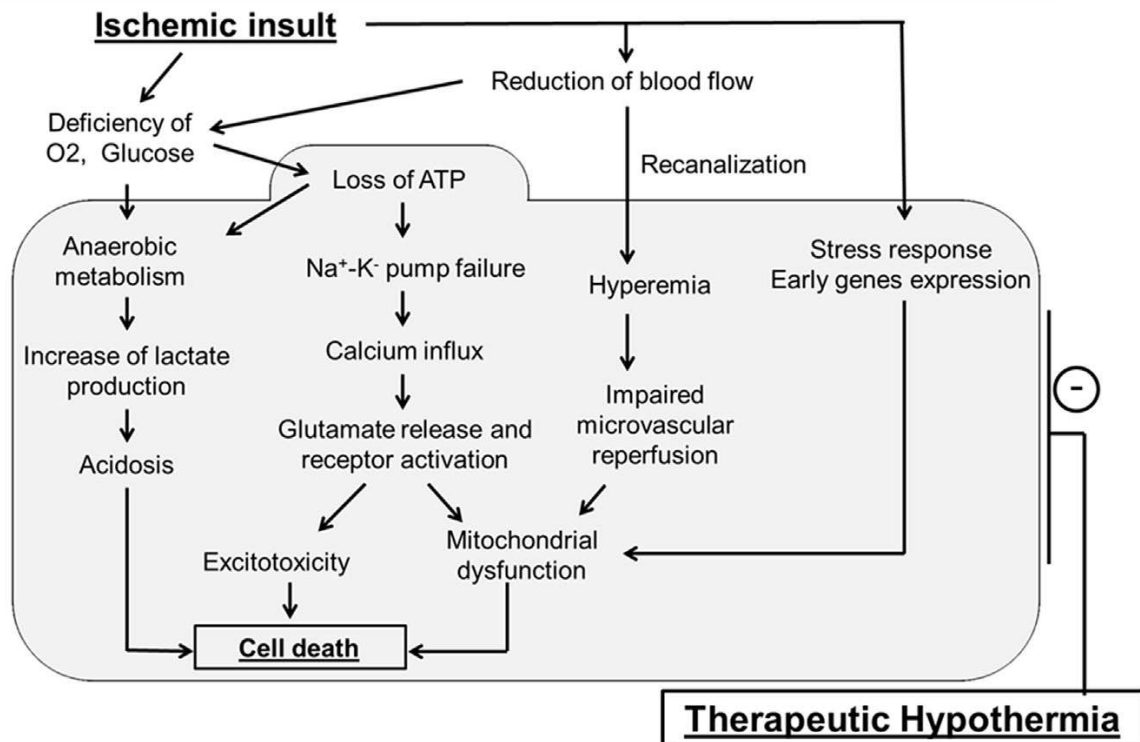


Figura 8

Kurusu, Kota & Yenari, Midori. (2017). Therapeutic hypothermia for ischemic stroke; pathophysiology and future promise. *Neuropharmacology*. 134. 10.1016/j.neuropharm.2017.08.025.

