

1222·2022  
**800**  
ANNI



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**

**Università degli Studi di Padova**

Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino (SDB)

U.O.C di Patologia e Terapia Intensiva Neonatale

Direttore: Ch.mo Prof. Eugenio Baraldi

TESI DI LAUREA

**Modifiche longitudinali del metaboloma urinario e  
plasmatico di neonati con asfissia perinatale  
sottoposti ad ipotermia terapeutica**

Relatore: Ch.mo Prof. Eugenio Baraldi

Correlatore: Dott. Enrico Valerio

Laureanda: Sofia Galzignato

Anno Accademico 2021 - 2022



# INDICE

<b>ABSTRACT</b>	<b>1</b>
<b>RIASSUNTO</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>5</b>
1.1. L'asfissia perinatale	5
1.1.1. Epidemiologia	5
1.1.2. Eziopatogenesi	6
1.1.3. Encefalopatia ipossico-ischemica	10
1.1.4. Gestione del paziente asfittico	13
1.1.5. L'ipotermia terapeutica	15
1.1.6. Prognosi e follow-up	21
1.2. Le scienze "omiche"	24
1.2.1. La metabolomica	25
1.2.2. La metabolomica e l'asfissia perinatale	27
<b>2. OBIETTIVI DELLO STUDIO</b>	<b>29</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>31</b>
3.1. Disegno dello studio	31
3.2. Popolazione dello studio	31
3.3. Campionamento	32
3.4. Analisi metabolomica	33
3.4.1. Profilo metabolomico untargeted	33
3.4.2. Profilo metabolomico targeted	35
3.5. Analisi statistica	36
<b>4. RISULTATI</b>	<b>39</b>
4.1. Caratteristiche della popolazione	39
4.2. Analisi metabolomica untargeted dei campioni di urina	40
4.3. Analisi metabolomica targeted dei campioni di plasma	46
<b>5. DISCUSSIONE</b>	<b>49</b>
5.1. Analisi metabolomica untargeted	50
5.2. Analisi metabolomica targeted	51

5.3.	Analisi dei pathway	51
5.3.1.	Steroidogenesi	52
5.3.2.	Degradazione della lisina	56
5.3.3.	Sintesi della carnitina ( $\beta$ -ossidazione)	58
5.3.4.	Metabolismo del triptofano	60
5.3.5.	Metabolismo della glicina e serina	62
5.3.6.	Metabolismo della metionina	63
5.3.7.	Riciclo dell'ammoniaca	64
5.3.8.	Biosintesi di spermidina e spermina	65
5.4.	Limiti e prospettive future	67
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>69</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>71</b>

## ABSTRACT

**Background:** perinatal asphyxia is a condition of impaired fetal-placental gas exchange resulting from the interruption of placental flow. This pathology is still today one of the major causes of neonatal mortality and morbidity. Its most fearsome complication is hypoxic-ischemic encephalopathy, which can significantly influence short and long-term prognosis of patients. To date, the only therapy that has been shown to improve the prognosis of these newborns is therapeutic hypothermia (TH). Infant's candidacy for this therapy is based mainly on clinical and instrumental criteria; unfortunately, no early biomarkers that can guide this choice are currently available. Metabolomics is a science that is proving extremely promising in the field of perinatal asphyxia and could allow the identification of metabolites or metabolic pathways that may be able to change the future clinical approach to this pathology.

**Aims:** the primary objective of the study was to describe the dynamic changes over time of the urinary and plasma metabolome in the same cohort of asphyxiated newborns. A secondary objective was to search for potential correspondences between the plasma and urinary changes of the metabolome during three phases: pre-TH (T0), the 72 hours of TH (IPO) and the rewarming phase (PT).

**Materials and methods:** newborns were enrolled if older than 35 gestational weeks, with signs and symptoms of perinatal asphyxia at birth and undergoing TH. Urine and plasma samples were collected before starting TH, during the 72h of TH and after TH. Samples were analyzed with untargeted and targeted metabolomics analysis using a high performance liquid chromatography system coupled to a mass spectrometer. The obtained data were analyzed with univariate and multivariate statistical analysis techniques and over-representation pathway analysis methods.

A group of 22 healthy subjects was also enrolled to make a comparison at T0 between ill and normal newborns.

**Results:** urine samples were collected for 12 patients before (T0), during (IPO) and after hypothermia (PT); in addition, 19 patients had plasma samples collected at these three time points. The combination of the univariate and multivariate analysis revealed that 31 urinary metabolites and 34 plasma metabolites are relevant in describing the changes in the three phases. Pathway analysis made it possible to identify the perturbed metabolic pathways in the three phases. In urine samples pathways of steroidogenesis, lysine degradation and carnitine synthesis ( $\beta$ -oxidation) were identified; as for targeted analysis on plasmatic samples, pathways related to the metabolism of tryptophan, glycine and serine, methionine, ammonia recycling, spermidine and spermine biosynthesis and carnitine synthesis ( $\beta$ -oxidation) were significantly affected.

**Conclusions:** our study allowed us to describe the dynamic changes in the urinary and plasma metabolome of asphyxiated infants over time, as well as to determine which metabolic pathways are significantly altered during perinatal asphyxia. In particular, it should be noted that the metabolic pathway of  $\beta$ -oxidation is constantly influenced in both urine and plasma.

Future randomized controlled trials are needed to assess the rationale of potentially supportive treatments directly targeting the detected metabolic variations over time of these patients.

## RIASSUNTO

**Introduzione:** l'asfissia perinatale è una condizione di compromissione degli scambi gassosi feto-placentari conseguenti all'interruzione del flusso placentare. Tale patologia è ancora ad oggi una delle maggiori cause di mortalità e morbilità in epoca neonatale. La sua complicanza 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 terapia che si è dimostrata in grado di migliorare la prognosi di questi neonati è l'ipotermia terapeutica (IT). La candidabilità del neonato alla terapia si basa principalmente su criteri clinici e strumentali; ad oggi, non esistono biomarcatori che possano guidarne la scelta. 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 metaboliche in grado di cambiare in futuro l'approccio clinico in questa patologia.

**Scopo dello studio:** l'obiettivo primario dello studio era descrivere le modificazioni dinamiche nel tempo del metaboloma urinario e plasmatico in una stessa coorte di neonati asfittici. Obiettivo secondario è stato ricercare potenziali corrispondenze tra le modificazioni plasmatiche ed urinarie del metaboloma durante le fasi di pre-IT (T0), le 72 ore di IT (IPO) e di post-riscaldamento (PT).

**Materiali e metodi:** sono stati arruolati neonati con più di 35 settimane gestazionali, con segni e sintomi di asfissia perinatale alla nascita e sottoposti ad IT. Sono stati raccolti campioni di urine e plasma prima dell'avvio dell'IT, durante le 72h di IT e dopo l'IT. I campioni sono stati analizzati con tecniche di metabolomica untargeted e targeted 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.

Un gruppo di 22 neonati sani sono stati arruolati per effettuare un paragone del metaboloma a T0 tra malati e non malati.

**Risultati:** per 12 pazienti sono stati raccolti i campioni di urina prima dell'ipotermia (T0), durante l'ipotermia (IPO) e dopo l'ipotermia (PT) e di 19 pazienti è stato ottenuto un campione di plasma per ognuna delle tre fasi. La combinazione di analisi univariata e multivariata ha messo in luce 31 metaboliti urinari e 34 metaboliti plasmatici rilevanti nel descrivere le modificazioni nelle tre fasi. Le pathway analysis hanno permesso di individuare le vie metaboliche perturbate nelle tre fasi. Nei campioni di urine sono state identificate le pathway di steroidogenesi, di degradazione della lisina e di sintesi della carnitina ( $\beta$ -ossidazione), mentre nel plasma le analisi targeted hanno individuato come alterate le pathway relative al metabolismo del triptofano, della glicina e della serina, della metionina, del riciclo dell'ammoniaca, della biosintesi della spermidina e della spermina e della sintesi della carnitina.

**Conclusioni:** il nostro studio ci ha permesso di descrivere le modifiche dinamiche del metaboloma urinario e plasmatico dei neonati asfittici nel tempo, nonché di determinare quali sono le vie metaboliche che vengono significativamente alterate durante l'asfissia perinatale. In particolare da osservare che la via metabolica della  $\beta$ -ossidazione è costantemente influenzata sia nelle urine che nel plasma.

Saranno necessari futuri studi randomizzati controllati per valutare il razionale di trattamenti potenzialmente di supporto basati sulle variazioni metaboliche rilevate nel tempo di questi pazienti.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. L'asfissia perinatale

L'asfissia perinatale è un'alterazione degli scambi gassosi conseguente ad interruzione del flusso placentare, con sviluppo progressivo di ipossia, ipercapnia e acidosi metabolica fetale in maniera direttamente proporzionale alla gravità e alla durata dell'insulto asfittico [1].

Per identificare il neonato asfittico è necessario rilevare una condizione di acidosi al prelievo cordonale arterioso subito dopo la nascita. Un pH inferiore a 7.00 è tipicamente associato a rischio maggiore di morte o complicanze neurologiche [2], e rappresenta una delle indicazioni ad intraprendere l'ipotermia terapeutica.

### 1.1.1. Epidemiologia

L'asfissia perinatale costituisce ancora oggi una delle principali cause di morte neonatale e di malattia con impatto sulla qualità di vita. Il 23% delle morti neonatali e il 10% delle morti sotto i 5 anni d'età sono il risultato di un insulto asfittico perinatale [3]. Nei paesi sviluppati l'incidenza di asfissia perinatale severa è di circa 1 ogni 1000 nati vivi [4]. Interessa circa 1,15 milioni di neonati all'anno al mondo; nei paesi in via di sviluppo rappresenta una complicanza molto più frequente con un'incidenza, ragionevolmente sottostimata, di 5-10 ogni 1000 nati vivi [4]. In questi paesi l'incidenza, la severità e la mortalità dell'asfissia perinatale sono più alte a causa delle basse condizioni socio-economiche, la bassa scolarizzazione ed educazione sanitaria che rende difficile il riconoscimento dei segnali di pericolo e il difficile accesso alle cure mediche [3].

La maggior parte di neonati esposti a danno severo vanno incontro a morte o sopravvivono con gravi disabilità neurologiche come paralisi cerebrale infantile [5] ed epilessia o presentano un grave ritardo dello sviluppo [6].

Il 20-25% dei neonati asfittici sviluppano un interessamento neurologico definito come encefalopatia ipossico-ischemica (EII) [7].

L'EII, conseguente all'asfissia perinatale, è la prima causa di paralisi cerebrale infantile. I bambini affetti da paralisi cerebrale sviluppano disabilità motorie e cognitive che ne modificano la qualità di vita. Nonostante l'utilizzo di nuove terapie come l'ipotermia, che ha permesso di ridurre l'impatto sociale relativo alle disabilità motorie, i bambini affetti da tale patologia sviluppano, ancora oggi, problemi cognitivi e difficoltà di comunicazione. Questi bambini necessitano quindi di assistenza medica per tutta la vita. Il costo sanitario è sicuramente elevato ma lo è ancora di più il costo intangibile relativo alla qualità di vita del bambino e della sua famiglia nonché il costo indiretto a livello sociale. Le complicanze dell'asfissia hanno un impatto importante per il bambino, la famiglia e la società [8].

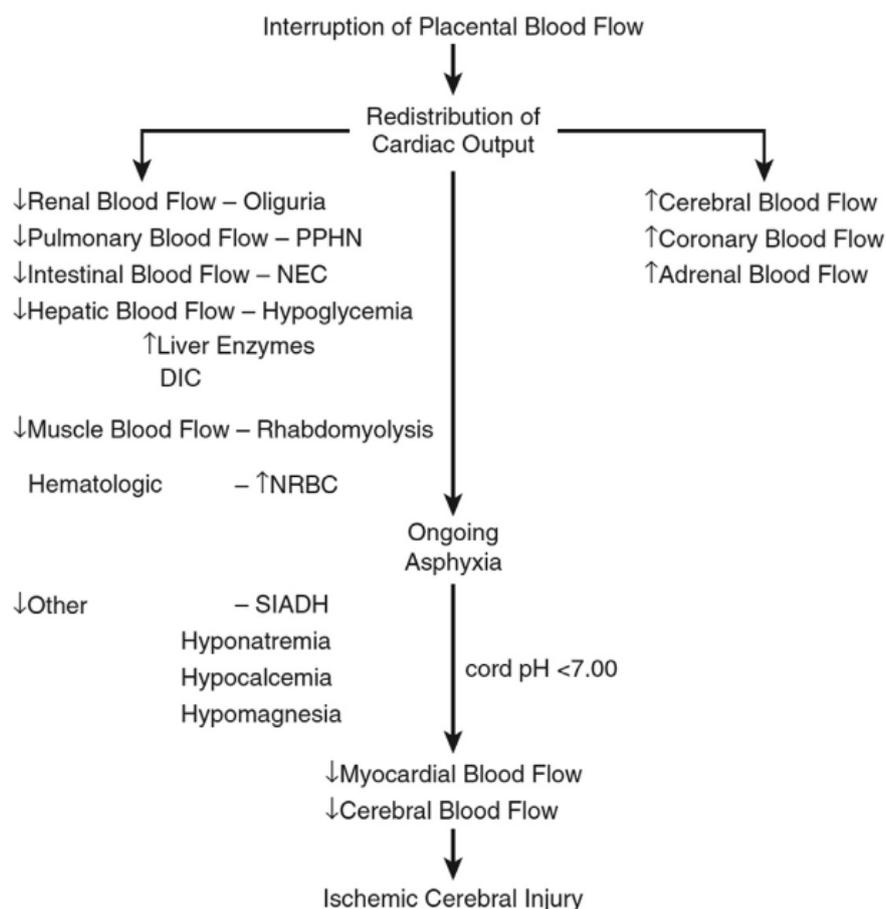
### 1.1.2. Eziopatogenesi

L'insulto ipossico-ischemico può verificarsi nel periodo peri-partum o intra-partum; l'interruzione del flusso ematico placentare è il risultato finale che determina asfissia. I fattori causanti l'interruzione del flusso possono essere di natura materna, placentare, cordonale o neonatale [1].

Table 1 Selected causes of perinatal asphyxia		
Maternal	Placental/Umbilical Cord	Neonatal
Diabetes mellitus	Placental abruption	Airway anomalies
Hypertension	Fetomaternal hemorrhage	Neurologic disorders
Preeclampsia	Umbilical cord compression (prolapse, nuchal cord, knot, etc)	Severe cardiopulmonary disease
Hypotension/shock	Infection/inflammation	Severe circulatory compromise (blood loss)
Uterine rupture	Velamentous cord insertion	Infection
Severe anemia	—	Medication effect
Infection	—	—

**Tabella I.** Cause di asfissia perinatale (da Rinaldi & Perlman 2016).

L'alterazione del flusso placentare attiva una serie di meccanismi adattativi circolatori e metabolici, i primi volti ad una redistribuzione del sangue agli organi vitali, i secondi volti a garantire la vitalità cellulare. La redistribuzione del flusso avviene a favore di miocardio, cervello e surrene ed a discapito di reni, intestino, cute e muscoli. Quando tale meccanismo compensatorio fallisce, si sviluppa ipotensione sistemica ed il trasporto di ossigeno al cervello si riduce lasciando spazio al danno.



**Figura 1.** Meccanismi adattativi e conseguenze sistemiche dell'interruzione del flusso placentare (da Rinaldi & Perlman 2016).

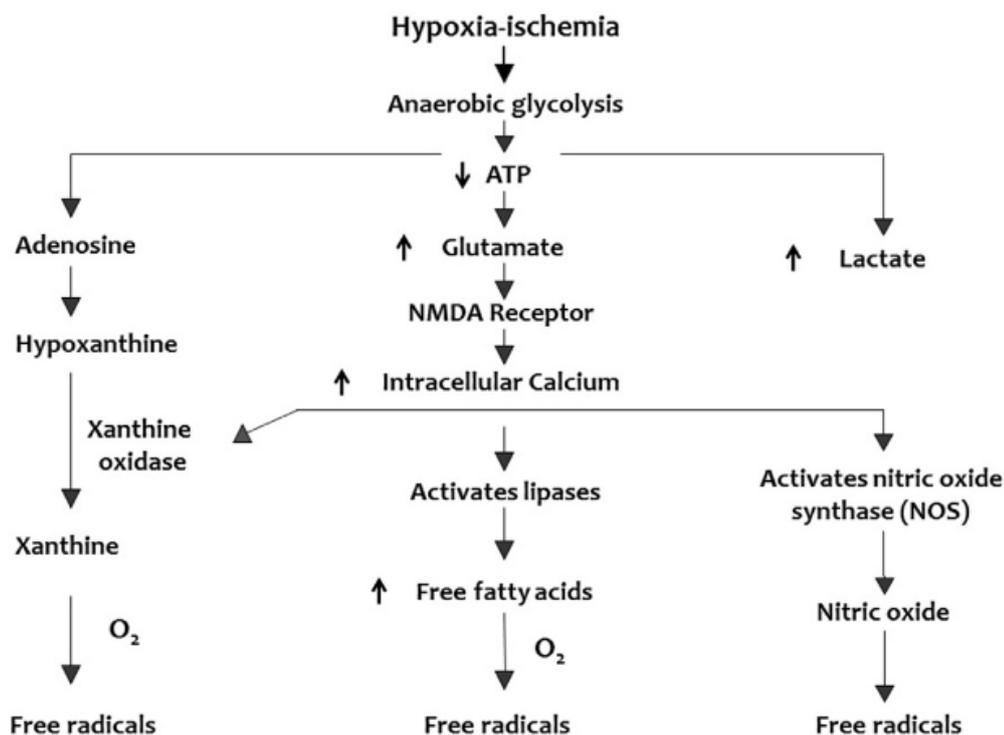
Anche dal punto di vista metabolico sono diversi i meccanismi che cercano di preservare gli organi vitali: il metabolismo cerebrale neonatale, in carenza di ossigeno e glucosio, è in grado di sfruttare substrati energetici diversi come lattato e chetoni; il miocardio è più resistente all'insulto ipossico-ischemico e la curva di dissociazione dell'ossigeno dell'emoglobina fetale, soprattutto in condizioni di acidosi metabolica, favorisce il rilascio di ossigeno a livello tissutale [1].

Quando le richieste di ossigeno da parte del feto non vengono più soddisfatte dall'apporto materno e i meccanismi di compenso falliscono, dapprima si assiste ad ipossiemia ed ipercapnia, successivamente, per far fronte alla carenza di substrato energetico, all'attivazione della glicolisi anaerobia, causando accumulo di acido lattico e diminuzione del pH ematico, configurando una situazione di acidosi metabolica [1].

Alla nascita, il neonato asfittico, presenta tipicamente un pattern respiratorio alterato caratterizzato da un'apnea primaria che si manifesta dapprima con atti respiratori rapidi e poi arresto respiratorio e bradicardia. Successivamente, se non si mettono in atto manovre di supporto, quali intubazione e ventilazione meccanica, sopraggiunge una fase di gasping ed infine di apnea secondaria con bradicardia ed ipotensione che culminerà in exitus a meno di manovre rianimatorie.

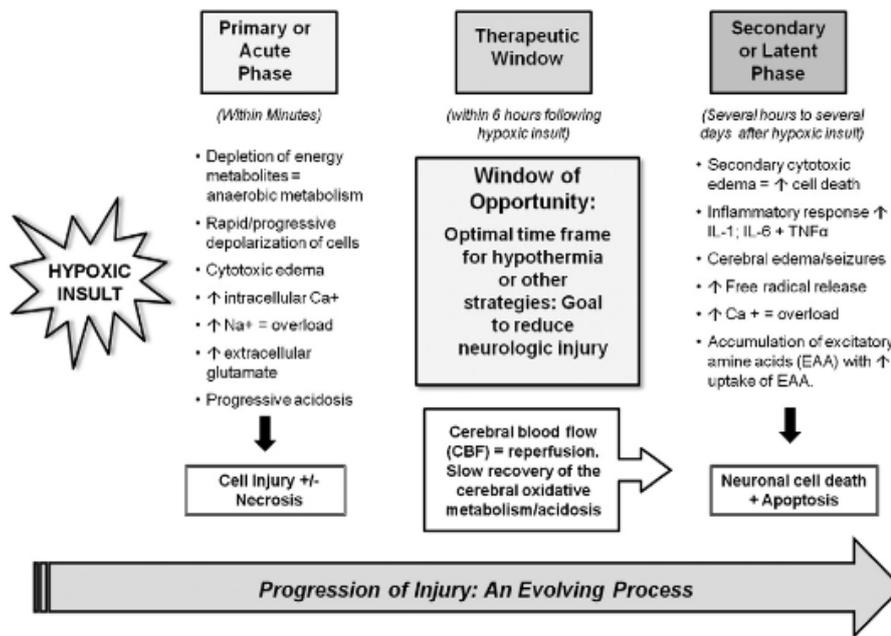
L'evento ipossico-ischemico acuto determina una prima fase di morte neuronale causata da una deplezione di ATP (insufficienza energetica primaria). La carenza di substrati energetici determina perdita dell'omeostasi intracellulare tra cui la mancata funzione della pompa Na/K ATP-dipendente. La depolarizzazione neuronale causa un flusso di sodio e calcio intracellulare; questo crea un gradiente osmotico ed elettrochimico che a sua volta favorisce l'ingresso di cloro e acqua determinando progressivamente edema citotossico e lisi cellulare. La depolarizzazione inoltre causa rilascio di neurotrasmettitori eccitatori come il glutammato che concorre all'influsso di calcio; si verifica inoltre la formazione di radicali

liberi, produzione di ossido nitrico e perossidazione lipidica delle membrane cellulari che esita in distruzione della barriera ematoencefalica e attivazione della risposta infiammatoria.



**Figura 2.** Meccanismi biochimici del danno cerebrale conseguente ad evento ipossico-ischemico (da Rinaldi & Perlman 2016).

In seguito al ripristino del flusso cerebrale, grazie alle manovre rianimatorie, inizia la cosiddetta fase latente della durata di circa 6 ore a cui segue un secondo deficit energetico, tra le 6 e le 48 ore. Questa seconda fase del danno, causata dalla riperfusione, esita in apoptosi cellulare. Durante questa fase si formano specie reattive dell'ossigeno, si deteriora progressivamente la funzione mitocondriale, perdura l'efflusso di neurotrasmettitori eccitatori e aumenta l'edema citotossico; eventuali crisi comiziali compaiono tipicamente in questa fase [9].



**Figura 3.** Fisiopatologia dell'asfissia perinatale (da Newnam 2011).

### 1.1.3. Encefalopatia ipossico-ischemica

L'evento patogenetico più importante conseguente ad un insulto ipossico-ischemico è quindi la riduzione del flusso cerebrale. La sofferenza cerebrale che ad esso può conseguire si manifesta come encefalopatia neonatale. Se l'encefalopatia è attribuibile sicuramente ad un insulto ipossico-ischemico è definibile come encefalopatia ipossico-ischemica (EII) [10]. Quasi la metà dei neonati che sviluppano EII muore nel primo mese di vita, l'EII di grado moderato o severo è gravata da una mortalità compresa tra il 10 ed il 60%; tra i sopravvissuti il 25% sviluppa sequele neurologiche [11] quali la paralisi cerebrale infantile, ritardo mentale, perdita della vista e dell'udito, problemi comportamentali, disturbi dell'apprendimento e convulsioni. Il tipo e la gravità delle complicanze dipende dalla severità dell'insulto ipossico-ischemico e dalle aree cerebrali interessate dal danno.

Lesioni della corteccia sono associate a deficit sul versante cognitivo; l'interessamento della sostanza bianca e della sostanza grigia profonda

(talami e nuclei della base) si associa più spesso ad un outcome avverso composito sia sul versante cognitivo che sulla performance motoria [5].

All'imaging i quadri lesionali più frequenti di EII sono confinati principalmente nei territori di confine arteriosi (cosiddetto pattern di danno "watershed") che nel neonato a termine sono localizzati nelle regioni della corteccia cerebrale periventricolare. Il danno in tali regioni può determinare una leucomalacia periventricolare.

Altre regioni suscettibili al danno ipossico sono i talami, i gangli della base e il tronco encefalico [12].

L'encefalopatia ipossico-ischemica è una delle cause più comunemente riconosciute di paralisi cerebrale infantile (PC) [13].

La PC si definisce come un gruppo di sindromi caratterizzate da compromissione motoria, non progressiva, con una incidenza di 1,5 su 1000. Viene diagnosticata nei primi 18 mesi di vita: i bambini affetti 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 classificata in base al tipo di disturbo motorio in [14]:

- Paralisi cerebrale spastica: la forma più comune di PC, 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.
- Paralisi cerebrale discinetica: avviene del 10-15% dei casi. È caratterizzata da pattern motorio anomalo e da movimenti involontari, incontrollati e ricorrenti.

- Paralisi cerebrale atassica: in meno del 5% dei casi. Determinata da un danno cerebellare, si caratterizza per postura e/o movimenti anomali e dalla perdita della regolare coordinazione muscolare.
- Paralisi cerebrale distonica: rara, è caratterizzata da scarsa attività e da movimenti rigidi (ipocinesia) e ipotonia.
- Paralisi cerebrale coreoatetotica: rara ora che l'iperbilirubinemia è prevenuta e trattata, caratterizzata da movimenti esagerati e violenti (ipercinesia) e ipotonia.

Ad oggi, i requisiti necessari per confermare una relazione causale tra evento acuto intrapartum e paralisi cerebrale secondo l'American Academy of Pediatrics (AAP) [15] e l'American College of Obstetricians and Gynecologists [16] sono:

- indice di Apgar  $\leq 5$  sia a 5' che a 10'. Lo score Apgar è uno score clinico che è utile al clinico come stima dello stato di salute del neonato. Tiene conto di vari parametri quali colorito, frequenza cardiaca, riflessi, tono muscolare e tipo di respirazione. Ad ogni parametro è possibile assegnare un punteggio da 0 a 2, il punteggio totale può quindi essere compreso tra 0 e 10. Il neonato con punteggio tra 7-10 è classificato come normale, con sofferenza di grado intermedio se il punteggio va da 4 a 6 e severamente compromesso con punteggio tra 0 e 3 [17];
- acidosi metabolica riscontrabile all'emogasanalisi eseguita dell'arteria ombelicale con  $\text{pH} < 7$  e  $\text{BE} \geq -12$  mmol/l: si raccomanda il doppio prelievo da arteria e vena ombelicale per avere la certezza della provenienza del campione;
- lesioni al neuroimaging compatibili con EII;
- coinvolgimento multiorgano, variabile in base alla gravità e durata dell'insulto e comprendente: distress respiratorio sino a richiedere intubazione e ventilazione meccanica, ischemica miocardica con scadimento del circolo e necessità di supporto inotropo, insufficienza

renale, aumento degli indici di citolisi epatica, discoagulopatia, danno della mucosa intestinale [18].

Altri fattori suggestivi di asfissia sono:

- sofferenza fetale acuta con evidenza di eventi sentinella quali rottura d'utero, distacco intempestivo di placenta, prolasso del cordone ombelicale, embolia di liquido amniotico, shock materno, trasfusione feto-materna;
- modificazioni al monitoraggio cardiotocografico quali bradicardia fetale, ridotta variabilità, pattern sinusoidale, decelerazioni ripetitive e prolungate;
- assenza di altre condizioni che possano avere contribuito al quadro encefalopatico neonatale.

#### **1.1.4. Gestione del paziente asfittico**

Nella maggior parte dei casi (85%) il neonato alla nascita avvia un respiro spontaneo entro 15 secondi, un 10% risponderà a stimolazione o aspirazione, il 3-5% necessiterà di ventilazione a pressione positiva o intubazione e solo lo 0,1% richiederà rianimazione cardiopolmonare o supporto farmacologico.

L'approccio chiave nella rianimazione è individuare con anticipo l'arrivo di un neonato ad alto rischio così che l'equipe sia pronta alle manovre di stabilizzazione. Il neonato asfittico alla nascita si presenta tipicamente in fase di apnea primaria, nella maggior parte dei casi il riscaldamento e la stimolazione inducono una respirazione spontanea. La determinazione precoce della frequenza cardiaca (FC) è un indicatore di ventilazione efficace, si dovrebbe assistere ad un aumento della FC nel giro di 30 secondi [19]. Nei neonati che tuttavia rimangono depressi (assenza di respiro spontaneo e FC < 100 bpm) l'attuazione di una ventilazione a pressione positiva facilita la ripresa della respirazione e la correzione dell'acidosi [2].

Oltre a garantire una buona ventilazione e perfusione, la gestione del paziente prevede il mantenimento dell'euglicemia ed il controllo delle crisi epilettiche, fattori che, se non controllati, possono ulteriormente favorire il danno cerebrale [20].

I bambini esposti a danno ipossico-ischemico che soddisfano i criteri di inclusione vengono sottoposti ad ipotermia, unico trattamento ad oggi con evidenze di efficacia nel miglioramento dell'outcome. Secondo le raccomandazioni della Società Italiana di Neonatologia, per la complessità del livello assistenziale richiesto, il trattamento ipotermico va effettuato esclusivamente nei reparti di Terapia Intensiva Neonatale (Centri di III livello assistenziale), in particolare è necessario un'assistenza neonatologica h24 e un personale infermieristico dedicato e altamente specializzato [21].

Gli attuali criteri di inclusione per il trattamento ipotermico sono [22]:

1. Età gestazionale di 35 settimane o più, peso neonatale > 1800 gr e meno di 6 ore di vita.
2. Evidenza di asfissia perinatale definita da almeno uno dei seguenti criteri:
  - punteggio di Apgar  $\leq 5$  a 10 minuti di vita;
  - necessità di proseguire la ventilazione con tubo endotracheale o con pallone e maschera a 10 minuti di vita;
  - acidosi metabolica con  $\text{pH} < 7$  o  $\text{BE} \geq 12$  mmol/l nei primi 60 minuti di vita (nel caso di multipli emogas nei primi 60 minuti di vita, considerare quello con i valori più patologici; evitare, se possibile, emogas capillari da tallone)
3. Encefalopatia ipossico-ischemica moderata o severa valutata secondo classificazione di Sarnat&Sarnat [23].
4. Nessuna anomalia cromosomica o malformazione congenita.

Category	Normal (0)	Mild(1)	Moderate (2)	Severe(3)
Level of consciousness	Alert(responsive to external stimuli)	Hyper-alert (responsive to minimal stimuli)	Lethargic	Stupor/Coma
Spontaneous activity	Normal	Normal or decreased	Decreased	None
Posture	Predominantly flexed	Mild flexion of distal joints	Distal flexion or complete extension	Decerebrate
Tone	Strong flexor tone in all extremities	Normal or slightly increased	a. Hypotonia (focal or general)	Flaccid
			b. Hypertonia	Rigid
<b>Primitive reflexes</b>				
Suck	Strong, easily illicit	Weak or Incomplete	Weak or incomplete and/or bite	Absent
Moro	Complete	Intact (low threshold)	Incomplete	Absent
<b>Autonomic Nervous System (ANS)</b>				
Pupils	Normal	Mydriasis	Myosis	Variable or Nonreactive
Heart rate	100–160 bpm	Tachycardia	Bradycardia	Variable
Respirations	Regular respirations	Hyperventilation	Periodic breath	Apnea or need ventilation

**Tabella II.** Sarnat score modificato (da Chalak et al. 2018)

### 1.1.5. L'ipotermia terapeutica

Il danno cerebrale, esito di un insulto ipossico ischemico, si sviluppa in due fasi: la prima che coincide con l'evento acuto e la seconda che inizia circa 6 ore dopo. Il danno neuronale diviene irreversibile all'instaurarsi della seconda fase, c'è quindi una finestra terapeutica di 6 ore per avviare un trattamento che impedisca o rallenti il verificarsi del danno da riperfusione.

L'ipotermia terapeutica (IT) è l'unico trattamento che, ad oggi, si è dimostrato statisticamente significativo e clinicamente rilevante nella riduzione della mortalità, della paralisi cerebrale e del ritardo del neurosviluppo [24,25]. I neonati candidati all'ipotermia devono soddisfare i criteri visti precedentemente. Non ci sono evidenze che il trattamento sia efficace, dopo le sei ore di vita, né al di sotto del limite di età gestazionale e di peso alla nascita per i quali il rapporto rischio-beneficio è a favore di quest'ultimo [26].

Per prevenire il danno secondario e ridurre la perdita neuronale è necessario avviare l'ipotermia terapeutica entro 6 ore dalla nascita, prima che la fase di danno secondario abbia inizio. I metodi utilizzati per l'ipotermia

terapeutica sono due: raffreddamento selettivo del capo, tramite un caschetto, con target di temperatura corporea di 34.5 °C (i target sono riferiti a temperature rettali o esofagee) e l'ipotermia sistemica, su materassino, con target di temperatura corporea rettale di 33.5 °C; non ci sono evidenze che una tecnica sia clinicamente superiore all'altra [24]. Il raggiungimento di temperature inferiori può risultare meno neuroprotettivo o addirittura pericoloso [22]. Dopo 72h di ipotermia il neonato viene riscaldato con incrementi di temperatura di 0.2-0.5°C/ora fino a raggiungere una temperatura corporea di 36.5°C in almeno 4h. I neonati più piccoli o quelli che hanno presentato problematiche maggiori nei primi giorni, possono richiedere un tempo più lungo (oltre le 6-8 ore) per raggiungere la normotermia.

L'ipotermia permette di ridurre il metabolismo cellulare e la cascata di eventi che determinano apoptosi neuronale grazie a vari meccanismi d'azione. Per ogni grado di riduzione della temperatura corporea il metabolismo cellulare si riduce del 5-7% garantendo un ridotto consumo di ossigeno e glucosio che favorisce il mantenimento del deposito di ATP; la riduzione della temperatura di 3-4 °C diminuisce la concentrazione di glutammato e radicali liberi extracellulari ed attenua l'attività del recettore NMDA svolgendo un ruolo protettivo della funzione mitocondriale; sempre per preservare i mitocondri l'ipotermia sopprime l'attivazione della microglia quindi l'infiammazione; infine svolge un probabile ruolo di inibizione della caspasi-3 e upregolazione di bcl-2 sopprimendo il meccanismo apoptotico [9].

Definire i pazienti candidabili all'ipotermia terapeutica, standard of care, per il trattamento in caso di sofferenza feto-neonatale di grado moderato o severo risulta quindi fondamentale per predisporre l'avvio dell'ipotermia secondo le tempistiche raccomandate [27].

La candidabilità del neonato a terapia dipende dall'età gestazionale, dall'evidenza di asfissia perinatale e dallo sviluppo di EII clinica di grado moderato o severo (vedi criteri sopra descritti). Tutt'ora oggetto di

discussione l'utilità dell'ipotermia terapeutica applicata dopo le sei ore di vita, in categorie di pazienti con EII lieve e/o di età gestazionale inferiore alle 35 settimane [21].

La determinazione della gravità clinica dell'EII si rifà alla classificazione di Sarnat&Sarnat che esamina il livello di coscienza, l'attività spontanea, la postura, il tono, i riflessi primitivi di suzione e di Moro e l'attività del SNA (pupille, frequenza cardiaca e tipo di respiro).

La severità e la durata dell'encefalopatia, quindi lo stadio di EII, definiscono i pazienti eleggibili ad ipotermia e correlano strettamente con l'outcome e con la risposta alla terapia. Le rivalutazioni con i criteri Sarnat&Sarnat sono raccomandate ogni 12 ore durante le 72 ore di ipotermia e poi giornalmente [28].

Le problematiche riscontrate nell'applicazione di tali criteri sono principalmente due: la soggettività dell'esame neurologico non permette un'univoca interpretazione del quadro clinico del paziente e conseguentemente l'iter terapeutico è soggetto a variabilità in base all'operatore; in secondo luogo la clinica varia di ora in ora in relazione alla gravità e alla durata della sofferenza ipossica [22]. Il timing con cui si manifestano i sintomi riflette il meccanismo di danno: il cervello viene danneggiato dapprima dall'insulto ipossico-ischemico e in una seconda fase da quello che viene definito danno da ri-perfusione. Esiste quindi una fase di latenza, tra la prima e la seconda fase del danno, che può risultare priva di segni clinici e che precede il manifestarsi di segni neurologici definitivi. Data l'importanza di avviare l'ipotermia nella finestra terapeutica di intervento e le possibili difficoltà riscontrabili nella selezione dei soggetti con EII di grado 2 e 3 di Sarnat è fondamentale affiancare alla valutazione clinica del neonato una serie di esami strumentali che indirizzino la decisione terapeutica.

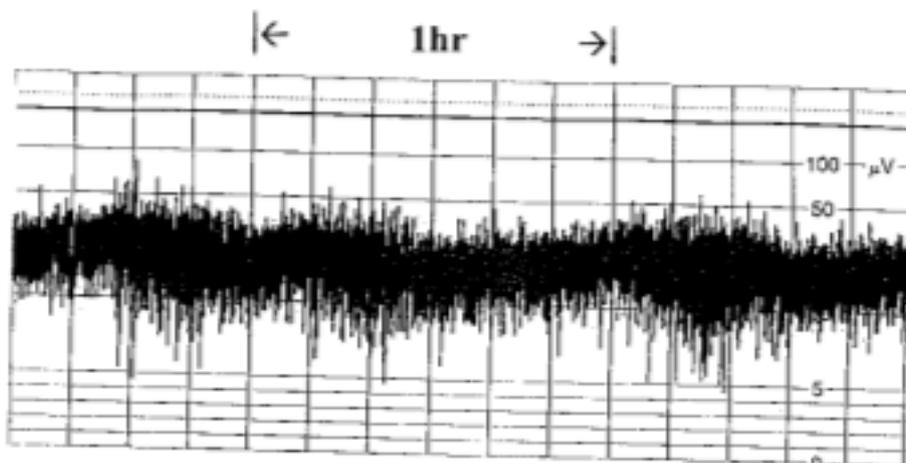
Affiancare alla clinica la registrazione EEG migliora la capacità diagnostica e prognostica; vi sono comunque casi di dissociazione di gravità tra quadro

clinico e tracciato. Nei neonati che soddisfano i criteri di inclusione per IT viene avviata una valutazione EEG mediante videoelettroencefalografia (vEEG) o amplitude-integrated EEG (aEEG anche detto CFM, cerebral function monitor) per almeno 30 minuti possibilmente prima della terapia sedativa/antiepilettica [21]. Il monitoraggio aEEG verrà poi continuato per tutta la durata dell'IT e della fase di riscaldamento. La presenza di crisi epilettiche cliniche o registrate all'elettroencefalografia correla inversamente con l'outcome neurologico [29]. La vEEG rappresenta il gold standard per la diagnosi e il monitoraggio delle crisi epilettiche nel neonato. Vi sono però delle difficoltà pratiche nell'esecuzione dell'esame: la valutazione e il monitoraggio continuo necessitano competenze professionali e strumentazione h24 7 giorni su 7, spesso non presenti in maniera così continuativa, per tale motivo molte terapie intensive neonatali (TIN) in Italia adottano una metodica più semplice, accessibile a tutti i neonatologi adeguatamente formati: l'aEEG. Se il vEEG prevede il posizionamento di elettrodi sullo scalpo in posizioni standardizzate secondo il Sistema Internazionale 10-20, l'aEEG è una metodica di monitoraggio dell'attività elettrica cerebrale che raccoglie il segnale da massimo quattro elettrodi e, tramite un algoritmo, comprime nel tempo le informazioni sull'ampiezza del segnale per generare una traccia aEEG [30]. Se la registrazione vEEG o aEEG mostra pattern patologici suggestivi per Ell, viene avviata l'IT [21]. Il pattern normale aEEG è definito da un tracciato con margine superiore  $> 10 \mu\text{V}$  e margine inferiore  $> 5 \mu\text{V}$  [31].