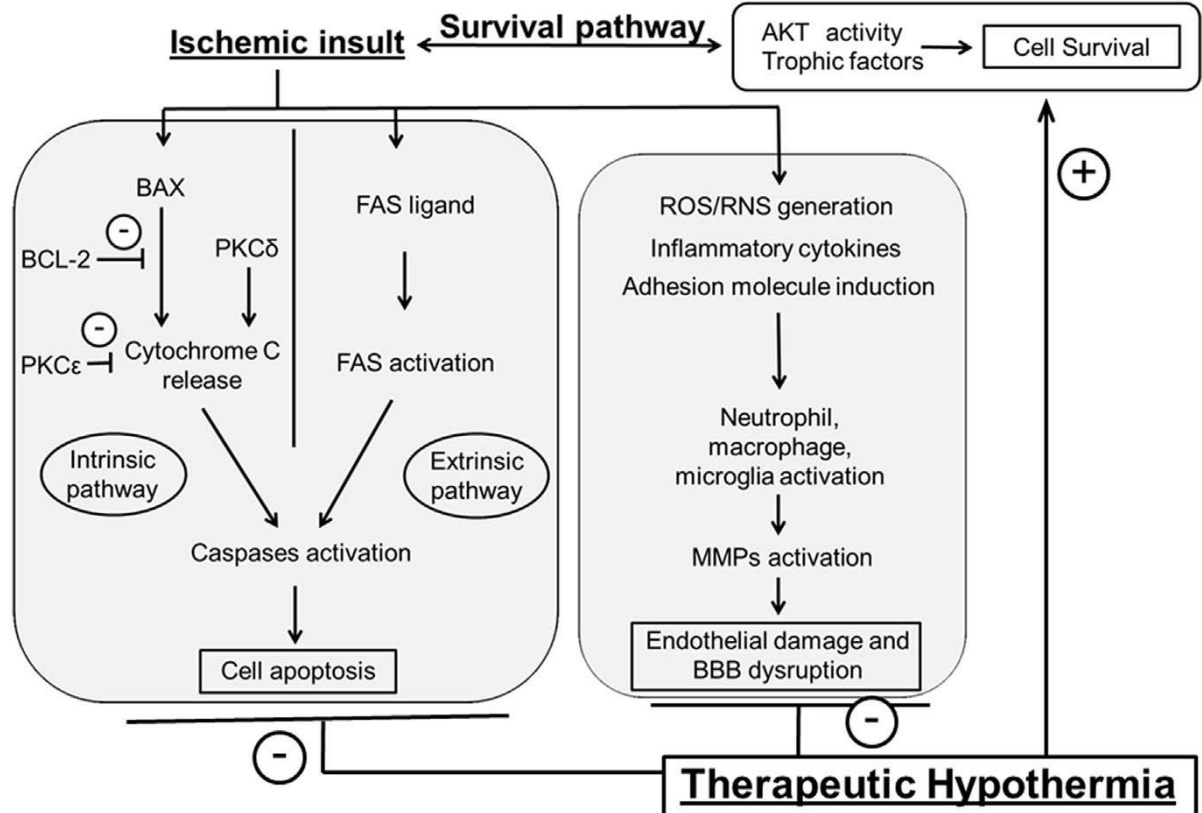


Figura 9

Silveira, R. C., & Procianoy, R. S. (2015). Hypothermia therapy for newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. *Jornal de pediatria*, 91(6 Suppl 1), S78–S83. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2015.07.004>

Meet both criteria:

1. Evidence of perinatal asphyxia umbilical cord blood
Umbilical cord blood gas analysis or in the first hour of
life with pH < 7.0 or EB < -16
Or history of perinatal acute event (placental abruption,
cord prolapse)
Or Apgar score ≤ 5 in the 10th minute of life
Or need for ventilation beyond the tenth minute of life
and
2. Evidence of moderate to severe encephalopathy before 6 hours of life:
Seizures, level of consciousness, spontaneous activity, posture, tone,
reflexes, and autonomic system.

Figura 10

Score scatter plot del modello PCA: i campioni di urina sono riportati come cerchi usando un codice colore che rappresenta la fase per i casi (T0 in bianco, IPO in grigio chiaro, PT in grigio scuro) mentre in verde sono indicati i campioni dei soggetti sani.