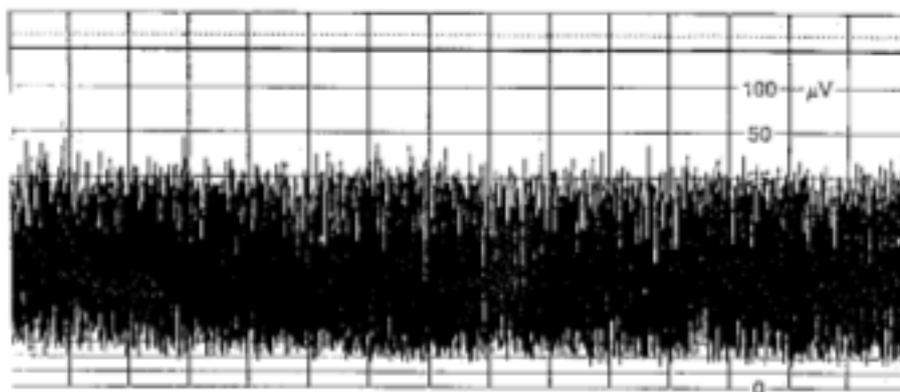
I pattern patologici aEEG che indicano la necessità di avviare l'IT sono [21]:

1. Attività elettrica moderatamente anormale: margine superiore  $> 10 \mu\text{V}$  e margine inferiore  $< 5 \mu\text{V}$  (tracciato discontinuo).
2. Attività elettrica severamente anormale: margine superiore  $< 10 \mu\text{V}$  e margine inferiore  $< 5 \mu\text{V}$ , accompagnata da attività ad alto voltaggio ("burst suppression").

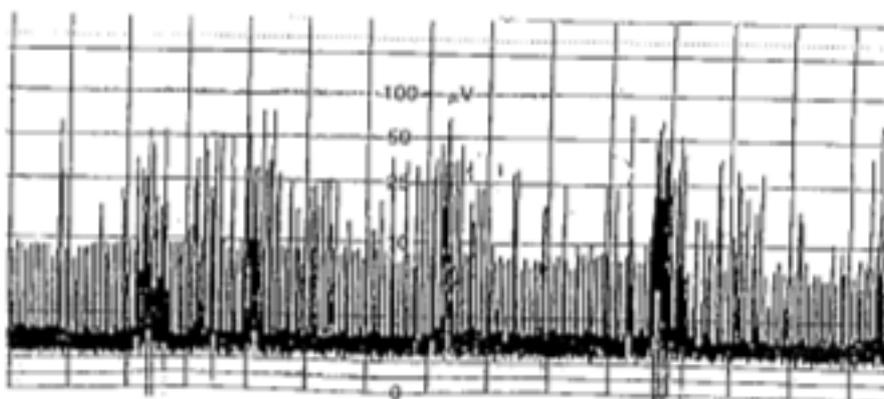
3. Convulsioni: tracciato a dente di sega con voltaggi compresi tra  $10 \mu\text{V}$  e  $40 \mu\text{V}$  che possono associarsi a tutti i casi precedenti, anche ad un tracciato nella norma.



**Figura 4.** Esempio di tracciato aEEG normale per voltaggi e variabilità (da Naqeeb et al. 1999).



**Figura 5.** Esempio di tracciato aEEG discontinuo (da Naqeeb et al. 1999).



**Figura 6.** Esempio di tracciato aEEG tipo burst-suppression (da Naqeeb et al. 1999).

Il neuroimaging gioca un ruolo fondamentale nel determinare la prognosi dei neonati con EII; ad oggi la risonanza magnetica cerebrale (RMc) è il gold standard per definire la severità ed il tipo di danno cerebrale [6]. Per la complessità dell'esame da svolgere in sedazione per il neonato e perché si possano apprezzare dei pattern compatibili con evento ipossico-ischemico perinatale la RMc viene svolta tra il quarto e settimo giorno di vita. La risonanza quindi non è applicabile come criterio per l'avvio dell'ipotermia terapeutica ma è sicuramente fondamentale per il suo ruolo diagnostico e prognostico. Immagini che mostrino lesioni alla sostanza grigia dei nuclei della base e delle aree corticali sono tipiche dell'EII; pattern atipici (eventualmente associati a spettroscopia in base al sospetto diagnostico) indirizzano invece verso un'encefalopatia di altra natura [32,33].

Al momento ancora nessun biomarker viene utilizzato nella pratica clinica a scopo diagnostico e prognostico nei neonati con asfissia perinatale ed EII [34,35].

Durante l'ipotermia terapeutica il neonato necessita di assistenza altamente specialistica h24 che comprende, oltre che il monitoraggio di base come valutazione dei parametri vitali, del peso, della diuresi, anche un controllo continuo della temperatura rettale e cutanea, registrazione EEG continua e monitoraggio della funzionalità e cinetica del miocardio. L'equipe deve inoltre saper identificare e trattare eventuali effetti avversi che sopraggiungono od eventualmente, se necessario, sospendere l'ipotermia. I possibili effetti avversi principali, che possono non essere causati dall'ipotermia in sé quanto dalla disfunzione multiorgano sono: ipotensione, bradicardia sinusale, trombocitopenia, adiponecrosi e disionie, coagulopatie, ipoglicemia, sepsi, ipertensione polmonare. Anche il riscaldamento non è privo di rischi e deve essere attentamente monitorato. Il rischio di emorragia è indotto dall'aumento di temperatura, soprattutto se troppo repentino, che altera il flusso ematico cerebrale; la fase di riscaldamento è particolarmente delicata anche per la possibile insorgenza di convulsioni [22].

Sono state proposte altre terapie neuroprotettive da applicare in associazione o meno all'IT; il loro utilizzo nella pratica clinica richiede però ulteriori evidenze scientifiche a supporto. Sono in corso studi in fase preclinica su agenti quali allopurinolo, melatonina, eritropoietina, topiramato e gas nobili; si ricercano terapie di basso costo, facile disponibilità ed utilizzo per garantire che queste possano avere un'applicabilità globale in modo da abbattere le disparità di trattamento tra paesi sviluppati e quelli in via di sviluppo [36].

### **1.1.6. Prognosi e follow-up**

I dati dei più grandi studi sull'effetto dell'ipotermia terapeutica nei neonati asfittici sono stati analizzati nelle metanalisi di Jacobs et. al nel 2007 [37] e 2013 [24] evidenziando un'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), nel 2014 è stato condotto uno studio con lo scopo di valutare gli outcome a lungo termine in pz di 6 o 7 anni di età [38]. I pazienti trattati con IT presentavano un tasso di sopravvivenza con punteggio QI più elevato. Significativamente più bambini nel gruppo trattato con ipotermia rispetto al gruppo di controllo sono sopravvissuti senza anomalie neurologiche o con tassi notevolmente ridotti di paralisi cerebrale e disabilità moderata o grave.

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 [39–42].

L'ipotermia terapeutica si dimostra quindi essere la miglior terapia ad oggi in grado di ridurre il danno cerebrale migliorando la prognosi dei neonati asfittici, ma numerose rimangono le sequele che compromettono la motricità, la sfera sensoriale cognitiva e comportamentale del neonato.

Non esiste ancora oggi un metodo preciso per definire la prognosi esatta del neonato ma vengono valutati vari items per stimarne la gravità quali il pH cordonale, l'Apgar score, l'aEEG e il Sarnat score [6]. A breve termine le complicanze possono essere, come già sottolineato, il decesso o lo sviluppo di EII accompagnata da convulsioni.

Esistono una serie di complicanze a lungo termine che si sviluppano dopo mesi o anni dalla nascita tra cui la PC, disturbi sensoriali, deficit cognitivi e disturbi del comportamento. Il manifestarsi di tali complicanze viene tenuto sotto stretta osservazione grazie ai protocolli di follow up.

Il follow-up raccomandato dalla Società Italiana di Neonatologia (SIN) per i pazienti asfittici prevede dapprima una valutazione del danno tramite RMN encefalo da eseguire entro i primi 10 giorni e comunque entro il primo mese di vita, successivamente viene programmato un follow-up motorio e neurosensoriale con l'ausilio di scale di sviluppo quali la scala di Griffith o Bayley.

La RMN predice la prognosi dei neonati con asfissia perinatale secondo lo score proposto da Barkovich et al. del 1998 [43]. Lo score è composto da sottocategorie: sono stati valutati sia lo score relativo al coinvolgimento dei gangli della base (BG, Basal Ganglia) sia lo score relativo al coinvolgimento dei già citati territori di confine corticali (corteccia "watershed", W); sono inoltre stati elaborati due score compositi, il primo che tiene conto di alterazioni sia dei gangli della base che delle aree "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. Lo score W invece sembra correlare in modo più preciso con l'outcome a 12 mesi.

Le scale di valutazione dello sviluppo permettono di identificare i soggetti con ritardo neuropsicomotorio e di pianificare al meglio l'intervento.

Score	Finding
<b>Basal ganglia (BG)</b>	
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
<b>Watershed (W)</b>	
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
<b>Basal ganglia/watershed (BG/W)</b>	
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
<b>Summation (S)</b>	
Arithmetic sum of BG and W	
<b>Enhancement (E)</b>	
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 III.** Barkovich Score (da Barkovich et al. 1998).

La scala Bayley è uno degli strumenti maggiormente utilizzati per la valutazione delle competenze sensomotorie e cognitive dei bambini dal primo mese di vita fino all'età di tre anni e mezzo, permette una valutazione completa del bambino in quanto è composta da tre scale: la scala motoria, la scala mentale e la scala di valutazione del comportamento. Le scale di Griffiths sono composte invece da sei sezioni, sono somministrabili tra 0 e 2 anni e tra i 2 e 8 anni. Le sei scale si articolano in locomotoria, personale-sociale, coordinazione udito-linguaggio, coordinazione occhio-mano, performance e ragionamento pratico nella sezione 2-8 anni. L'insieme delle scale fornisce un'età mentale globale e un quoziente di sviluppo globale.

## 1.2. Le scienze “omiche”

Una delle più grandi sfide della medicina moderna è riuscire a migliorare le conoscenze sull'eziologia delle malattie tenendo conto della variabilità genetica e dell'influenza dei fattori ambientali per lo sviluppo di un'assistenza personalizzata. Proprio perché il futuro si baserà sempre di più su una medicina individualizzata a tale proposito stanno svolgendo un ruolo essenziale le scienze “omiche”. Il nome deriva dalle desinenze delle varie scienze biologiche che ne fanno parte quali genomica, trascrittomica, proteomica e metabolomica che studiano rispettivamente genoma, trascrittoma, proteoma e metaboloma; tali scienze non permettono solo una diagnosi precoce ma anche un monitoraggio del paziente. L'utilizzo delle “omic sciences” in medicina non si limita alla disciplina singola ma spesso sfrutta una combinazione di esse che fornisce una visione olistica dello stato salute/malattia del paziente. Questo approccio innovativo permette di identificare nuove molecole che possono fungere da biomarkers diagnostici precoci di malattia, di trattare processi patologici complessi e di stimare in maniera precisa la probabilità che un individuo sviluppi nel corso della sua vita una determinata patologia [44].

Si definiscono “omiche” quelle scienze che utilizzano tecnologie di analisi che permettono di ottenere un numero molto elevato di informazioni nello stesso intervallo di tempo, utili alla descrizione e interpretazione del sistema biologico studiato.

Negli ultimi anni le scienze “omiche” stanno avendo un enorme sviluppo come discipline scientifiche e tecnologie promettenti nella caratterizzazione di numerosi processi fisiopatologici.

La metabolomica è la più recente delle scienze “omiche”.

### 1.2.1. La metabolomica

Il termine metabolomica deriva dal greco e significa “cambiamento”, ed è definita come la misura dinamica della risposta multiparametrica di un organismo vivente alla perturbazione fisiopatologica o variazione genica [45], in altre parole permette di identificare, quantificare e caratterizzare migliaia di metaboliti di basso peso molecolare (<1kDa) fornendoci un’istantanea del metaboloma, ovvero dell’insieme di metaboliti prodotti da un organismo che ne riflettono lo stato fisiologico, patologico o evolutivo [46]. Il metaboloma non è altro che il fenotipo di un paziente che integra informazioni della realtà clinica del paziente, in uno specifico momento e può essere definito per questo dinamico, con informazioni genetiche ed epigenetiche [47].

La metabolomica permette quindi lo studio di un set di metaboliti attraverso l’analisi di cellule, tessuti, organi o liquidi biologici quali urine, plasma, feci, saliva e liquor. L’insieme dei metaboliti rispecchia lo stato di salute o di malattia di un individuo e per questo può essere paragonato ad un’impronta digitale, unica per ogni individuo [47].

Tale tecnologia è da ritenere rivoluzionaria per vari motivi, in primo luogo perché non necessariamente ci deve essere un’ipotesi a priori. L’approccio per l’identificazione dei metaboliti può essere di due tipi: targeted o untargeted. Il primo consiste nello studio di biomarkers specifici ipotizzati a priori, il secondo consiste invece nello studio di tutti i metaboliti rilevabili durante l’analisi senza prima ipotizzare quali siano [48,49]. Lo studio del set di metaboliti permette di rilevare la variabilità interindividuale ma anche quella intraindividuale che può variare fisiologicamente nel tempo, secondo lo stato di sviluppo oppure per processi patologici. Si possono analizzare, a tale scopo, sia campioni raccolti con metodiche invasive (plasma, liquor) che non invasive (urine, saliva, feci). La metabolomica ha quindi un elevato potere diagnostico, permette di individuare cambiamenti che si verificano rapidamente ed è di relativamente facile applicabilità [47].

Nella pratica, per ottenere un set di metaboliti utile prima vi è una fase analitica di determinazione e misurazione dei metaboliti dei campioni biologici raccolti, poi una seconda fase di elaborazione statistica multivariata dei dati ottenuti. I metaboliti vengono poi riordinati da software in maniera gerarchica da quelli che sono più significativi per discriminare, ad esempio, il soggetto sano da quello malato a quelli che lo sono meno. Le metodiche analitiche di rilevamento utilizzate sono la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare ( $^1\text{H}$  RMN) e/o spettroscopia di massa accoppiata alla cromatografia gassosa o liquida (GC-MS e LC-MS). La  $^1\text{H}$  RMN permette di effettuare studi qualitativi e quantitativi di una miscela di metaboliti complessa senza ricorrere alla manipolazione chimica dei campioni. Inoltre la preparazione dei campioni è semplice, i risultati si ottengono velocemente e i campioni possono essere riutilizzati. La spettroscopia di massa invece prevede una preparazione complessa dei campioni che non possono essere riutilizzati ed i tempi di analisi sono molto più lunghi, in particolare la GC-MS permette di misurare prevalentemente molecole volatili mentre la LC-MS consente di misurare anche macromolecole [50].

Sebbene il potenziale di questo campo scientifico sia molto promettente e rappresenti il futuro della medicina di precisione, attualmente le conoscenze riguardanti la metabolomica sono scarse al di fuori dell'ambito della ricerca. L'utilizzo clinico della metabolomica è ancora limitato ma sono sempre di più gli studi riguardanti la sua applicazione in vari ambiti della medicina quali l'oncologia, l'endocrinologia, la reumatologia, la neurologia, la gastroenterologia e la cardiologia. L'analisi metabolomica inoltre risulta particolarmente adatta al campo della pediatria data la relativa semplicità, sicurezza e non invasività dell'approccio [51].

### **1.2.2. La metabolomica e l'asfissia perinatale**

L'asfissia perinatale è una patologia complessa e multifattoriale le cui conseguenze sono ancora difficilmente prevenibili e prevedibili. Nonostante le numerose conoscenze acquisite negli ultimi decenni riguardanti l'asfissia e l'encefalopatia ipossico-ischemica, la stadiazione precisa del danno e della prognosi rimangono ancora oggi una sfida.

L'utilizzo della metabolomica come scienza applicata all'EII dovrebbe consentire di ampliare le conoscenze riguardanti la sua fisiopatologia e di costruire un pannello di metaboliti che permetta di determinare precocemente, caso per caso, la severità dell'encefalopatia e permettere di avviare una terapia personalizzata [34]. L'obiettivo, in particolare, è quello di individuare metaboliti rilevabili entro le prime sei ore di vita, intervallo massimo per decidere se sottoporre il neonato all'ipotermia terapeutica o meno. Negli ultimi decenni i neurobiomarcatori (NB) sono stati oggetto di studi per la valutazione del danno del sistema nervoso centrale [52]. Il NB ideale dovrebbe essere in grado di identificare i casi a rischio, localizzazione, estensione e gravità della malattia e permettere di avviare trattamenti specifici; i NB devono essere misurati con metodi standardizzati, semplici e riproducibili, specifici per la popolazione pediatrica/neonatale, validati per i diversi fluidi biologici; infine i NB dovrebbero consentire il monitoraggio longitudinale della malattia e correlare con le tecniche di neuroimaging come la RMN [53].

Per l'identificazione dei biomarcatori possono essere utilizzati fluidi biologici differenti. Nel contesto dell'EII le misurazioni possono essere effettuate sul plasma o su urina. Le analisi su plasma consentono di acquisire informazioni veloci ed in tempo reale, ma la raccolta del sangue nei neonati può essere difficoltosa da eseguire e relativamente invasiva dato il basso volume totale di sangue. Il sangue del cordone ombelicale è facile da raccogliere ed è disponibile in grandi volumi, 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 completo, perché longitudinale nel tempo [34]. La raccolta di urina appare facile e non invasiva, ma dipende dalla funzione renale del neonato ed in particolare, essendo i neonati con asfissia perinatale spesso oligo-anurici, possono risultare necessarie diverse ore per raccogliere una quantità di campione sufficiente. Questo rappresenta un problema in quanto, come detto, il tempo limite per decidere se sottoporre il neonato ad ipotermia terapeutica è di sei ore dalla nascita.

Negli ultimi anni numerosi lavori scientifici sono apparsi in letteratura riguardo la metabolomica dell'asfissia perinatale. Inizialmente gli studi venivano condotti su modelli animali in cui le variabili genetiche e ambientali sono facilmente controllabili. Successivamente sono comparsi i primi studi condotti su neonati in cui però la variabilità interindividuale impone una numerosità campionaria maggiore.

La maggior parte degli studi sull'uomo utilizza le urine come fluido biologico per eseguire analisi metabolomiche, grazie alla possibilità di raccolta di campioni longitudinali e non invasivi [54]; esistono anche alcuni studi che analizzano le modifiche longitudinali del metaboloma plasmatico durante l'IT [55]. Un ampio numero di metaboliti (amminoacidi e altri acidi organici, composti energetici e legati allo stress ossidativo, intermedi del ciclo dell'acido tricarbossilico [TCA], piruvato, lattato, glucidi, fosfolipidi, creatinina, vitamine e cofattori e molti altri) sono risultati potenzialmente correlati a danno neurologico e EII [56].

Sfortunatamente, gli studi disponibili sono molto eterogenei per quanto riguarda: disegno dello studio, numerosità dei pazienti e tecniche analitiche; ad oggi, la grande quantità di dati metabolomici pubblicati non consente ancora di generare un singolo biomarcatore (o un insieme di biomarcatori) validato che soddisfi le esigenze cliniche.

## 2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Abbiamo condotto uno studio longitudinale monocentrico il cui obiettivo principale era descrivere le modificazioni dinamiche nel tempo del metaboloma urinario e plasmatico in una coorte di neonati asfittici sottoposti ad IT.

Obiettivo secondario dello studio è stato ricercare potenziali corrispondenze tra le modificazioni plasmatiche ed urinarie del metaboloma durante le tre fasi cruciali dell'assistenza al neonato asfittico: la fase pre-ipotermia (T0), durante le 72 ore di IT (IPO) e la fase di post-riscaldamento (PT).

L'analisi delle corrispondenze tra le modificazioni dinamiche del metaboloma urinario e plasmatico nei neonati asfittici sottoposti a IT rappresenta ancora un argomento poco investigato; in particolare, una simile analisi è stata eseguita in passato solo dal gruppo di Piñeiro-Ramos et al [1]. Nel nostro lavoro abbiamo anche considerato una coorte di 22 neonati sani per operare un confronto a T0.







## **3. MATERIALI E METODI**

### **3.1. Disegno dello studio**

Abbiamo condotto uno studio longitudinale monocentrico, arruolando neonati che presentavano asfissia perinatale alla nascita (in base ai criteri clinici, strumentali e laboratoristici precedentemente esposti) e che sono stati sottoposti a trattamento con ipotermia terapeutica.

### **3.2. Popolazione dello studio**

Sono stati arruolati nello studio neonati con più di 35 settimane gestazionali che alla nascita presentavano criteri di asfissia perinatale e sottoposti a IT secondo le linee guida internazionali. I pazienti sono stati ricoverati presso la UTIN del Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova da maggio 2015 ad aprile 2021. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico locale (riferimento 4332/AO/17) ed è stato ottenuto il consenso informato scritto da parte dei genitori prima dell'arruolamento.

I pazienti sono stati classificati per età gestazionale, peso alla nascita, sesso, punteggio di Apgar, tipo di parto, necessità e tipo di rianimazione neonatale, tipo e gravità dell'insufficienza d'organo, punteggio Sarnat a 60 minuti di vita, pH e eccesso di basi (BE) derivati dal sangue del cordone ombelicale alla nascita ed a un'ora di vita. Un gruppo di 22 soggetti sani è stato arruolato come paragone del metaboloma a T0.

### 3.3. Campionamento

I campioni di urina sono stati raccolti attraverso l'utilizzo non invasivo di un batuffolo di cotone sterile posizionato all'interno del pannolino del neonato e controllandone la presenza di urina ogni 30 min. Metodiche invasive di campionamento urinario sono state praticate solo nei neonati che necessitavano di cateterismo per motivi clinici. Sono stati raccolti almeno 2 ml di urina per ogni campione prelevato prima, durante e dopo l'IT. Il batuffolo di cotone veniva cambiato ogni 3 ore se il neonato non urinava o se contaminato da materiale fecale. Una volta ottenuto l'imbibizione del batuffolo di cotone, il campione veniva posto in una siringa, schiacciato con lo stantuffo e così raccolto in un contenitore sterile prelavato con metanolo (MeOH). I campioni sono stati conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino all'analisi metabolomica.

Le urine dei pazienti sani sono state raccolte da neonati del nido, sani ed a termine nei primi tre giorni di vita, con la stessa metodologia non invasiva descritta sopra.

Durante lo studio sono state utilizzate le stesse marche di pannolini e batuffoli di cotone.

I campioni di plasma sono stati raccolti nei medesimi tempi sopra riportati in corso di procedure invasive necessarie per motivi clinici quali posizionamento di catetere venoso ombelicale, catetere arterioso ombelicale, catetere venoso centrale e/o esecuzione di esami ematochimici da prelievo venoso/arterioso. I campioni di sangue intero da 1 ml sono stati immediatamente centrifugati per separarne il plasma che è stato raccolto e conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino all'analisi. Ulteriori campioni di plasma a distanza di tempo variabile (3-11 giorni dall' IT) sono stati raccolti in pazienti che richiedevano un prelievo di sangue a distanza per motivi clinici.

Il plasma del gruppo dei sani è stato raccolto mediante centrifugazione di sangue ottenuto da prelievo capillare attraverso la puntura del tallone in

neonati non asfittici del nido che richiedevano esami del sangue per altri motivi clinici (es. determinazione dell'ematocrito, screening metabolico, controllo della glicemia o della bilirubina). In questi pazienti è stata utilizzata una microprovetta da 100  $\mu$ l per la raccolta del sangue capillare, è stata immediatamente conservata a  $-80^{\circ}\text{C}$  e quindi inviata al laboratorio per l'ulteriore elaborazione.

### **3.4. Analisi metabolomica**

L'analisi è stata eseguita presso il Laboratorio di Spettrometria di Massa e Metabolomica del Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Università di Padova con sede all'Istituto di Ricerca Pediatrica (IRP), Città della Speranza. Il profilo metabolomico untargeted è stato analizzato su campioni di urina mentre i campioni di plasma sono stati studiati con metodi di analisi targeted.

#### **3.4.1. Profilo metabolomico untargeted**

I campioni di urina sono stati scongelati lentamente per una notte a  $+4^{\circ}\text{C}$  e quindi a temperatura ambiente. Ciascun campione è stato agitato e centrifugato a 3600 g per 10 minuti a  $10^{\circ}\text{C}$ , quindi 60  $\mu$ l di surnatante da ciascun campione sono stati trasferiti in una piastra da 384 pozzetti, aggiungendo 240  $\mu$ l di soluzione di acido formico (FA) 0,1% (volume finale 300 $\mu$ L, diluizione 1:5). Tutte le procedure per la preparazione sono state gestite in automatico da un sistema robotizzato di manipolazione dei campioni, Multiprobe II Ex (Perkin Elmer).

Il profilo metabolomico untargeted dei campioni di urina è stato ottenuto in modalità di ionizzazione positiva e negativa tramite un sistema di cromatografia liquida ad alte prestazioni Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) (Waters, Regno Unito) accoppiato ad uno spettrometro di massa ad alta risoluzione "Quadrupole Time-of-Flight

(QToF)”, nello specifico un Synapt G2 HDMS (Waters MS Technologies, Ltd., Manchester, Regno Unito). I parametri del metodo di analisi sono descritti nel lavoro di Mardegan et al. del 2021 [57].

I campioni di controllo qualità (QC) e i campioni di soluzioni standard (Mix) sono stati utilizzati per valutare la riproducibilità e l'accuratezza durante l'analisi ed esaminare il contenuto di metaboliti dei campioni. I QC sono stati preparati da un'aliquota (50µL) 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 tre diversi fattori di diluizione (1:3, 1:5, 1:7).

Il Mix consisteva di nove composti con massa esatta e tempo di ritenzione 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 iniettati a intervalli regolari ogni 15 campioni durante la sequenza, insieme a campioni bianchi (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 randomizzare le iniezioni dei campioni ed evitare qualsiasi classificazione spuria derivante dalla posizione del campione nella sequenza.

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

I dati sono stati elaborati utilizzando il software Progenesis QI (Waters Corporation, Milford, USA) e sono stati generati due dataset, uno per la modalità di ionizzazione positiva (ESI+ dataset) e l'altro per la modalità di ionizzazione negativa (ESI- dataset).

I parametri utilizzati per l'estrazione dei dati sono stati ottimizzati attraverso l'elaborazione preliminare dei campioni QC. Abbiamo impostato un filtro a 0,5 e 0,2 per importare i dati grezzi dei campioni in Progenesis, rispettivamente per la modalità di ionizzazione positiva e negativa, ed un QC

al centro della sequenza come riferimento per l'allineamento automatico di tutte le corse nella sequenza.

La sensibilità dell'algoritmo automatico per il peak picking è stata impostata a 5, in un intervallo cromatografico da 0,4 a 8,0 minuti. Sono state in questo modo generate le cosiddette variabili "rt\_mass" (dove "rt" è il tempo di ritenzione e "mass" è il rapporto massa/carica, m/z del composto chimico).

### **3.4.2. Profilo metabolomico targeted**

#### *Preparazione dei campioni per l'analisi degli amminoacidi, poliammine, acilcarnitine e metaboliti del pathway della kinurenina*

Sono stati miscelati 10 µl di plasma con 10 µl di standard interno per le poliammine (IS), 10 µl di IS per la kinurenina e 100 µl di una miscela di IS per amminoacidi e acilcarnitine con una soluzione di metanolo e 0,1% di acido formico.

La deproteinizzazione del campione e la preparazione per l'analisi di amminoacidi, poliammine e metaboliti della kinurenina sono state condotte come descritto nel precedente lavoro di Mardegan et al. [57].

Per l'analisi delle acilcarnitine, 30 µL di surnatante deproteinizzato sono stati trasferiti su piastra, essiccati sotto flusso di azoto a 30°C e ricostituiti con 60 µL di una miscela MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1.

#### *Preparazione dei campioni ed analisi tramite cromatografia liquida ad ultra prestazioni e spettrometria di massa*

L'analisi è stata effettuata utilizzando uno spettrometro di massa a triplo-quadrupolo Xevo TQ-S, accoppiato a un UPLC Acquity (Waters Milford, MA, USA), interfacciato con una sorgente di ionizzazione elettrospray (ESI). L'ESI è stato utilizzato in modalità a ioni positivi con monitoraggio delle reazioni multiple (MRM). La separazione cromatografica è stata eseguita su

una colonna Waters Acquity UPLC HSS T3 2,1X100 mm 1,8  $\mu$ m (Waters Milford, MA, USA). Fasi mobili e volumi di iniezione specifici sono stati utilizzati per amminoacidi, poliammine e metaboliti della kinurenina, come riportato in Mardegan et al. [57].

Le fasi mobili nell'analisi delle acilcarnitine erano costituite da acqua 0,1% acido formico per la fase A e MeOH: ACN 90:10 0,1% acido formico per la fase B, con volume di iniezione 2 $\mu$ L e il seguente gradiente:

Time(min)	Flow Rate	%A	%B
0	0.5	97	3
1	0.5	97	3
3.5	0.5	70	30
6.5	0.5	5	95
8	0.5	5	95
11	0.5	97	3

**Tabella IV.** Gradiente per l'analisi targeted LC-MS dell'acilcarnitina. Tempo espresso in minuti. Velocità di flusso espressa in  $\mu$ L/min. % fase mobile A (acqua 0,1% acido formico). % fase mobile B (MeOH: ACN 90:10 0,1% acido formico).

### 3.5. Analisi statistica

Le caratteristiche dei soggetti reclutati sono state studiate rispettivamente con il test di Mann-Whitney per i dati continui e mediante il test esatto di Fisher nel caso di dati categoriali.

Lo studio longitudinale prevedeva che lo stesso soggetto fosse campionato prima (fase T0), durante (fase IPO) e dopo (fase PT) l'ipotermia terapeutica. Nell'analisi dei dati sono stati considerati solo i soggetti con almeno un'osservazione in ciascuna fase. Nel caso di più osservazioni all'interno

della stessa fase, è stata considerata la mediana delle osservazioni presenti in quella fase.

I dati sono stati standardizzati prima di eseguirne l'analisi.

L'analisi esplorativa dei dati e il rilevamento dei valori outlier sono stati eseguiti applicando una metodica di Principal Component Analysis (PCA) [58]. Nello specifico, i valori outlier sono stati rilevati dai test T2 e Q di Hotelling considerando le osservazioni nella stessa fase.

L'effetto relativo alla fase sul contenuto di metaboliti di urine e plasma è stato investigato con metodiche uni e multivariate.

L'analisi dati univariata si è basata su una metodica di tipo "linear mixed effects (LME)" controllando la false discovery rate mediante procedura di Benjamini-Hochberg. L'effetto fisso è costituito dalla fase codificata secondo la procedura introdotta per il vettore di probabilità dei dati nella PLS [59] e operando una trasformazione isometrica del vettore stesso, mentre l'effetto random utilizzato per modellizzare la variabilità interindividuale è l'identificatore di ciascun soggetto.

L'analisi dati multivariata si è basata sulla modellizzazione PLS secondo l'approccio descritto in Peila et al. [60]. Specificamente l'effetto interindividuale è stato stimato con metodica LME e rimosso dai dati. Il dataset risultante è stato sottoposto a PLS per evidenziare le strutture latenti associate a quella determinata fase. Dopo una post trasformazione dei dati sono state identificate due variabili latenti. Le variabili rilevanti sono state determinate calcolando il coefficiente di correlazione di Pearson tra le variabili latenti e le variabili misurate. Sono stati applicati test di randomizzazione per stabilire la significatività delle componenti PLS e dei coefficienti di correlazione di Pearson, assumendo un livello di significatività  $\alpha = 0.05$ .

Le variabili rilevanti risultanti sono state annotate utilizzando lo Human Metabolome Database, il METLIN metabolite database e il nostro database interno. Oltre a ciò, i campioni con un'intensità ionica elevata sono stati iniettati in modalità MS/MS per ottenere maggiori informazioni sulla struttura degli ioni studiando i relativi frammenti. Il rapporto massa/carica, il tempo di

ritenzione e i frammenti ionici sono stati comparati con standard commerciali se essi erano disponibili presso il nostro laboratorio.

Queste procedure ci hanno permesso di classificare i metaboliti selezionati con differenti livelli di annotazione, come descritto nel lavoro di Sumner et al. [61]

Il set di metaboliti rilevanti è stato poi sottoposto a over-representation pathway analysis considerando i 99 pathway dello Small Molecule Pathway Database (SMPDB). L'analisi dati è stata eseguita utilizzando la piattaforma R 4.0.4 (R Foundation for Statistical Computing) e l' over-representation pathway analysis utilizzando Metaboanalyst 5.0 ([www.metaboanalyst.ca](http://www.metaboanalyst.ca)).

## 4. RISULTATI

### 4.1. Caratteristiche della popolazione

Dei 53 pazienti reclutati nello studio è stato possibile raccogliere campioni di urine prima (T0), durante (IPO) e dopo (PT) l'IT per 12 pazienti; è stato ottenuto un campione di plasma prima, durante e dopo l'IT per 19 pazienti. Sono stati inoltre inclusi 22 neonati sani appaiati per età gestazionale, sesso, peso alla nascita e tipo di parto per eseguire un paragone del metaboloma a T0.

La tabella V riassume le caratteristiche principali dei due gruppi studiati, non sono state rilevate differenze per la distribuzione di età gestazionale, sesso, peso alla nascita e tipo di parto tra casi e neonati sani assumendo come livello di significatività  $\alpha=0.05$ .

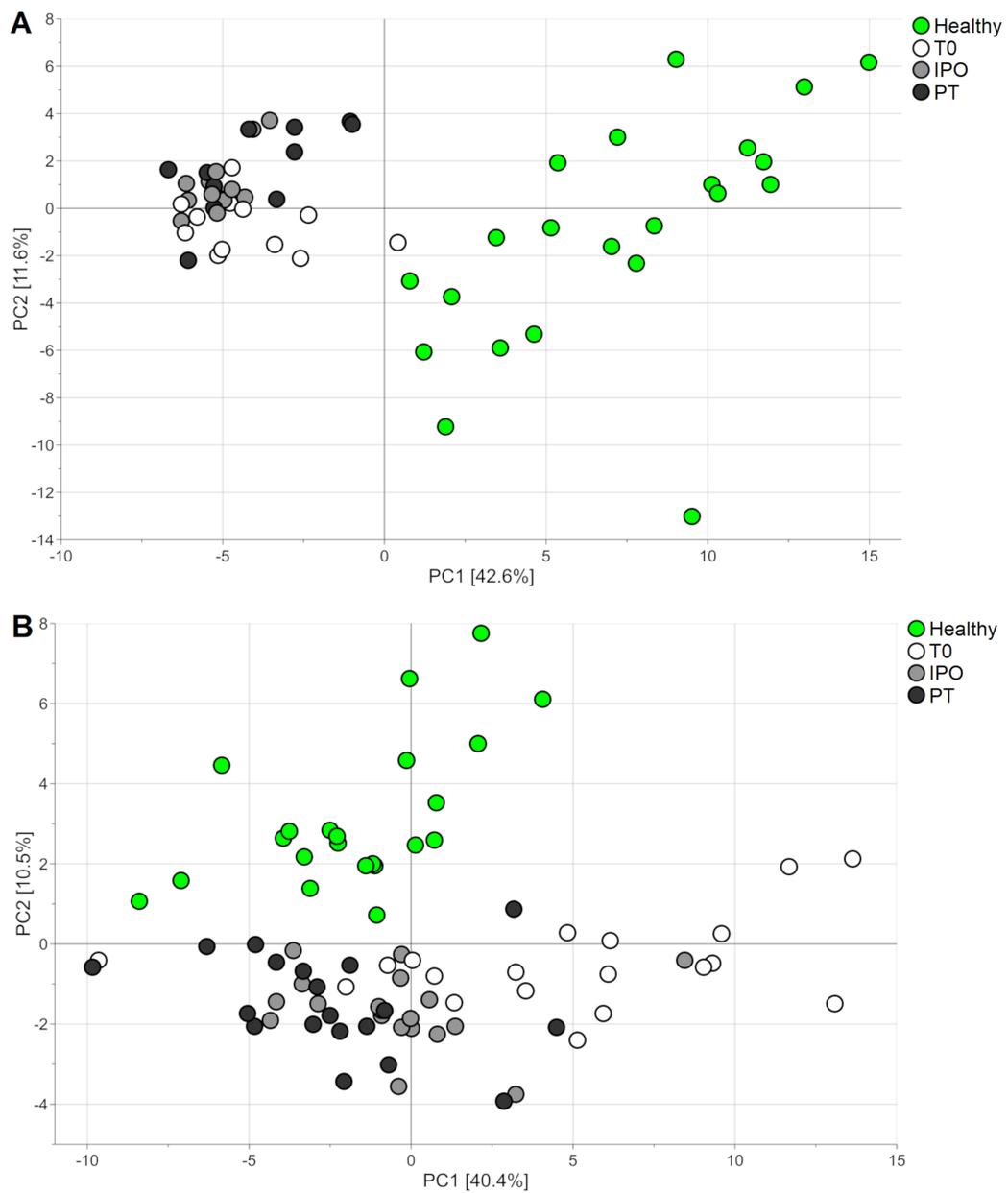
characteristic	cases (urine) N=12	cases (plasma) N=19	healthy subjects N=22
Sex, male (female)	8 (4)	11 (8)	11 (11)
Gestational age median [range] days	277 [243;292]	280 [243;289]	273 [259;286]
Birth weight median [range] g	3240 [2500;4134]	3025 [2170;4250]	3340 [2220;4150]
Delivery mode, vaginal (caesarean section)	7 (5)	10 (9)	8 (14)
SARNAT 60 min median [range]	2 [1;3]	2 [1;3]	0 [0]
Apgar 1 min median [range]	3 [1;9]	3.5 [0;9]	8 [7;9]
Apgar 5 min median [range]	5.5 [2;8]	6 [1;10]	9 [8;10]
Apgar 10 min median [range]	7 [4;9]	7 [2;9]	10 [9;10]
Hypoglycemia at birth, yes (no)	3 (9)	3 (16)	1 (21)
pH median [range]	6.9 [6.8;7.1]	7.0 [6.8;7.3]	7.25 [7.20;7.44]
BE median [range]	-15.6 [-21.5;-7.5]	-14.2 [-20.4;-7.9]	-4.7 [-2.0;-13.7]
pH at 1 h median [range]	7.1 [7.0;7.2]	7.2 [6.9;7.3]	
EB at 1 h median [range]	-16.4 [-22.7;-8.5]	-13.7 [-21.9;-7.0]	

**Tabella V.** Caratteristiche dei due gruppi studiati.

## 4.2. Analisi metabolomica untargeted dei campioni di urina

Dopo la pre-elaborazione dei dati untargeted ottenuti dai campioni di urina è stato generato un dataset di 1791 variabili e 36 osservazioni. Non sono stati rilevati valori outlier assumendo un livello di significatività  $\alpha=0.05$ . L'annotazione delle variabili ha permesso di identificare 96 metaboliti urinari annotati a livello 1. Di seguito sono riportati i risultati dell'analisi sul dataset dei metaboliti annotati.