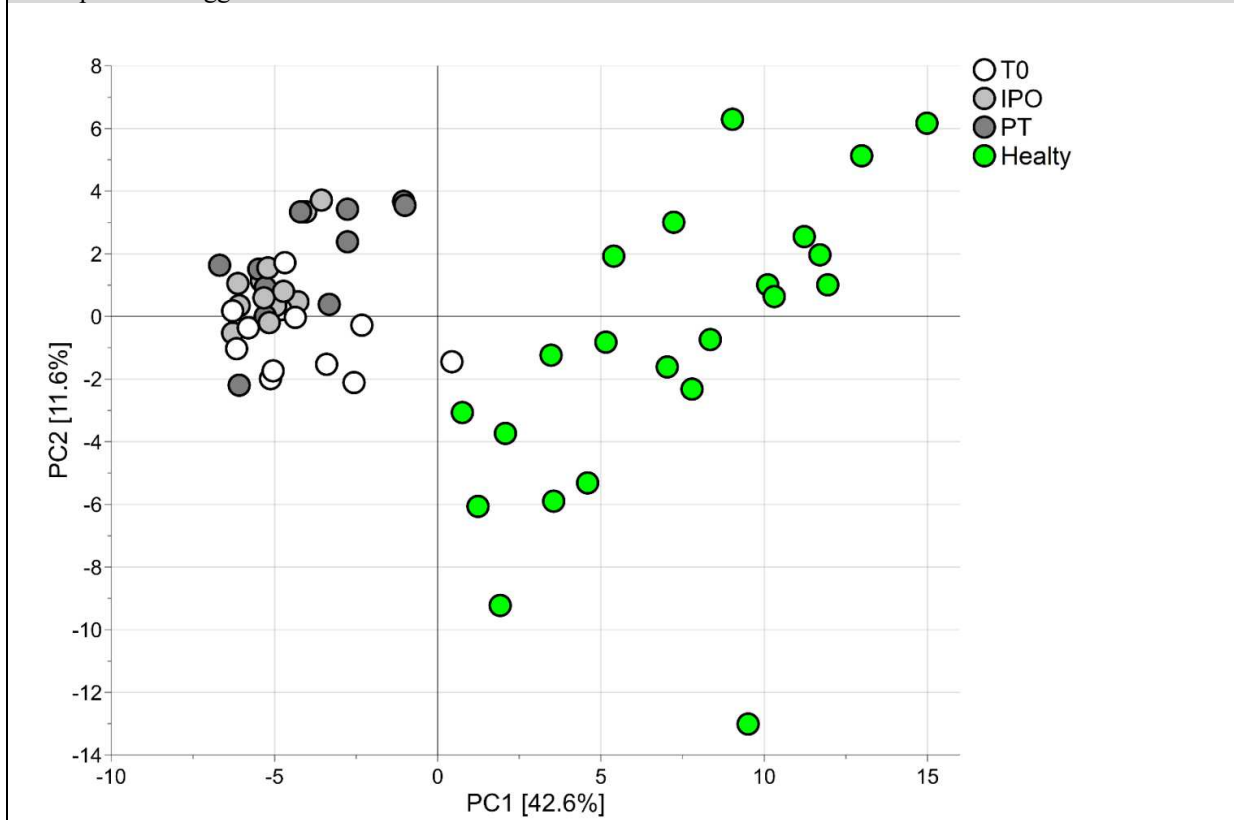


Figura 11

Biplot del modello PLS: i campioni di urina sono riportati come cerchi usando un codice colore che rappresenta la fase (T0 in bianco, IPO in grigio chiaro, PT in grigio scuro); le variabili sono riportate come triangoli: in rosso sono riportate le variabili rilevanti mentre in nero quelle non rilevanti.