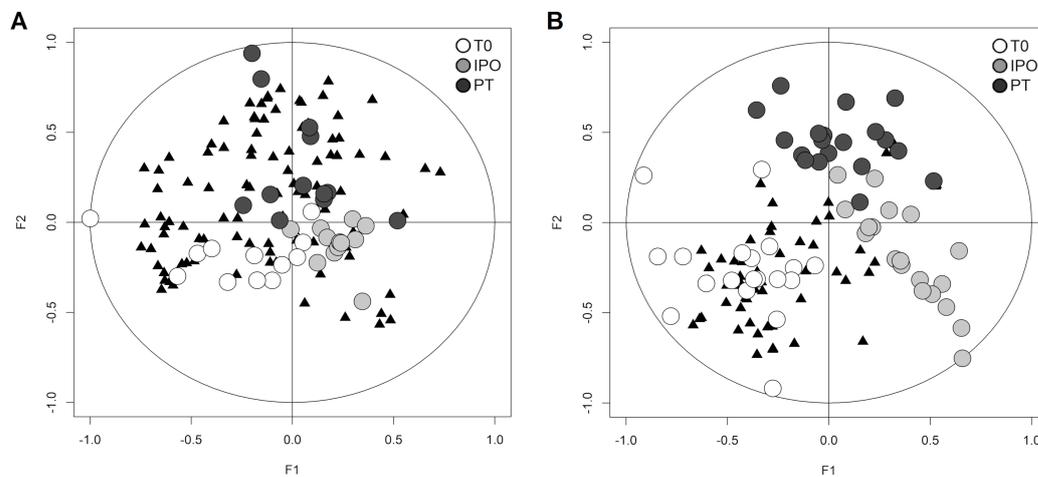
Lo score scatter plot del modello PCA ( $R^2 = 0.542$  e  $Q^2 = 0.45$ ) relativo è riportato in figura 7. Si può notare come i campioni dei soggetti sani e quelli dei casi occupino regioni diverse dello spazio descritto dalle due componenti del modello dimostrando che il metaboloma urinario è differente, tra pazienti sani e pazienti sottoposti ad IT, indipendentemente dalla fase.



**Figura 7.** Score scatter plots dei modelli PCA. Analisi metabolomica untargeted di campioni di urina ( riquadro A) e analisi metabolomica targeted di campioni di plasma ( riquadro B). I campioni dei casi sono riportati come cerchi usando un codice colore che rappresenta la fase (T0: cerchi bianchi, IPO: cerchi grigio chiaro, PT: cerchi grigio scuro) mentre in verde sono indicati i campioni dei soggetti sani.

Osservando l'analisi univariata dei casi, basata su LME assumendo  $\delta=0.05$ , sono stati identificati 23 metaboliti che variano il loro livello nelle tre fasi.

L'analisi multivariata basata su PLS ha generato un modello che spiega il 50% della varianza totale della fase a fattore fisso. Il biplot del modello è riportato in figura 8. La rappresentazione dei dati fornita dalle due variabili latenti F1 e F2 mostra una disposizione a clusters in cui i campioni della stessa fase si distribuiscono nella stessa regione del grafico dimostrando che il metaboloma urinario è fase specifico. Inoltre, sono stati identificati come rilevanti 23 metaboliti.



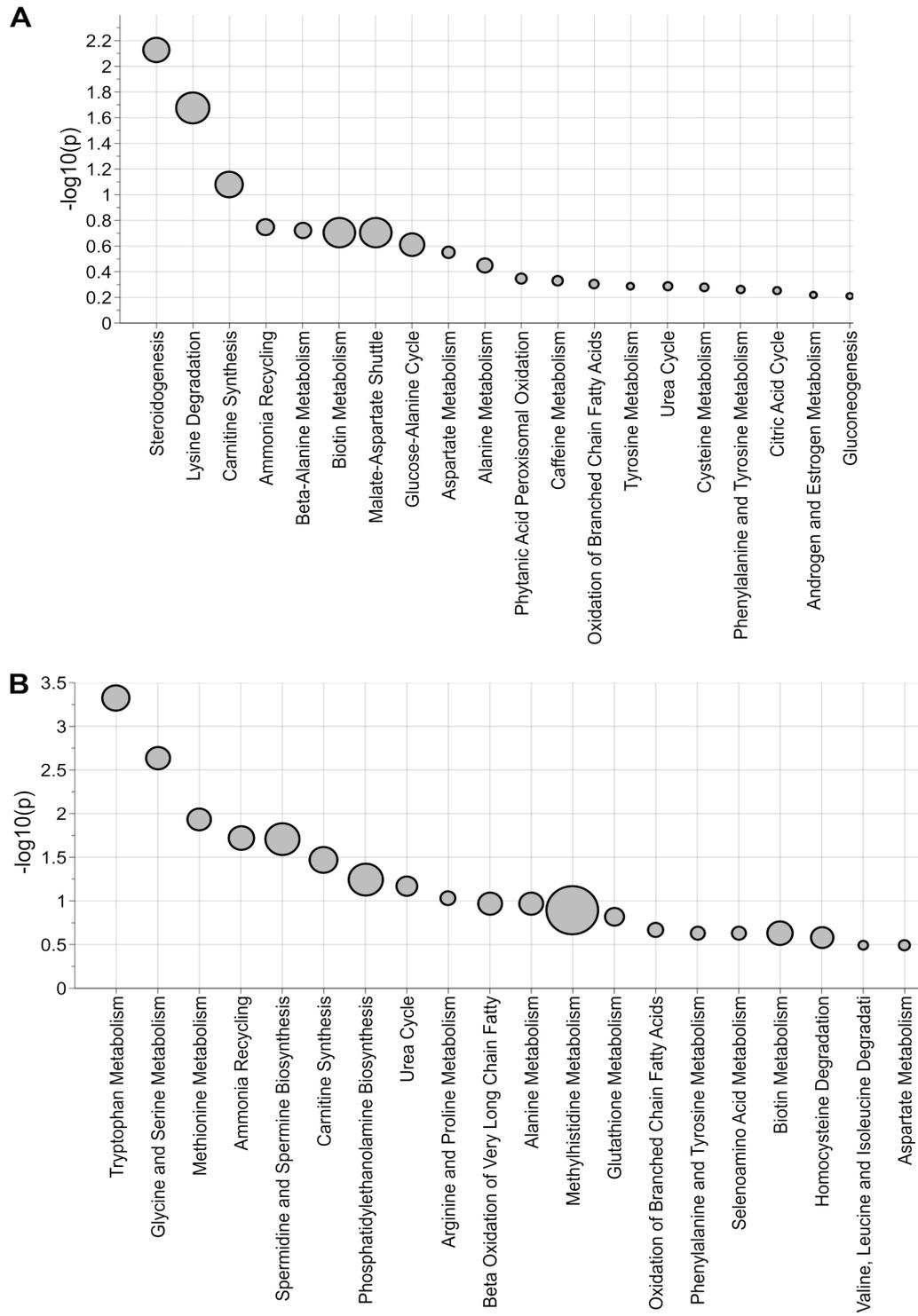
**Figura 8.** Biplot dei modelli PLS. Analisi metabolomica untargeted di campioni di urina (pannello A) e analisi metabolomica targeted di campioni di plasma (pannello B); i campioni sono riportati come cerchi (T0: cerchi bianchi, IPO: cerchi grigio chiaro, PT: cerchi grigio scuro) e le variabili come triangoli neri.

Dai risultati derivanti dall'analisi univariata e multivariata dei dati, 31 metaboliti sono risultati rilevanti nel descrivere i cambiamenti del metaboloma urinario nelle tre fasi studiate. Nella tabella VI sono riportati i metaboliti rilevanti ed il loro comportamento in termini di fold changes (FC).

annotation	HMDB	m/z	Rt	FC[IPO/T0]	FC[PT/T0]
p-Hydroxyphenylacetic acid	HMDB0000020	151.0397	3.322	3.74	4.60
Aldosterone	HMDB0000037	361.2020	5.759	0.53	0.83
Glycolic acid	HMDB0000115	75.0077	0.613	3.88	3.16
Glycocholic acid	HMDB0000138	466.3169	6.619	1.49	2.32
L-Histidine	HMDB0000177	110.0723	0.661	2.49	5.92
L-Lysine	HMDB0000182	130.0873	0.523	0.91	0.25
L-Cystine	HMDB0000192	241.0311	0.591	1.66	2.05
Oxoglutaric acid	HMDB0000208	145.0136	0.784	1.31	2.85
Pregnenolone	HMDB0000253	299.2379	6.443	0.61	0.46
Pyroglutamic acid	HMDB0000267	130.0509	0.982	0.88	1.36
17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolone	HMDB0000363	509.2751	6.442	0.77	0.49
5-Hydroxymethyluracil	HMDB0000469	125.0353	0.773	1.91	2.22
Amino adipic acid	HMDB0000510	144.0665	0.656	1.99	2.39
Gamma-Butyrolactone	HMDB0000549	85.0286	0.613	2.15	2.03
Homocitrulline	HMDB0000679	190.1198	0.843	1.05	0.81
L-Kynurenine	HMDB0000684	192.0666	1.912	1.04	2.05
Kynurenic acid	HMDB0000715	190.0509	3.589	0.67	0.93
Pseudouridine	HMDB0000767	245.0778	0.773	1.22	1.36
L-Octanoylcarnitine	HMDB0000791	288.2175	5.241	1.47	1.31
N-Acetyl-L-aspartic acid	HMDB0000812	174.0401	0.832	1.51	3.02
N-Acetyl-L-tyrosine	HMDB0000866	222.0767	3.263	1.74	3.36
Tetrahydrodeoxycorticosterone	HMDB0000879	317.2484	6.432	0.62	0.42
N-Acetylglutamic acid	HMDB0001138	188.0558	1.046	1.12	1.74
Butyrylcarnitine	HMDB0002013	232.1555	2.403	0.43	0.37
1-Methyluric acid	HMDB0003099	181.0362	1.869	0.75	0.33
Cortolone	HMDB0003128	331.2273	6.069	0.56	0.66
21-Deoxycortisol	HMDB0004030	347.2219	5.829	0.73	0.83
7 $\alpha$ -Hydroxydehydroepiandrosterone	HMDB0004611	271.2063	6.229	1.13	1.35
3 $\alpha$ ,21-Dihydroxy-5 $\beta$ -pregnane-11,20-dione	HMDB0006755	349.2368	5.930	0.89	0.92
N-Acetylvaline	HMDB0011757	158.0818	3.360	1.04	1.32
Isovalerylcarnitine	HMDB0000688	246.1710	3.231	1.52	1.72

**Tabella VI.** Analisi metabolomica untargeted dei campioni di urina: metaboliti rilevanti nel descrivere i cambiamenti del metaboloma urinario nelle tre fasi studiate (T0, IPO e PT); annotation indica il nome del metabolita, HMDB l'identificatore Human Metabolome DataBase, m/z il rapporto massa/carica, Rt il tempo di ritenzione del picco cromatografico, FC[IPO/T0] fold change calcolato come rapporto tra la mediana della variabile durante l'ipotermia terapeutica e la mediana della stessa variabile prima dell'ipotermia terapeutica, FC[PT/T0] fold change calcolato come rapporto tra la mediana della variabile dopo l'ipotermia terapeutica e la mediana della stessa variabile prima dell'ipotermia terapeutica; nel calcolo del FC l'effetto casuale dovuto alle differenze individuali è stato rimosso dai dati; un FC>1 indica un aumento della concentrazione del metabolita rispetto a T0; un FC<1 indica un abbassamento della concentrazione del metabolita rispetto a T0.

Il set di metaboliti rilevanti sono stati investigati mediante over-representation pathway analysis al fine di evidenziare quali pathway metaboliche venissero perturbate durante le tre fasi. I risultati dell'analisi ottenuti sono riportati in figura 9. In particolare, tre pathway relative a steroidogenesi, degradazione della lisina e sintesi della carnitina hanno presentato  $p < 0.10$ .



**Figura 9.** Over-representation pathway analysis: analisi metabolomica untargeted di campioni di urina ( riquadro A) e analisi metabolomica targeted di campioni di plasma ( riquadro B); le pathway sono riportati in base al loro logaritmo negativo di p ( $-\log_{10}(p)$ ) utilizzando una dimensione del simbolo proporzionale al loro rapporto di arricchimento.

### 4.3. Analisi metabolomica targeted dei campioni di plasma

L'analisi metabolomica targeted dei campioni di plasma ha generato un dataset composto da 60 variabili e 57 osservazioni. Non sono stati rilevati valori outlier assumendo un livello di significatività  $\alpha=0.05$ . Il modello PCA ( $R^2=0.509$ ,  $Q^2=0.416$ ) ha generato lo score scatter plot riportato nella figura 7B. Come nel caso dei campioni di urina, i campioni dei neonati asfittici e quelli dei casi sani sono distribuiti in due regioni diverse del grafico dimostrando che il metaboloma plasmatico è diverso tra soggetti sani e pazienti, indipendentemente dalla fase. Si può inoltre osservare che con l'avanzare del trattamento la regione spaziale occupata dai pazienti tende progressivamente ad avvicinarsi alla regione spaziale occupata dai sani.

Osservando l'analisi univariata dei casi, basata su LME assumendo  $\delta=0.01$ , sono stati identificati 33 metaboliti che variano il loro livello nelle tre fasi. L'analisi PLS ha generato un modello in grado di spiegare il 69% della varianza totale della fase a fattore fisso. Il biplot del modello è riportato in figura 8B.

Considerando le due variabili latenti F1 e F2, i campioni raccolti nella stessa fase si distribuiscono nella stessa regione del grafico dimostrando che la fase influenza il metaboloma plasmatico. Inoltre, 16 metaboliti sono stati identificati come rilevanti.

Dai risultati derivanti dall'analisi univariata e multivariata dei dati, 34 metaboliti sono risultati rilevanti nel descrivere i cambiamenti del metaboloma plasmatico prima, durante e dopo l'IT. Nella tabella VII sono riportati i metaboliti rilevanti ed il loro comportamento in termini di fold changes (FC).

name	HMDBID	FC[IPO/T0]	FC[PT/T0]
L-carnitine	HMDB0000062	0.91	0.54
Glycine	HMDB0000123	0.91	0.69
Ethanolamine	HMDB0000149	0.56	0.38
Tyrosine	HMDB0000158	0.51	0.44
Phenylalanine	HMDB0000159	0.67	0.57
Alanine	HMDB0000161	0.35	0.24
Proline	HMDB0000162	0.51	0.35
Threonine	HMDB0000167	0.56	0.62
Asparagine	HMDB0000168	0.81	0.63
Isoleucine	HMDB0000172	0.66	0.63
Histidine	HMDB0000177	0.70	0.55
Lysine	HMDB0000182	0.61	0.46
Serine	HMDB0000187	0.92	0.70
Cystine	HMDB0000192	0.84	0.81
Indole acetic acid	HMDB0000197	1.80	1.90
Acetylcarnitine	HMDB0000201	0.62	0.31
Ornithine	HMDB0000214	0.41	0.41
Quinolinic acid	HMDB0000232	0.43	0.40
Taurine	HMDB0000251	0.20	0.08
Sarcosine	HMDB0000271	0.84	0.63
2-aminobutyric acid	HMDB0000452	0.56	0.23
Decanoylcarnitine	HMDB0000651	1.03	0.44
Homoarginine	HMDB0000670	0.58	0.20
Kynurenine	HMDB0000684	0.61	0.66
Leucine	HMDB0000687	0.55	0.60
Methionine	HMDB0000696	0.59	0.41
Kynurenic acid	HMDB0000715	0.35	0.27
5-hydroxyindoleacetic acid	HMDB0000763	0.94	0.93
Xanthurenic acid	HMDB0000881	0.54	0.46
Valine	HMDB0000883	0.49	0.55
Citrulline	HMDB0000904	0.56	0.47
Tryptophane	HMDB0000929	0.66	0.63
Putrescine	HMDB0001414	1.50	3.05
ADMA	HMDB0001539	0.65	0.54

**Tabella VII.** Analisi metabolomica targeted dei campioni di plasma: metaboliti rilevanti nella descrizione dei cambiamenti del metaboloma plasmatico nelle tre fasi studiate (T0, IPO e PT); name indica il nome del metabolita, HMDB l'identificatore Human Metabolome DataBase, FC[IPO/T0] la fold change calcolata come rapporto tra la mediana della variabile durante l'ipotermia terapeutica e la mediana della stessa variabile prima dell'ipotermia terapeutica, FC[PT/T0] fold change calcolato come rapporto tra la mediana della variabile dopo l'ipotermia terapeutica e la mediana della stessa variabile prima dell'ipotermia terapeutica; nel calcolo FC, l'effetto casuale dovuto alle differenze individuali è stato rimosso dai dati; un FC>1 indica un aumento della concentrazione del metabolita rispetto a T0; una FC<1 indica un abbassamento della concentrazione del metabolita rispetto a T0.

Il set di metaboliti rilevanti è stato investigato mediante over-representation pathway analysis. Nella figura 9B sono riportati la significatività e il rapporto di arricchimento dei pathway con almeno un metabolita. Le vie identificate come metabolismo del triptofano, metabolismo della glicina e della serina, metabolismo della metionina, riciclo dell'ammoniaca, biosintesi della spermidina e della spermina e biosintesi della carnitina hanno mostrato  $p < 0.05$ .

## 5. DISCUSSIONE

La nostra analisi ha evidenziato significative modifiche del metaboloma urinario e plasmatico nel tempo in neonati asfittici sottoposti ad ipotermia terapeutica. In figura 7 è evidente come sia i campioni di urina che quelli di plasma dei casi tendono a raggrupparsi occupando una regione del grafico differente rispetto a quelli dei soggetti sani. Questa importante differenza nel metaboloma tra i campioni asfittici ed i campioni dei neonati sani rende ragione dell'enorme potenziale della metabolomica nella caratterizzazione di condizioni cliniche molto diverse. Anche lo studio di Locci et. al [54] 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.

I campioni dei soggetti sani mostrano una distribuzione nel grafico più disseminata rispetto ai casi, a conferma della maggiore eterogeneità del metaboloma dei soggetti sani rispetto a quello dei malati, come già evidenziato da un studio precedente dello stesso gruppo [57].

La figura 8 mostra che sia i campioni di urina che quelli di plasma tendono a raggrupparsi occupando regioni spaziali diverse in ciascuna fase analizzata (T0, IPO, PT), suggerendo un chiaro shift metabolico nel tempo; questo comportamento è evidente anche nella figura 7B dove i campioni plasmatici dei casi tendono ad avvicinarsi nel tempo alla stessa regione spaziale occupata dai soggetti sani. Quest'ultima osservazione suggerisce un ruolo neuroprotettivo dell'IT, probabilmente potenziato da meccanismi endogeni di riparazione del danno dipendenti dal tempo, precedentemente dimostrati in modelli animali [62].

I campioni della fase IPO si raggruppano visivamente ancora più vicini l'uno all'altro rispetto ai campioni delle altre fasi, tale distribuzione è probabilmente attribuibile all'effetto del trattamento ipotermico: l'IT tende a

“comprimere” il metaboloma patologico dei neonati con Ell nel tentativo di ripristinare il metabolismo fisiologico come già era stato osservato in lavori precedenti [56,145].

Questo comportamento del metaboloma nella fase di ipotermia (IPO), particolarmente evidente dalle analisi sui campioni di urine, era stato descritto anche nello studio di Piñeiro-Ramos et al. [56] dove il metaboloma urinario dei soggetti reclutati ha mostrato una variabilità importante nella fase pre-ipotermia, variabilità che però è quasi del tutto scomparsa durante la fase di ipotermia e ricomparsa 24 ore dopo la fine del trattamento.

### **5.1. Analisi metabolomica untargeted**

L'analisi metabolomica untargeted dei campioni di urina ha evidenziato 31 metaboliti (tabella VI) come rilevanti nella descrizione dei cambiamenti del metaboloma urinario nelle tre fasi studiate (T0, IPO e PT).