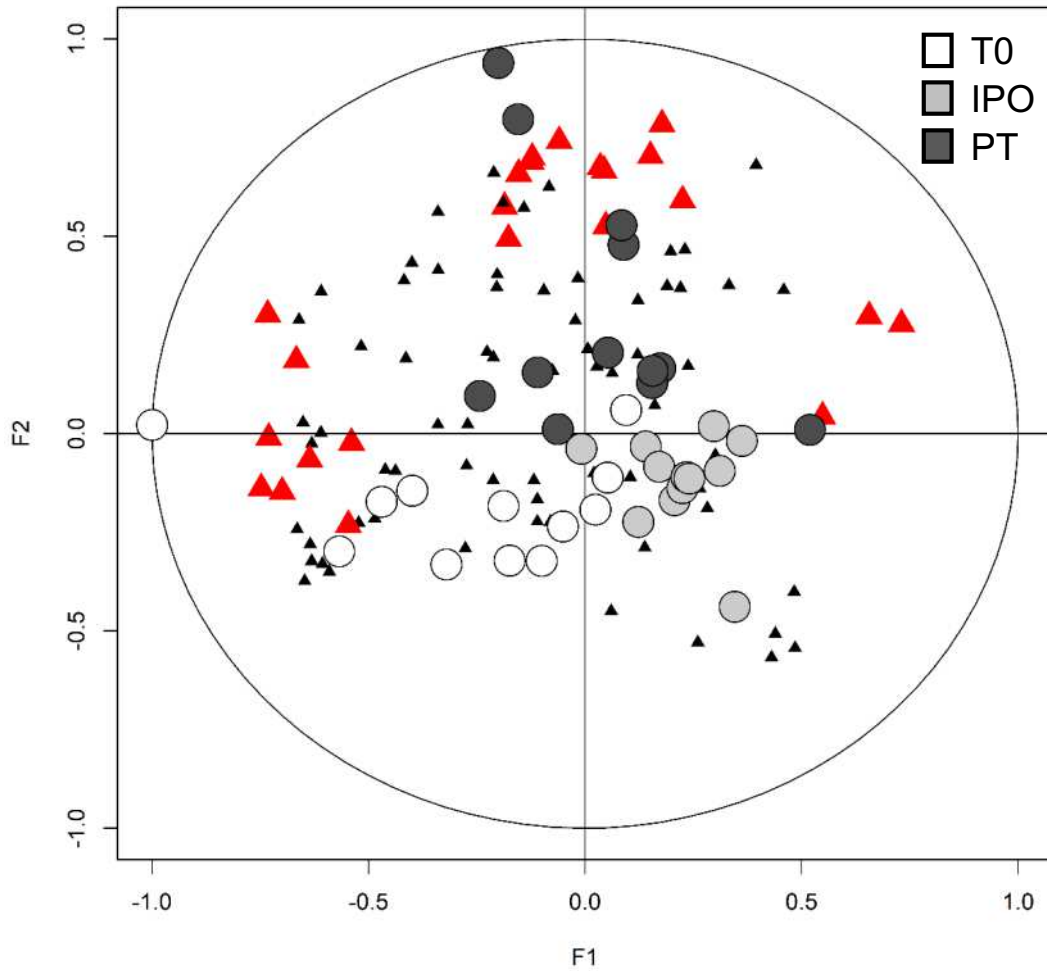


Figura 12

Over-representation pathway analysis: i pathway che risultano contenere almeno un metabolita sono riportati in base al valore di p ottenuto dall'analisi e riportato come $-\log_{10}(p)$ e al valore dell'impact del pathway calcolato dall'analisi topologica dei pathway del database.

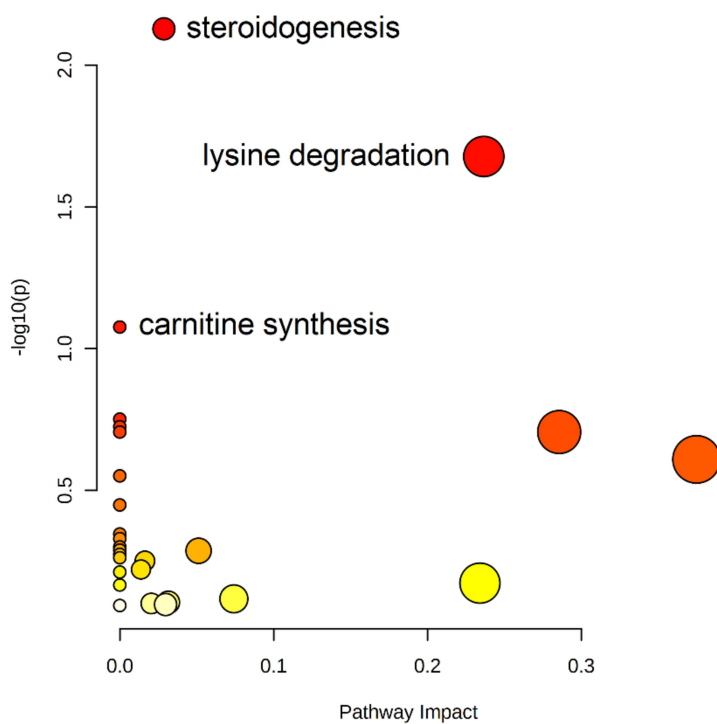


Figura 13

Ferreira GC, McKenna MC. L-Carnitine and Acetyl-L-carnitine Roles and Neuroprotection in Developing Brain. *Neurochem Res.* 2017 Jun;42(6):1661-1675. doi: 10.1007/s11064-017-2288-7. Epub 2017 May 16. PMID: 28508995; PMCID: PMC5621476.