Le classi di composti più rappresentate in questo insieme di metaboliti sono gli amminoacidi (9), gli steroidi (8), i derivati della carnitina (3) e gli intermedi del metabolismo del triptofano (2).

Il comportamento degli amminoacidi urinari nel tempo è piuttosto variabile: L-istidina, L-cistina, acido N-acetil-L-aspartico, N-acetil-L-tirosina, acido N-acetilglutammico e N-acetilvalina hanno mostrato un aumento persistente nel tempo; al contrario, la L-Lisina diminuisce costantemente nelle tre fasi; infine, l'acido piroglutammico e l'omocitrullina hanno mostrato un andamento instabile nel tempo.

Per quanto riguarda gli steroidi, tutti diminuiscono nel tempo, ad eccezione del 7 $\alpha$ -idrossideidroepiandrosterone che ha mostrato un aumento costante dalla fase T0 alla fase IPO e dalla fase IPO alla fase PT.

Per quanto riguarda i derivati della carnitina, la L-ottanoilcarnitina e la isovalerilcarnitina hanno mostrato un progressivo aumento nelle fasi T0, IPO e PT; al contrario, la butirrilcarnitina ha mostrato una diminuzione costante nel tempo.

Anche gli intermedi del metabolismo del triptofano hanno andamenti eterogenei nel tempo: la L-kinurenina aumenta costantemente nel tempo, mentre l'acido kinurenico mostra una diminuzione costante.

## **5.2. Analisi metabolomica targeted**

Le analisi targeted sui campioni di plasma hanno evidenziato una serie di 34 metaboliti rilevanti (tabella VII) per spiegare l'evoluzione del metaboloma plasmatico attraverso T0, IPO e PT.

Di questi, la stragrande maggioranza sono amminoacidi (23); sono rappresentati poi gli intermedi del metabolismo del triptofano (5) ed i derivati della carnitina (3).

Tutti gli amminoacidi hanno mostrato una diminuzione persistente tra T0, IPO e PT, così come gli intermedi del metabolismo del triptofano con l'eccezione dell'acido indolo acetico, che è aumentato nelle tre fasi. Anche i derivati della carnitina hanno mostrato una diminuzione nel tempo piuttosto omogenea.

Come l'acido indolo acetico, la putrescina (un precursore della spermidina) ha mostrato un aumento persistente dalla fase T0 verso la fase PT.

Considerati nel loro insieme, i metaboliti plasmatici rilevanti hanno mostrato un comportamento molto più omogeneo in termini di andamento nel tempo rispetto ai loro omologhi urinari.

## **5.3. Analisi dei pathway**

L'analisi metabolomica dei campioni raccolti prima (T0), durante (IPO) e dopo (PT) l'ipotermia, analizzati tramite la combinazione delle analisi univariata e multivariata ha permesso di evidenziare come rilevanti 31 metaboliti urinari e 34 metaboliti plasmatici.

Per studiare ulteriormente queste variazioni di metaboliti nel tempo sono state condotte delle pathway analysis. L'analisi dei pathway mira a

ricondurre ogni metabolita alterato della lista, apparentemente disgiunto l'uno dall'altro, alle relative vie metaboliche, questo ha permesso di evidenziare le principali vie metaboliche alterate a livello urinario nel paziente asfittico e ha posto le basi per l'analisi metabolomica targeted su plasma da cui si sono evidenziate interessanti corrispondenze ed alcune novità.

Nei campioni di urina è stato possibile evidenziare un chiaro impatto dell'asfissia perinatale nelle vie metaboliche di steroidogenesi, degradazione della lisina e sintesi della carnitina ( $\beta$ -ossidazione); le analisi eseguite sui campioni di plasma invece hanno messo in luce come vie metaboliche significativamente alterate nell'asfissia perinatale siano quelle relative al metabolismo del triptofano, metabolismo della glicina e della serina, metabolismo della metionina, riciclo dell'ammoniaca, biosintesi di spermina e spermidina e, ancora, sintesi della carnitina ( $\beta$ -ossidazione).

### **5.3.1. Steroidogenesi**

Con steroidogenesi si intende la biosintesi degli ormoni steroidei negli organismi viventi. Nell'uomo tutti gli ormoni steroidei derivano dal colesterolo e regolano vari processi biologici, fra cui equilibrio idro-salino, sviluppo sessuale, funzione riproduttiva, risposta immunitaria e risposta allo stress [63]. Tali ormoni vengono prodotti dai tessuti steroidogenici come gonadi, surreni, placenta e cervello [64,65], tramite la circolazione raggiungono il fegato ed i tessuti periferici dove vengono prodotti vari intermedi metabolici prima di essere escreti a livello urinario. Tutti questi processi contribuiscono alla formazione del metaboloma steroideo, che può essere caratterizzato analizzando campioni di sangue o urina. In relazione ai recettori con i quali si legano ed interagiscono, gli ormoni steroidei possono essere raggruppati in cinque categorie: glucocorticoidi, mineralcorticoidi, androgeni, estrogeni e progestinici.

Durante la vita fetale gli steroidi vengono prodotti principalmente nella zona fetale delle ghiandole surrenali, nei testicoli (le ovaie sono quiescenti), a livello placentare e cerebrale [64,66]. La zona fetale è una porzione della corticale surrenalica che nel periodo fetale è deputata alla sintesi di androgeni e che subito dopo la nascita scompare per aumento dell'apoptosi, portando quindi ad una rapida involuzione delle ghiandole surrenali e a una diminuzione della secrezione di androgeni [67].

Nel nostro studio otto, tra i 31 metaboliti urinari che sono stati identificati come rilevanti, appartengono alla famiglia degli steroidi, questi sono: aldosterone, pregnenolone, 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone, tetrahydrodeoxycorticosterone, cortolone, 21-deoxycortisol, 7 $\alpha$ -hydroxydehydroepiandrosterone, 3 $\alpha$ ,21-Dihydroxy-5 $\beta$ -pregnane-11,20-dione.

Sette di questi mostrano una tendenza costante alla diminuzione nel tempo nei campioni di urina esaminati, ad eccezione del 7 $\alpha$ -idrossideidroepiandrosterone che mostra un andamento inverso, tendendo a salire leggermente nel tempo dalla fase T0 alla fase PT.

Durante la seconda metà della gravidanza, la placenta produce quantità crescenti di progesterone [68], questo precursore viene poi convertito nei tessuti periferici fetali e nel cervello, in altre forme di steroidi neuroattivi (NAS), creando un peculiare asse ormonale tra il feto e la placenta.

I NAS esercitano una serie di funzioni protettive sul sistema nervoso centrale fetale e sono essenziali per la crescita e la maturazione neuronale e gliale [69,70].

I NAS svolgono anche un ruolo neuromodulatore: sopprimendo l'eccessiva eccitabilità riducono la tendenza a sviluppare convulsioni [71] che, come spiegato nella parte introduttiva, peggiorano l'outcome del paziente, determinando un aumento del metabolismo cerebrale e una redistribuzione locale del flusso ematico sacrificando le zone danneggiate; inoltre, le convulsioni sono associate alla produzione di molecole neurotossiche quali

citochine infiammatorie, glutammato, lattato, specie reattive dell'ossigeno [72]. Infine i NAS possono avere un ruolo nel migliorare i processi di riparazione conseguenti ad una lesione cerebrale, promuovere la mielinizzazione e ridurre l'apoptosi cellulare [73,74].

I complessi effetti biochimici e metabolici esercitati dai NAS sul cervello in via di sviluppo sono il risultato di modulazioni allosteriche dei recettori GABA [75], NMDA [76], del recettore della serotonina [77] e del recettore sigma-1 [78].

I NAS sono stati suddivisi in tre categorie: NAS della famiglia dei pregnani, NAS della famiglia dell'androstano e NAS solforati [79].

La famiglia dei pregnani NAS è quella più studiata, è una classe di derivati del progesterone che comprende allopregnanolone, epiallopregnanolone, pregnanolone, pregnenolone, deidroepiandrosterone e allotetraidrideossicorticosterone. Gli androstani NAS includono androstandiolo ed eticolanone e la famiglia dei NAS solforati comprendono il deidroepiandrosterone solfato e il pregnenolone solfato [80,81].

Anche la vitamina D svolge un ruolo nella neuroprotezione e nel neurosviluppo del cervello fetale e, dato il precursore comune con gli steroidi, ossia il colesterolo, può essere classificata anch'essa come NAS [82].

Nel nostro studio, abbiamo osservato una tendenza piuttosto omogenea all'abbassamento dei livelli di steroidi dalla fase T0 alla fase PT. Questa iniziale concentrazione elevata dei NAS a livello urinario nella fase acuta dell'insulto ipossico-ischemico seguito da un declino potrebbe essere interpretata come un meccanismo inizialmente massimizzato di neuroprotezione endogena, poi progressivamente attenuato e "sostituito" da altri interventi neuroprotettivi esogeni, uno tra tutti, l'ipotermia terapeutica.

Un altro fattore che potenzialmente potrebbe contribuire alla diminuzione delle concentrazioni di NAS nel tempo è il loro utilizzo nei processi di riparazione e neuromodulazione in risposta all'insulto ipossico-ischemico.

Curiosamente, la concentrazione urinaria di 7 $\alpha$ -idrossideidroepiandrosterone (7 $\alpha$ -OH-DHEA) tende invece ad aumentare leggermente nel tempo, in particolare nella fase PT.

Il 7 $\alpha$ -OH-DHEA agisce come antiossidante [83–85] e antiglicocorticoide [86–88], favorendo la risposta immunitaria [89–91], la neuroprotezione, in particolare contro il danno ipossico-ischemico [92], la neurogenesi e favorisce la sopravvivenza dei nuovi neuroni inibendo l'azione soppressiva del corticosterone [93,94].

I derivati del DHEA sono di gran lunga i NAS più rappresentati [87] nell'uomo ed inoltre hanno un'emivita relativamente più lunga rispetto agli altri [95], queste caratteristiche potrebbero fornire una possibile spiegazione della sua persistenza nel tempo nelle urine analizzate, andamento che non si osserva per le altre classi di NAS.

Anche Piñero-Ramos et al. nella loro analisi longitudinale sulle urine di neonati asfittici sottoposti a ipotermia terapeutica, hanno riscontrato una significativa perturbazione nella biosintesi degli ormoni steroidei, in particolare a 24 ore dall'inizio dell'IT [56].

Questi risultati evidenziano la potenzialità di studi futuri che indaghino il ruolo neuroprotettivo del NAS esogeno somministrato a neonati asfittici.

Sono già stati fatti i primi studi in questa direzione: Yawno et al. [71] ha scoperto che la somministrazione dell'analogo sintetico del pregnane, l'alfaxalone, riduce l'attività EEG spiking a seguito di una breve asfissia in utero in un modello animale; la stessa molecola svolge un ruolo nel diminuire la necrosi cellulare post-asfittica nel cervelletto ed ippocampo [96,97].

Il ganaxolone, un analogo sintetico dell'allopregnanolone [98], agisce anche come agonista del GABA, modulando l'attività degli interneuroni GABAergici attraverso il sito di legame delle benzodiazepine sui recettori GABA<sub>A</sub>. Le sue proprietà neuroprotettive sono state dimostrate nei roditori [99,100] ed è inoltre risultato efficace nel trattamento di crisi epilettiche parziali nei pazienti umani adulti e nel trattamento degli spasmi infantili [101].

Ci sono inoltre evidenze che i recettori GABA mediano un'attività eccitatoria complessiva nei neuroni umani nella maggior parte del periodo gestazionale, in particolare nelle prime fasi ontogenetiche di migrazione neuronale e formazione delle sinapsi [102]; tuttavia, poco prima del parto, la riduzione di [Cl<sup>-</sup>] mediata dall'ossitocina provoca uno spostamento dei recettori GABA del sistema nervoso centrale, rendendoli recettori inibitori piuttosto che eccitatori, esercitando un'azione neuroprotettiva e riducendo potenzialmente la gravità degli insulti anossici [103].

Inoltre, questo cambio di funzione dei recettori GABA nel peripartum, modula le vie ascendenti del dolore, aumentandone la soglia nel neonato [104].

Tenendo conto di queste evidenze, il neonato asfittico a termine o near term rappresenta un candidato promettente per valutare gli effetti neuroprotettivi dei NAS somministrati per via esogena, in particolare, gli analoghi sintetici della famiglia del pregnane [105].

### **5.3.2. Degradazione della lisina**

La lisina è un amminoacido essenziale presente 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 la modulazione dei processi di proliferazione cellulare,

differenziazione ed eccitabilità, nonché interazione intercellulare attraverso sistemi neurotrasmettitoriali [106].

Gli studi condotti su modelli murini da Kondoh et al. [107] e Cheng et al. [108] suggeriscono che l'amminoacido L-lisina possa avere un ruolo neuroprotettivo [107], antinfiammatorio [108] e di modulazione della risposta allo stress [106]. Nello studio di Kondoh 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 [107]. La somministrazione di L-lisina sembrerebbe diminuire l'edema cerebrale, soprattutto corticale, con effetto dose dipendente. Lo stesso studio ha evidenziato come la somministrazione di L-lisina nella stessa popolazione murina riduca l'area della zona infartuale causata dall'insulto ipossico-ischemico. Inoltre, la somministrazione di L-lisina correla con una diminuzione dell'attività glutammatergica determinando quindi una diminuzione della concentrazione di calcio intracellulare e di conseguenza una riduzione del danno neuronale.

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

Nel nostro studio tra i metaboliti rilevanti identificati che variano nel tempo, la L-lisina intatta mostra una diminuzione costante da T0 a IPO e da IPO a PT; parallelamente a questa diminuzione, i cataboliti della lisina (acido oxoglutarico, acido amino adipico) mostrano un aumento costante e significativo tra T0, IPO e PT (FC[IPO/T0] 1,31, FC [PT/T0] 2,85 per l'acido oxoglutarico e 1,99 e 2,39 rispettivamente per l'acido amino adipico).

Questa tendenza è spiegabile con un'attivazione della via di degradazione della lisina (tabella VI).

Confrontando solo i risultati sulle urine ottenute durante il trattamento ipotermico nella coorte originaria di pazienti [145], abbiamo notato che la lisina intatta era più alta nelle urine di pazienti senza evidenze di encefalopatia ipossico-ischemica alla RMc; inoltre, tale tendenza si è confermata per tutta la fase dell'ipotermia terapeutica. Ciò spiega un potenziale ruolo neuroprotettivo e neuromodulatore di questo amminoacido, come evidenziato dagli studi animali [106,107]; d'altra parte, è stata segnalata una diminuzione della lisina intatta in modelli suini [109].

Analogamente ai nostri risultati, anche Noto et al. [110] hanno riscontrato una diminuzione nel tempo della lisina intatta nelle urine di pazienti asfittici raccolte dopo ipotermia terapeutica.

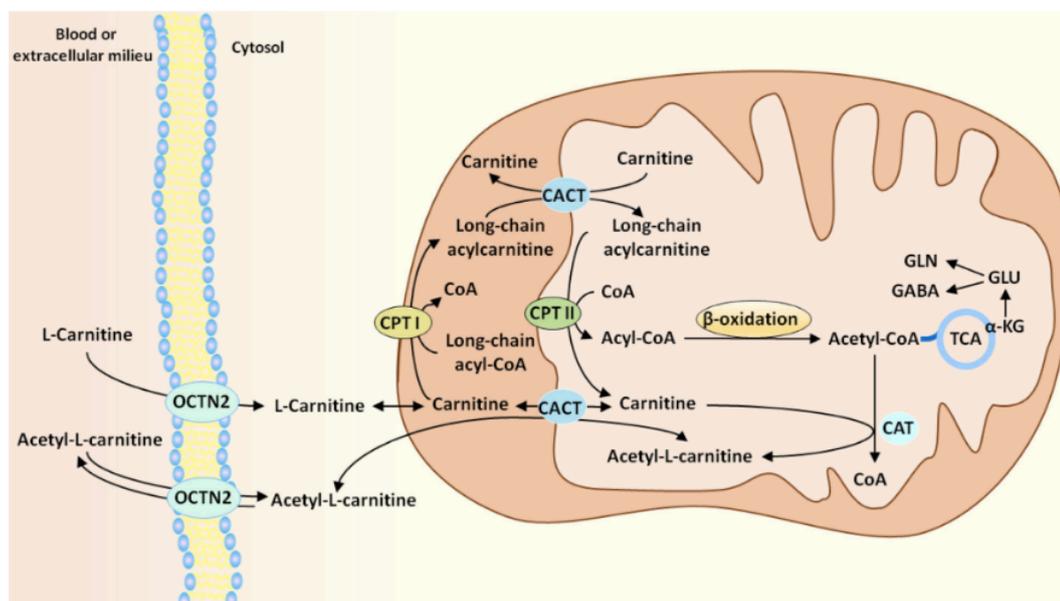
Infine, anche il gruppo di ricercatori Piñeiro-Ramos et al. [56] ha riscontrato un'attivazione della via di degradazione della lisina nelle urine raccolte a 12 ore di vita di neonati asfittici con danno cerebrale ipossico-ischemico rispetto a quelli senza EII.

Tutti questi risultati suggeriscono un possibile ruolo neuroprotettivo della lisina intatta contro il danno ipossico-ischemico.

### **5.3.3. Sintesi della carnitina ( $\beta$ -ossidazione)**

L'analisi dei metaboliti ha evidenziato significative variazioni prima (T0), durante (IPO) e dopo (PT) l'ipotermia terapeutica anche nell'ambito del metabolismo energetico: questi includono acil-amminoacidi (N-acetilvalina, N-acetil-L-tirosina, acido N-acetil-L-aspartico, acido N-acetilglutammico) e acilcarnitine (butirilcarnitina, L-ottanoilcarnitina, isovalerilcarnitina). Tutti, tranne la butirilcarnitina mostrano un aumento nelle urine nel tempo.

Le acilcarnitine derivano dall'associazione della carnitina con una molecola di Acil-CoA che avviene ad opera dell'enzima carnitina palmitoil transferasi I nel citosol; il complesso acil-carnitina entra nella matrice mitocondriale dove viene nuovamente separato (tramite l'enzima carnitina palmitoil transferasi II) in carnitina e Acil-CoA; il primo viene traslocato nuovamente nel citosol, il secondo entra nel processo di  $\beta$ -ossidazione [111,112].



**Figura 10.** L-carnitina e acetil-L-carnitina entrano nelle cellule dal sangue o dall'ambiente extracellulare attraverso il trasportatore OCTN2. L'enzima acil-CoA sintasi (non mostrato) converte gli acidi grassi a catena lunga in acil-CoA grassi, che vengono successivamente convertiti in acilcarnitine dall'enzima carnitina palmitoiltransferasi I (CPT I) localizzato nella membrana mitocondriale esterna. Le acilcarnitine attraversano la membrana mitocondriale interna tramite un trasportatore, la carnitina/acilcarnitina translocasi (CACT), in cambio di L-carnitina libera. L'enzima carnitina palmitoiltransferasi II (CPT II), che è localizzato nella membrana mitocondriale interna, converte le acilcarnitine in acil-CoA e L-carnitina libera, che esce dai mitocondri e funge da substrato per CPT I per formare più acilcarnitina. I carboni provenienti da acil-CoAs importati nella matrice mitocondriale attraverso la navetta della carnitina possono essere ossidati per produrre energia o metabolizzati tramite il ciclo TCA e incorporati in glutammato, glutammina e GABA. (da Ferreira GC, McKenna MC.,

La L-carnitina è un composto endogeno, presente nella maggior parte dei tessuti umani, compreso il cervello [113]; oltre ad essere cruciale per il metabolismo energetico cellulare, la carnitina svolge anche altre due importanti funzioni: nel cervello in via di sviluppo, la parte acetilica generata dal cosiddetto “shuttle della carnitina” serve anche per essere incorporata nei neurotrasmettitori e nei lipidi strutturali di nuova formazione [114]; inoltre, il sistema navetta ha un ruolo cruciale nel prevenire un accumulo intracellulare potenzialmente tossico di acidi grassi a catena lunga e acil-CoA a catena lunga [115].

L'accumulo nel tempo di acilcarnitine e altri derivati acilici nei campioni urinari può essere spiegato sia considerando l'interruzione del metabolismo energetico cellulare dovuto all'asfissia, con incapacità di utilizzare substrati energetici nel processo di  $\beta$ -ossidazione e conseguente insufficienza

energetica cellulare, sia con la dispersione (e il conseguente accumulo nelle urine) dei substrati energetici non utilizzati conseguenti alla necrosi cellulare. Inoltre, l'accumulo intracellulare di acidi grassi a catena lunga dovuto all'incapacità di compiere correttamente la  $\beta$ -ossidazione, può ulteriormente contribuire alla tossicità neuronale [115].

Un accumulo di acilcarnitine è stato riscontrato anche in modelli animali di asfissia perinatale [109,116] e in precedenti studi su neonati asfittici, avvalorando l'ipotesi di uno "stunning" energetico mitocondriale in questi pazienti [56,117,118].

#### **5.3.4. Metabolismo del triptofano**

Il triptofano è un amminoacido essenziale, precursore di numerosi metaboliti biologicamente attivi, tra cui l'acido nicotinico (vitamina B3), importanti cofattori redox NAD<sup>+</sup> (P<sup>+</sup>) H, l'acido picolinico, la kinurenina neuroattiva e i suoi metaboliti acido kinurenico e acido chinolinico, l'indolilamina 5-idrossitriptamina (5-HT o serotonina) e l'ormone pineale melatonina [119].

Due metaboliti rilevanti alterati durante l'asfissia perinatale nei nostri campioni urinari sono la L-kinurenina (che sale dalla fase T0 alla fase PT) e l'acido kinurenico (leggermente in diminuzione dalla fase T0 alla fase PT). Questi sono rispettivamente un prodotto intermedio e uno dei prodotti finali del catabolismo del triptofano.

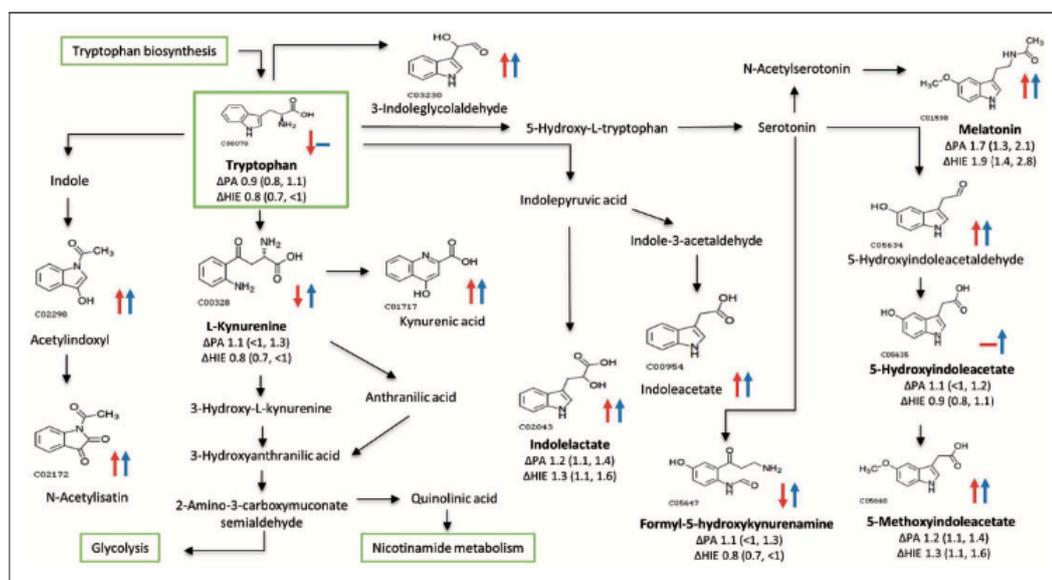
In passato erano già state evidenziate delle perturbazioni nel metabolismo del triptofano durante l'asfissia perinatale, sia in osservazioni animali [120] che umane [56,119].

L'eccitotossicità neuronale dovuta al rilascio anomalo di neurotrasmettitori come dopamina, glutammato, acido N-acetilaspatico, colina e altri è uno dei determinanti della sofferenza e della morte cellulare durante l'asfissia perinatale [121–123]; è stato dimostrato che i metaboliti del catabolismo del triptofano, in particolare quelli relativi alla via della kinurenina, agiscono come neuromodulatori dei recettori eccitatori glutammatergici e nicotinici,

regolando la risposta immunitaria dopo l'evento asfittico e modificando potenzialmente la formazione di specie reattive dell'ossigeno [119].

L'acido kinurenico, in particolare, agisce come antagonista endogeno dei recettori N-metil-D-aspartato (NMDA) [124], modulando l'eccitotossicità indotta dall'eccessiva attivazione glutammatergica; la sua progressiva diminuzione nel nostro gruppo di pazienti asfittici, insieme all'aumento della L-kinurenina, potrebbe essere spiegata dal blocco della via catabolica del triptofano, potenzialmente associata all'aumento dell'attività eccitatoria dell'NMDA.

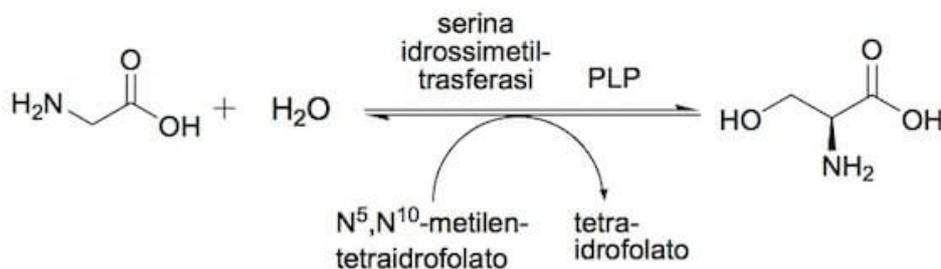
Il ruolo dell'ipossia nel deviare il metabolismo del triptofano su vie alternative rispetto al catabolismo in kinurenina e acido kinurenico è stata precedentemente già dimostrata sia nel modello animale che nell'umano [125,126].



**Figura 11.** Alterazioni nel metabolismo del triptofano. Le frecce indicano un aumento o diminuzione del metabolita in termini di FC; EII (rosso) e asfissia perinatale (blu), mentre i metaboliti in grassetto indicano i composti significativamente alterati con FC (95% CI) incluso (da Denihan NM, Kirwan JA, Walsh BH, Dunn WB, Broadhurst DI, Boylan GB, Murray DM. 2017).

### 5.3.5. Metabolismo della glicina e serina

Glicina e serina non sono amminoacidi essenziali, sono quindi prodotti a livello endogeno oltre che introdotti con l'alimentazione. La serina viene sintetizzata a partire dal 3-fosfoglicerato oppure dall'amminoacido glicina e la glicina, a sua volta, viene prodotta dalla serina. Glicina e serina possono mediare, insieme al glutammato, funzioni eccitatorie nel sistema nervoso centrale.



**Figura 12.** Biosintesi serina-glicina.

L'analisi metabolomica targeted sui campioni plasmatici ha mostrato una progressiva diminuzione sia della glicina che della serina nel tempo (tabella VII); le analisi untargeted sulle urine hanno evidenziato un aumento costante dell'acido N-acetilglutammico e, nella fase PT, dell'acido piroglutammico, un derivato ciclico del primo.

Come spiegato in precedenza, il recettore eccitatorio N-metil-D-aspartato (NMDA) provoca la depolarizzazione neuronale e svolge un ruolo chiave nella patogenesi dell'encefalopatia ipossico-ischemica, in particolare sul cervello in via di sviluppo [124].

Per essere completamente attivato, il recettore NMDA richiede il legame simultaneo dell'acido glutammico e di un co-attivatore. Questo può essere visto come un meccanismo di sicurezza che impedisce l'iperattivazione indesiderata di tali recettori. Sia la glicina che la serina possono agire come co-agonisti [127] per la maggior parte dei sottotipi di recettori NMDA.

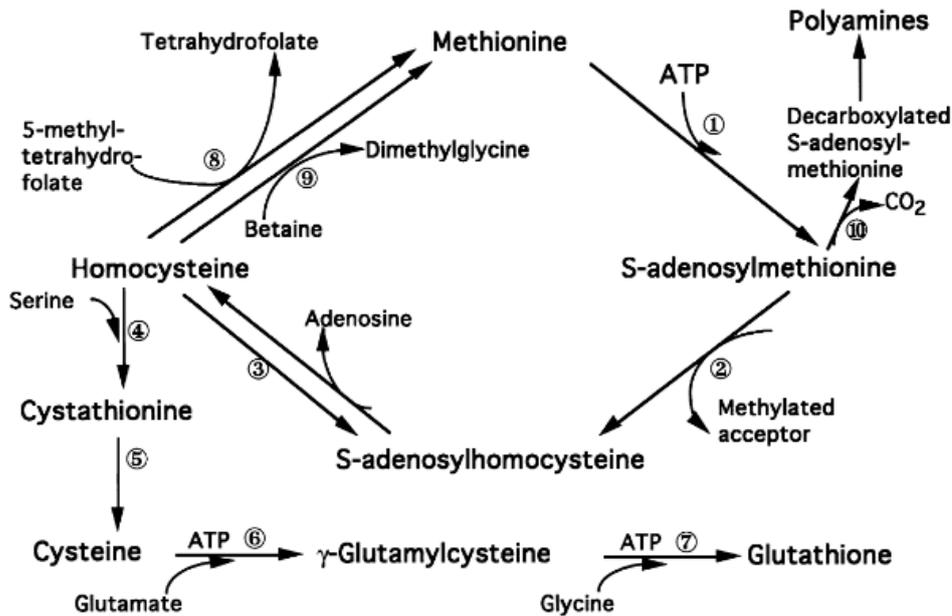
In condizioni fisiologiche, i recettori NMDA non sono mai completamente saturi, prevenendo così attivazione eccessiva e quindi la tossicità neuronale;

tuttavia, in particolari condizioni come l'asfissia perinatale, elevate concentrazioni di glicina o serina possono portare all'attivazione patologica di tali recettori, con conseguente danno eccitatorio neuronale [128].

La nostra osservazione di diminuzione costante sia della glicina che della serina nel tempo è confermata dallo studio di Fuchs et al. [129]; anche questi autori hanno osservato un declino di tali mediatori dopo la fase di riperfusione, sia in vitro che in vivo.

### **5.3.6. Metabolismo della metionina**

La metionina è un amminoacido essenziale, centrale in numerose vie metaboliche nei mammiferi [130]: il suo derivato adenosilmetionina rappresenta un substrato necessario per il metabolismo delle poliammine (putrescina, spermidina e spermina), ed è anche coinvolto nei processi di transmetilazione e transsolforazione [131]. L'omocisteina, un derivato della metionina, può essere rimetilato a metionina trasformando il 5-metiltetraidrofolato in tetraidrofolato, che a sua volta funge da accettore di metilene trasformando la serina in glicina. Inoltre, la metionina funge da componente fondamentale del metabolismo proteico [130,132] e l'equilibrio tra la metionina libera e quella incorporata nelle proteine è influenzato dalle suddette vie.



**Figura 13.** Sintesi e vie metaboliche della S-Adenosil-L-Metionina. (1) Metionina adenosiltransferasi; (2) Reazioni di transmetilazione; (3) S-adenosilomocisteina idrolasi; (4) Cistationina b-sintasi; (5) g-cistationina; (6) g-glutamilsteina sintetasi; (7) GSH sintetasi; (8) Metionina sintasi; (9) Betaina-omocisteina; (10) S-adenosilmetionina decarbossilasi (da Lu S.C 2000).

Le analisi metabolomiche targeted su campioni plasmatici hanno evidenziato una costante diminuzione di metionina nel tempo.

La perturbazione del metabolismo della metionina può quindi essere interpretata alla luce della sua relazione con altre vie metaboliche interessate nel nostro studio, come il metabolismo della glicina e della serina e la biosintesi della spermidina e della spermina.

### 5.3.7. Riciclo dell'ammoniaca

L'ammoniaca (NH<sub>3</sub>) viene riciclata per il suo utilizzo nel metabolismo dell'azoto. L'azoto è fondamentale per la formazione di composti organici vitali, quali le proteine e acidi nucleici.

Numerosi meccanismi enzimatici biochimici svolgono un ruolo nel riciclo dell'ammoniaca: l'asparaginasi ricicla l'ammoniaca dall'asparagina [133], mentre la glutaminasi mitocondriale converte la glutammina in acido

glutammico [134], recuperando una molecola di NH<sub>3</sub>. L'ammoniaca viene recuperata anche a partire dalla serina [135], istidina (attraverso reazioni citoplasmatiche) [136] e glicina (nella matrice mitocondriale) [137].

Il coinvolgimento di questa via metabolica è coerente con la perturbazione di glicina, serina, istidina e asparagina nella nostra analisi targeted dei campioni di plasma (tabella VII).

I neonati che soffrono di EII in seguito ad asfissia perinatale dimostrano un aumento di ammoniaca ematica fino al terzo giorno di vita con successivo calo fino ai livelli di partenza [138]. L'ammoniaca, viste le sue dimensioni molto piccole, è una molecola altamente diffusibile sia attraverso la membrana citoplasmatica che mitocondriale [139], il suo eccesso nell'ambiente intracellulare triggera una serie di meccanismi di tossicità cellulare fino all'autofagia [140].

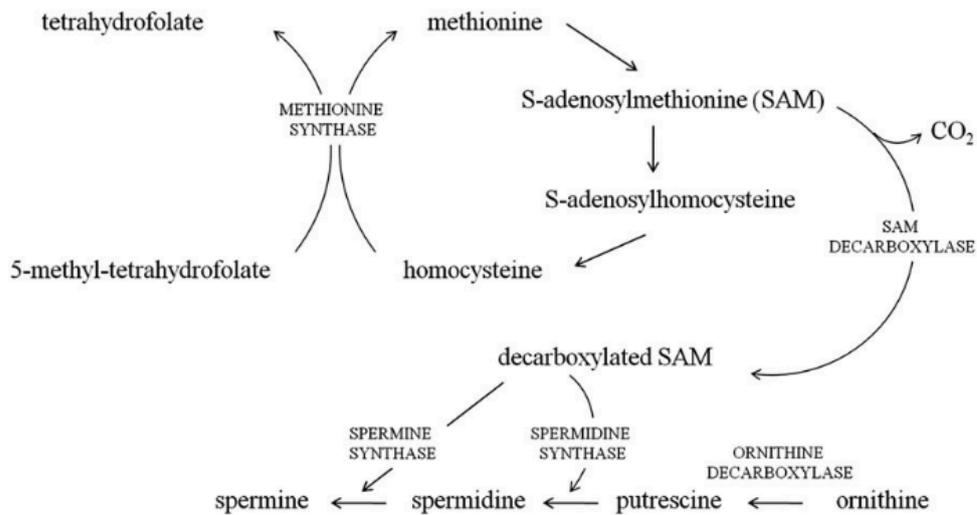
Per prevenire l'eccesso di ammoniaca intracellulare, l'acido oxoglutarico si può combinare con l'ammoniaca a formare l'acido glutammico e quindi glutamina [141]; questo meccanismo se da una parte tampona l'eccesso di ammoniaca intracellulare, dall'altra sottrae un substrato fondamentale al ciclo degli acidi tricarbossilici il che rappresenta un ulteriore potenziale contributo al deficit energetico cellulare di questi pazienti.

### **5.3.8. Biosintesi di spermidina e spermina**

Le poliammine alifatiche (putrescina, spermidina e spermina) svolgono un ruolo chiave nella regolazione della crescita e proliferazione cellulare, nella stabilizzazione delle cariche negative del DNA, nella trascrizione dell'RNA, nella traduzione e nell'apoptosi [142].

La spermidina agisce come un potente inibitore dello stress ossidativo nel modello di invecchiamento murino [143]; è stato inoltre dimostrato che la spermidina esogena stimola l'autofagia, con un effetto diretto nell'aumentare la durata della vita in diversi modelli sperimentali, dal lievito ai topi [144].

La spermidina deriva dal suo precursore putrescina, in una reazione dipendente dai livelli di S-adenosilmetionina [142].



**Figura 14.** Ciclo della metionina e via delle poliammine. La biosintesi di spermidina e spermina dipende dai livelli di S-adenosilmetionina (SAM). La metionina viene rigenerata dall'omocisteina in una reazione di transmetilazione folato-dipendente che porta alla successiva formazione di SAM, che viene convertita in SAM decarbossilata dalla decarbossilasi SAM. La spermidina è sintetizzata dalla putrescina e la spermina dalla spermidina, mediante trasferimento della parte aminopropilica della SAM decarbossilata (da Pucciarelli et al. 2012).

Nei nostri campioni di plasma, la putrescina ha mostrato un aumento significativo dalla fase T0 alla fase IPO e da IPO a PT: questo può significare che la conversione metabolica della putrescina nei suoi metaboliti più attivi è in qualche modo compromessa durante l'asfissia perinatale, contribuendo allo squilibrio metabolico e alla morte cellulare.

#### **5.4. Limiti e prospettive future**

Il nostro studio presenta alcuni limiti. Rispetto alla nostra coorte originale di pazienti è stato possibile analizzare le urine di 12 pazienti e il plasma di 19 poiché solo di questi erano stati raccolti campioni in tutti i tempi necessari (T0, IPO e PT).

Data la bassa numerosità, non è stato possibile suddividere i pazienti sulla base dello sviluppo dell'encefalopatia ipossico-ischemica alla risonanza magnetica cerebrale e quindi non è stato possibile discriminare potenziali differenze nella variazione del metaboloma nel tempo in pazienti che sviluppano un danno da quelli che non lo sviluppano.

Inoltre, è da tenere presente che spesso questi pazienti per necessità cliniche vengono sottoposti a trasfusioni ematiche che introducono ulteriori elementi di variabilità nell'analisi metabolomica, essendo ovviamente le emazie trasfuse caratterizzate da un metaboloma estraneo a quello del paziente.

Sono inoltre necessari futuri studi randomizzati controllati per valutare il razionale di trattamenti potenzialmente di supporto, come la somministrazione esogena di steroidi neuroattivi sintetici, basati sulle variazioni metaboliche rilevate nel tempo del metaboloma di questi pazienti. Inoltre, è necessaria una convalida di questi risultati tramite analisi di un set di dati più ampio per accertare che queste modificazioni metaboliche nel tempo siano specifiche di asfissia perinatale, IT o entrambi.



## 6. CONCLUSIONI

In conclusione, il nostro studio ci ha permesso di descrivere le modificazioni dinamiche del metaboloma urinario e plasmatico dei neonati asfittici nel tempo (in particolare prima, durante e dopo l'IT), nonché di determinare quali sono le vie metaboliche che vengono significativamente alterate durante l'asfissia perinatale. Da un punto di vista clinico, alcune di queste sono legate a specifiche funzioni cellulari: meccanismi neuroprotettivi (steroidogenesi, degradazione della lisina, metabolismo del triptofano), produzione di energia mitocondriale ( $\beta$ -ossidazione), prevenzione dell'eccitotossicità (metabolismo della glicina e della serina), longevità cellulare (biosintesi di spermidina e spermina).

Da notare che la via metabolica della  $\beta$ -ossidazione è costantemente influenzata sia nelle urine che nel plasma del nostro gruppo di pazienti, evidenziando ancora una volta l'importanza del fallimento dei meccanismi energetici della cellula durante l'asfissia perinatale.