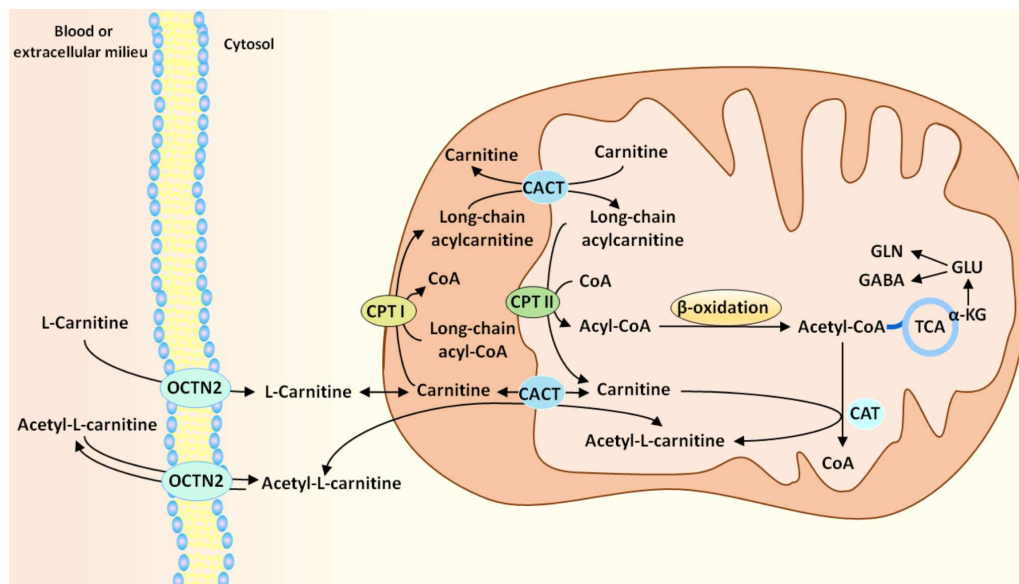


Figure 2. The carnitine shuttle

L-carnitine and acetyl-L-carnitine enter the cells from blood or extracellular milieu through the OCTN2 transporter. The enzyme acyl-CoA synthase (not shown) converts long chain fatty acids to fatty acyl-CoAs, which are subsequently converted to acylcarnitines by the enzyme carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) localized in the outer mitochondrial membrane. Acylcarnitines cross the inner mitochondrial membrane via a transporter, the carnitine/acylcarnitine translocase (CACT), in exchange for free L-carnitine. The enzyme carnitine palmitoyltransferase II (CPT II), which is localized in the inner mitochondrial membrane, converts acylcarnitines back to acyl-CoAs and free L-carnitine, which exits the mitochondria and serves as the substrate for CPT I to form more acylcarnitine. Carbons from acyl-CoAs imported into the mitochondrial matrix through the carnitine shuttle can be oxidized for energy or metabolized via the TCA cycle and incorporated into glutamate, glutamine and GABA.

Figura 14

Denihan NM, Kirwan JA, Walsh BH, Dunn WB, Broadhurst DI, Boylan GB, Murray DM. Untargeted metabolomic analysis and pathway discovery in perinatal asphyxia and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2019 Jan;39(1):147-162. doi: 10.1177/0271678X17726502. Epub 2017 Aug 25. PMID: 28840775; PMCID: PMC6311668.

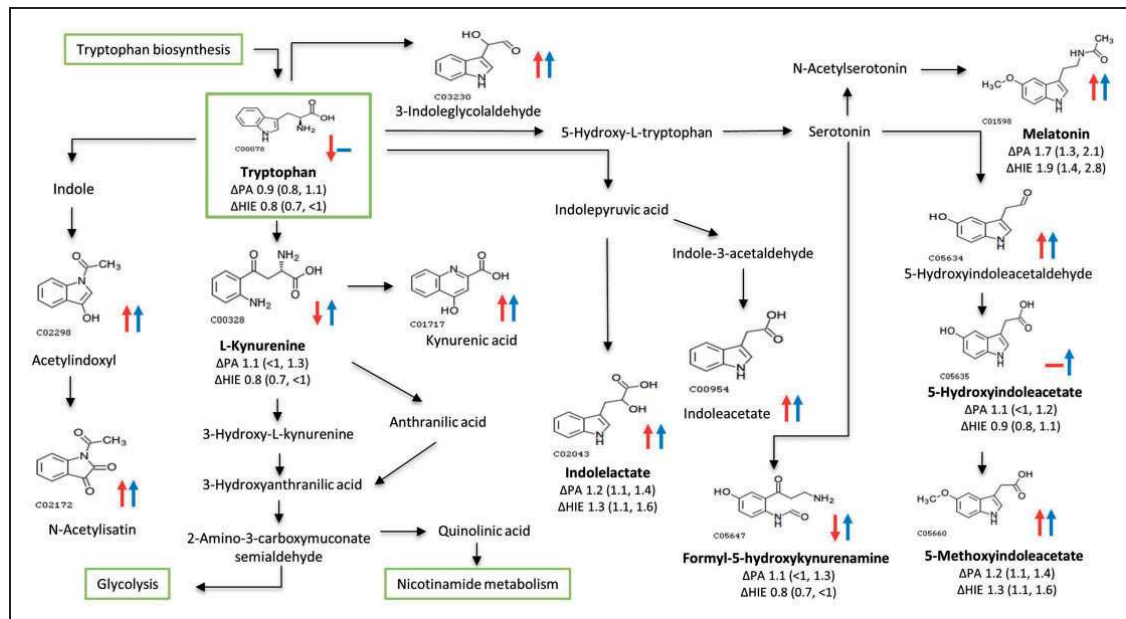


Figure 4. Alterations in tryptophan metabolism. The structure is shown for the compounds identified by FT-ICR-MS. Arrows indicate an increases (\uparrow) or decreases (\downarrow) in metabolite fold change; Δ HIE (red) and Δ PA (blue), while metabolite IDs in bold indicate the significantly altered compounds with fold change (95% CI) included.

Figura 15

Stone T. W. (2020). Does kynurenic acid act on nicotinic receptors? An assessment of the evidence. *Journal of neurochemistry*, 152(6), 627–649. <https://doi.org/10.1111/jnc.14907>

Antagonist activity

NMDAR: (ligand: glycine, D-serine)
Glycine-2 co-agonist site
IC50: 8~10 μM [1-6]
Competitive or non-competitive
• depolarization; • excitation
• plasticity
• neurodegeneration

NMDAR: (ligand: glutamate, NMDA)
Glutamate/NMDA binding site
IC50: ~200 μM [3,4,6-11]
Competitive
• depolarization; • excitation
• neurodegeneration

AMPA/kainate receptors: (ligand: glutamate)
IC50: ~250 μM [3,4,10,11,12]
Competitive
• depolarization
• excitation

7-nicotinic chlinoreceptor
IC 50~10 μM [13]
Non-competitive

?



Kynurenine

Kynurenic acid

Redox activity:
IC50 > 200 μM
Superoxide and hydroxyl complexation [18,19]

Agonist activity

Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR)
(ligand: kynurenine/kynurenic acid)
IC50: 1-10 μM [13-15]
• proliferation ?
• migration ?

GPR35 (ligand: kynurenic acid)
IC50: 10-100 μM [16-17]
• hyperpolarization
• inhibition of adenylate cyclase

Fig. 2 A summary of the major molecular targets known for kynurenic acid, with an indication of the qualitative and quantitative activity expanded in the text. The citation numbers refer to the following: [1] Henderson et al., 1990; [2] Watson et al. 1988; [3] Kessler et al. 1989a; [4] Kessler et al. 1989b; [5] Kloog et al. 1990; [6] Mayer et al. 1988; [7]

Olverman et al. 1988; [8] Moroni et al. 1989; [9] Robinson et al. 1985; [10] Danysz et al. 1989a; [11] Danysz et al. 1989b; [12] Fisher and Mott, 2011; [13] DiNatale et al. 2010; [14] Opitz et al. 2011; [15] Kimura et al. 2017; [16] Wang et al. 2006; [17] Guo et al. 2008; [18] Kubicova et al. 2019; [19] Lugo-Huitron et al. 2011.

10. RINGRAZIAMENTI

Infine, vorrei dedicare l'ultima pagina del presente elaborato alle persone che mi hanno supportato nella redazione dello stesso e a coloro che mi hanno accompagnato in questo percorso durato sei anni.

Innanzitutto, ringrazio il Dott. Valerio, il quale mi ha aiutato a condurre le ricerche oggetto del lavoro ed è stato sempre pronto a darmi le giuste indicazioni in ogni fase della realizzazione. Ti ringrazio della tua infinita disponibilità.

Ringrazio tutto il team del gruppo di ricerca alla Città della Speranza di Padova il cui lavoro ha permesso la stesura di questa tesi. In particolare, ringrazio il Dott. Giuseppe Giordano ed il Dott. Matteo Stocchero.

Un ringraziamento speciale va alla mia fidanzata Vera, è grazie a lei se ho deciso di impegnarmi negli studi e di iniziare questo corso di Laurea. Ti ringrazio per essere stata sempre al mio fianco supportandomi in tutti questi anni di studio, soprattutto nei momenti difficili. Ti ringrazio anche per la forza ed il coraggio che sei riuscita a trasmettermi, senza i quali non ce l'avrei mai fatta.

Ringrazio i miei genitori senza i quali non sarei mai riuscito a intraprendere e completare questo lungo percorso di studi. Vi ringrazio per avermi permesso di arrivare fin qui.

Infine, vorrei dedicare questo piccolo traguardo a me stesso, che possa essere l'inizio di una lunga e brillante carriera professionale.