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Rainaldi MA, Perlman JM. Pathophysiology of Birth Asphyxia. *Clin Perinatol.* settembre 2016;43(3):409–22.
2. Moshiro R, Mdoe P, Perlman JM. A Global View of Neonatal Asphyxia and Resuscitation. *Front Pediatr.* 26 novembre 2019;7:489.
3. Halloran DR, McClure E, Chakraborty H, Chomba E, Wright LL, Carlo WA. Birth asphyxia survivors in a developing country. *J Perinatol.* marzo 2009;29(3):243–9.
4. McGuire W. Perinatal asphyxia. *Child Health.* marzo 2007; 320(11):1-21.
5. van Handel M, Swaab H, de Vries LS, Jongmans MJ. Long-term cognitive and behavioral consequences of neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia: a review. *Eur J Pediatr.* luglio 2007;166(7):645–54.
6. Walas W, Wilińska M, Bekiesińska-Figatowska M, Halaba Z, Śmigiel R. Methods for assessing the severity of perinatal asphyxia and early prognostic tools in neonates with hypoxic–ischemic encephalopathy treated with therapeutic hypothermia. *Adv Clin Exp Med.* 21 agosto 2020;29(8):1011–6.
7. 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.* dicembre 2008;199(6):587–95.
8. Eunson P. The long-term health, social, and financial burden of hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Dev Med Child Neurol.* aprile 2015;57:48–50.
9. Drury PP, Gunn ER, Bennet L, Gunn AJ. Mechanisms of Hypothermic Neuroprotection. *Clin Perinatol.* marzo 2014;41(1):161–75.
10. Volpe JJ. Neonatal encephalopathy: An inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Ann Neurol.* agosto 2012;72(2):156–66.
11. Shankaran S. Prevention, Diagnosis, and Treatment of Cerebral Palsy in Near-term and Term Infants. *Clin Obstet Gynecol.* dicembre 2008;51(4):829–39.
12. Rutherford M.A., Pennock J.M., Schwieso J.E., Cowan F.M., Dobowitz L.M. Hypoxic Ischaemic Encephalopathy: Early Magnetic Resonance

- Imaging Findings and Their Evolution. *Neuropediatrics*. 1995; 26:183-191
13. Blair E, Watson L. Epidemiology of cerebral palsy. *Semin Fetal Neonatal Med*. aprile 2006;11(2):117–25.
  14. Marcdante KJ, Kligeman RM, Nelson RW, Cassio A, Perilongo G, Plebani A, Schiavetti A. *Nelson Manuale di Pediatria*. 8<sup>a</sup> ed. Milano: Edra; 2019.
  15. Chalak LF. Perinatal Asphyxia in the Delivery Room: Initial Management and Current Cooling Guidelines. *NeoReviews*. 1 agosto 2016;17(8):e463–70.
  16. American College of Obstetricians and Gynecologists, American Academy of Pediatrics, curatori. Neonatal encephalopathy and neurologic outcome. Second edition. Washington, DC: American College of Obstetricians and Gynecologists, Women’s Health Care Physicians, American Adademy of Pediatrics; 2014. 236 pag.
  17. American academy of pediatrics committee on fetus and newborn, american college of obstetricians and gynecologists committee on obstetric practice, Watterberg KL, Aucott S, Benitz WE, Cummings JJ, Eichenwald EC, Goldsmith J, Poindexter BB, Puopolo K, Stewart DL, Wang KS, Ecker JL, Wax JR, Borders AEB, El-Sayed YY, Heine RP, Jamieson DJ, Mascola MA, Minkoff HL, Stuebe AM, Sumners JE, Tuuli MG, Wharton KR. The Apgar Score. *Pediatrics*. 1 ottobre 2015;136(4):819–22.
  18. Carter BS, Haverkamp AD, Merenstein GB. The Definition of Acute Perinatal Asphyxia. *Clin Perinatol*. giugno 1993;20(2):287–304.
  19. Aziz K, Lee HC, Escobedo MB, Hoover AV, Kamath-Rayne BD, Kapadia VS, Magid DJ, Niermeyer S, Schmölder GM, Szyld E, Weiner GM, Wyckoff MH, Yamada NK, Zaichkin J. Part 5: Neonatal Resuscitation: 2020 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation*. ottobre 2020  
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIR.0000000000000902>
  20. Hill A, Volpe JJ. Perinatal Asphyxia: Clinical Aspects. *Clin Perinatol*. giugno 1989;16(2):435–57.
  21. Ancora G, Pomerio G, Ferrari F. Raccomandazioni per l’assistenza al neonato con encefalopatia ipossico-ischemica candidato al trattamento ipotermico. *Società Italiana di neonatologia*. II ed. publ Biomedica, Milano, ottobre 2012.

22. Silveira RC, Procianoy RS. Hypothermia therapy for newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. *J Pediatr (Rio J)*. novembre 2015;91(6):S78–83.
23. Chalak LF, Nguyen KA, Prempunpong C, Heyne R, Thayyil S, Shankaran S, Lupton AR, Rollins N, Pappas A, Koclas L, Shah B, Montaldo P, Techasaensiri B, Sánchez PJ, Sant'Anna G. Prospective research in infants with mild encephalopathy identified in the first six hours of life: neurodevelopmental outcomes at 18–22 months. *Pediatr Res*. dicembre 2018;84(6):861–8.
24. Se J. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;91.
25. Shankaran S, Tyson JE, Fanaroff AA, Higgins RD, Duara S, Stevenson DK, Guillet R. Whole-Body Hypothermia for Neonates with Hypoxic–Ischemic Encephalopathy. *N Engl J Med*. 2005;11.
26. Thoresen M. Who should we cool after perinatal asphyxia? *Semin Fetal Neonatal Med*. aprile 2015;20(2):66–71.
27. Lemyre B, Chau V. Hypothermia for newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Paediatr Child Health*. 12 giugno 2018;23(4):285–91.
28. Power BD, McGinley J, Sweetman D, Murphy JF. The Modified Sarnat Score in the Assessment of Neonatal Encephalopathy: A Quality Improvement Initiative. :4.
29. Glass HC, Hong KJ, Rogers EE, Jeremy RJ, Bonifacio SL, Sullivan JE, Barkovich AJ, Ferriero DM. Risk Factors for Epilepsy in Children With Neonatal Encephalopathy. *Pediatr Res*. novembre 2011;70(5):535–40.
30. Dilella R., Raviglione F., Beghi E., et al. Monitoraggio dell'attività elettrica cerebrale (vEEG-CFM) nel neonato (File PDF); a cura del gruppo INNESCO (Italian National Neonatal Seizure Cooperation). giugno 2020
31. al Naqeeb N, Edwards AD, Cowan FM, Azzopardi D. Assessment of Neonatal Encephalopathy by Amplitude-integrated Electroencephalography. *Pediatrics*. 1 giugno 1999;103(6):1263–71.
32. Neonatal Encephalopathy and Neurologic Outcome, Second Edition. *Pediatrics*. 1 maggio 2014;133(5):e1482–8.
33. Bano S, Chaudhary V, Garga U. Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: A radiological review. *J Pediatr Neurosci*. 2017;12(1):1.

34. Debuf MJ, Carkeek K, Piersigilli F. A Metabolomic Approach in Search of Neurobiomarkers of Perinatal Asphyxia: A Review of the Current Literature. *Front Pediatr.* 25 giugno 2021;9:674585.
35. Murray DM. Biomarkers in neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy—Review of the literature to date and future directions for research. In: *Handbook of Clinical Neurology.* Elsevier; 2019. pag. 281–93.  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444640291000138>
36. Nair J, Kumar V. Current and Emerging Therapies in the Management of Hypoxic Ischemic Encephalopathy in Neonates. *Children.* 19 luglio 2018;5(7):99.
37. Jacobs SE, Hunt R, Tarnow-Mordi WO, Inder TE, Davis PG. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. In: *The Cochrane Collaboration, curatore. Cochrane Database of Systematic Reviews.* Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2007  
<https://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD003311.pub2>
38. 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. :3.
39. Cheong JLY, Coleman L, Hunt RW, Lee KJ, Doyle LW, Inder TE, Jacobs SE, Infant Cooling Evaluation Collaboration for the. Prognostic Utility of Magnetic Resonance Imaging in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: Substudy of a Randomized Trial. *Arch Pediatr AdolescMed.*luglio2012;166(7).  
<http://archpedi.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archpediatrics.2012.284>
40. Inder TE, Hunt RW, Morley CJ, Coleman L, Stewart M, Doyle LW, Jacobs SE. Randomized trial of systemic hypothermia selectively protects the cortex on MRI in term hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr.* dicembre 2004;145(6):835–7.
41. Rutherford MA, Azzopardi D, Whitelaw A, Cowan F, Renowden S, Edwards AD, Thoresen M. Mild Hypothermia and the Distribution of Cerebral Lesions in Neonates With Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Pediatrics.* 1 ottobre 2005;116(4):1001–6.
42. Rutherford M, Ramenghi LA, Edwards AD, Brocklehurst P, Halliday H, Levene M, Strohm B, Thoresen M, Whitelaw A, Azzopardi D. Assessment of brain tissue injury after moderate hypothermia in neonates with hypoxic–ischaemic encephalopathy: a nested substudy of a randomised controlled trial. *Lancet Neurol.* gennaio 2010;9(1):39–45.

43. Barkovich AJ, Hajnal BL, Vigneron D, Sola A, Partridge JC, Allen F, Ferriero DM. Prediction of Neuromotor Outcome in Perinatal Asphyxia: Evaluation of MR Scoring Systems. 1998;7.
44. Martínez-Espinosa R. Impact of the “Omics Sciences” in Medicine: New Era for Integrative Medicine. *J Clin Microbiol Biochem Technol.* 25 gennaio 2017;009–13.
45. Nicholson JK, Lindon JC. Organisms often respond in complex and unpredictable ways to stimuli that cause disease or injury. By measuring and mathematically modelling changes in the levels of products of metabolism found in biological fluids and tissues, metabolomics offers fresh insight into the effects of diet, drugs and disease. :3.
46. Baker M. Metabolomics: from small molecules to big ideas. *Nat Methods.* febbraio 2011;8(2):117–21.
47. Bardanzellu F, Fanos V. How could metabolomics change pediatric health? *Ital J Pediatr.* dicembre 2020;46(1):37.
48. Carraro S, Giordano G, Reniero F, Perilongo G, Baraldi E. Metabolomics: A New Frontier for Research in Pediatrics. *J Pediatr.* maggio 2009;154(5):638–44.
49. Ryan D, Robards K. Metabolomics: The Greatest Omics of Them All? *Anal Chem.* 1 dicembre 2006;78(23):7954–8.
50. Pan Z, Raftery D. Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics. *Anal Bioanal Chem.* 5 gennaio 2007;387(2):525–7.
51. Ashrafian H, Sounderajah V, Glen R, Ebbels T, Blaise BJ, Kalra D, Kultima K, Spjuth O, Tenori L, Salek RM, Kale N, Haug K, Schober D, Rocca-Serra P, O'Donovan C, Steinbeck C, Cano I, de Atauri P, Cascante M. Metabolomics: The Stethoscope for the Twenty-First Century. *Med Princ Pract.* 2021;30(4):301–10.
52. Graham EM, Everett AD, Delpech JC, Northington FJ. Blood biomarkers for evaluation of perinatal encephalopathy: state of the art. *Curr Opin Pediatr.* aprile 2018;30(2):199–203.
53. Serpero LD, Bellissima V, Colivicchi M, Sabatini M, Frigiola A, Ricotti A, Ghiglione V, Strozzi MC, Li Volti G, Galvano F, Gazzolo D. Next generation biomarkers for brain injury. *J Matern Fetal Neonatal Med.* ottobre 2013;26(sup2):44–9.
54. 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*. Ma D, curatore. PLOS ONE. 18 aprile 2018;13(4):e0194267.
55. Piñeiro-Ramos JD, Núñez-Ramiro A, Llorens-Salvador R, Parra-Llorca A, Sánchez-Illana Á, Quintás G, Boronat-González N, Martínez-Rodilla J, Kuligowski J, Vento M, The HYPOTOP Study Group The HYPOTOP Study Group. Metabolic Phenotypes of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy with Normal vs. Pathologic Magnetic Resonance Imaging Outcomes. *Metabolites*. 14 marzo 2020;10(3):109.
  56. Piñeiro-Ramos JD, Cascant MM, Núñez-Ramiro A, López-González Á, Solaz-García Á, Albiach-Delgado A, Martínez-Rodilla J, Llorens-Salvador R, Sanjuan-Herraez D, Quintás G, Barbas C, Kuligowski J, Vento M, on behalf of the Hypotop Study Group. Noninvasive monitoring of evolving urinary metabolic patterns in neonatal encephalopathy. *Pediatr Res*. febbraio 2022;91(3):598–605.
  57. Mardegan V, Giordano G, Stocchero M, Pirillo P, Poloniato G, Donadel E, Salvadori S, Giaquinto C, Priante E, Baraldi E. Untargeted and Targeted Metabolomic Profiling of Preterm Newborns with Early Onset Sepsis: A Case-Control Study. *Metabolites*. 18 febbraio 2021;11(2):115.
  58. Jolliffe IT. *Principal Component Analysis*. 2nd ed. New York: Springer; 2002. (Springer Series in Statistics.).
  59. Stocchero M, De Nardi M, Scarpa B. PLS for classification. *Chemom Intell Lab Syst*. settembre 2021;216:104374.
  60. 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*. 26 gennaio 2022;11(3):345.
  61. Sumner LW, Urbanczyk-Wochniak E, Broeckling CD. *Metabolomics Data Analysis, Visualization, and Integration*. In: Edwards D, curatore. *Plant Bioinformatics*. Totowa, NJ: Humana Press; 2005. pag. 409–36. Disponibile su: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-535-0\\_20](http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-535-0_20)
  62. Keilhoff G, John R, Langnaese K, Schweizer H, Ebmeyer U. Triggered by asphyxia neurogenesis seems not to be an endogenous repair mechanism, gliogenesis more like it. *Neuroscience*. dicembre 2010;171(3):869–84.
  63. Dhayat NA, Frey AC, Frey BM, d'Uscio CH, Vogt B, Rousson V, Dick B, Flück CE. 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. *J Steroid Biochem Mol Biol.* novembre 2015;154:226–36.
64. Mesiano S, Jaffe RB. Developmental and Functional Biology of the Primate Fetal Adrenal Cortex. 1997;18(3):26.
  65. Stoffel-Wagner B. Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur J Endocrinol.* 1 dicembre 2001;669–79.
  66. Shackelton C:H:L., Honour J.W., Taylor N.F. metabolism of fetal and neonatal adrenal steroids. *Journal Of Steroid Biochemistry.* 1979;11:523-529.
  67. Ishimoto H, Jaffe RB. Development and Function of the Human Fetal Adrenal Cortex: A Key Component in the Feto-Placental Unit. *Endocr Rev.* 1 giugno 2011;32(3):317–55.
  68. Mitchell BF, Taggart MJ. Are animal models relevant to key aspects of human parturition? *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol.* settembre 2009;297(3):R525–45.
  69. Melcangi RC, Garcia-Segura LM, Mensah-Nyagan AG. Neuroactive steroids: State of the art and new perspectives. *Cell Mol Life Sci.* marzo 2008;65(5):777–97.
  70. Wang JM, Liu L, Irwin RW, Chen S, Brinton RD. Regenerative potential of allopregnanolone. *Brain Res Rev.* marzo 2008;57(2):398–409.
  71. Yawno T, Yan EB, Hirst JJ, Walker DW. Neuroactive steroids induce changes in fetal sheep behavior during normoxic and asphyxic states. *Stress.* gennaio 2011;14(1):13–22.
  72. Gunn AJ, Bennet L. Fetal Hypoxia Insults and Patterns of Brain Injury: Insights from Animal Models. *Clin Perinatol.* settembre 2009;36(3):579–93.
  73. Ibanez C, Shields SA, El-Etr M, Baulieu EE, Schumacher M, Franklin RJM. Systemic progesterone administration results in a partial reversal of the age-associated decline in CNS remyelination following toxin-induced demyelination in male rats: Progesterone and CNS remyelination. *Neuropathol Appl Neurobiol.* febbraio 2004;30(1):80–9.
  74. Grassi S, Frondaroli A, Dieni C, Dutia MB, Pettorossi VE. Neurosteroid modulation of neuronal excitability and synaptic transmission in the rat medial vestibular nuclei: THDOC and ALLO action on MVN neurons. *Eur J Neurosci.* 26 giugno 2007;26(1):23–32.
  75. Lambert J.J., Belevi D., Hill-Venning C., Peters J.A. Neurosteroids and GABA<sub>A</sub> receptor function. *Tips.* settembr 2016. 16: 295-303.

76. Farb H. Sulfate: A Negative Modulator of the NMDA-Induced Current in Cultured Neurons. 1994; 46: 146-160.
77. Wetzel CHR, Hermann B, Behl C, Pestel E, Rammes G, Holsboer F, Rupprecht R. Functional Antagonism of Gonadal Steroids at the 5-Hydroxytryptamine Type 3 Receptor. 1998;12(9):11.
78. Maurice T, Urani A, Phan VL, Romieu P. The interaction between neuroactive steroids and the  $\sigma_1$  receptor function: behavioral consequences and therapeutic opportunities. *Brain Res Rev.* 2001;17.
79. Tuem KB, Atey TM. Neuroactive Steroids: Receptor Interactions and Responses. *Front Neurol.* 28 agosto 2017;8:442.
80. Carta MG, Bhat KM, Preti A. GABAergic neuroactive steroids: a new frontier in bipolar disorders? *Behav Brain Funct.* 2012;8(1):61.
81. Mellédo JML, Baker GB. Neuroactive steroids and anxiety disorders. *J Psychiatry Neurosci.* :5.
82. Groves NJ, McGrath JJ, Burne THJ. Vitamin D as a Neurosteroid Affecting the Developing and Adult Brain. *Annu Rev Nutr.* 17 luglio 2014;34(1):117–41.
83. 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.* 1 luglio 1999;35–9.
84. 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.* 1 novembre 1997;155(2):233–40.
85. Pelissier MA, Trap C, Malewiak MI, Morfin R. Antioxidant effects of dehydroepiandrosterone and 7 $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat colon, intestine and liver. *Steroids.* febbraio 2004;69(2):137–44.
86. Morfin R. Involvement of steroids and cytochromes P450 species in the triggering of immune defenses. *J Steroid Biochem Mol Biol.* marzo 2002;80(3):273–90.
87. Kalimi M, Shafagoj Y, Loria R, Padgett D, Regelson W. Anti-glucocorticoid effects of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Mol Cell Biochem.* 1994;131(2):99–104.
88. Chmielewski V, Drupt F, Morfin R. Dexamethasone-induced apoptosis of mouse thymocytes: Prevention by native 7 $\alpha$ -hydroxysteroids. *Immunol Cell Biol.* giugno 2000;78(3):238–46.

89. Ben-Nathan D, Lachmi B, Lustig S, Feuerstein G. Protection by dehydroepiandrosterone in mice infected with viral encephalitis. *Arch Virol.* settembre 1991;120(3-4):263-71.
90. Loria RM, Padgett DA, Huynh PN. Regulation of the immune response by dehydroepiandrosterone and its metabolites. *J Endocrinol.* settembre 1996;150 Suppl:S209-220.
91. Morfin R, Courchay G. Pregnenolone and dehydroepiandrosterone as precursors of native 7-hydroxylated metabolites which increase the immune response in mice. *J Steroid Biochem Mol Biol.* luglio 1994;50(1-2):91-100.
92. Pringle AK, Schmidt W, Deans JK, Wulfert E, Reymann KG, Sundstrom LE. 7-Hydroxylated epiandrosterone (7-OH-EPIA) reduces ischaemia-induced neuronal damage both in vivo and in vitro. *Eur J Neurosci.* luglio 2003;18(1):117-24.
93. Jellinck PH, Lee SJ, McEwen BS. Metabolism of dehydroepiandrosterone by rat hippocampal cells in culture: possible role of aromatization and 7-hydroxylation in neuroprotection. *J Steroid Biochem Mol Biol.* ottobre 2001;78(4):313-7.
94. Karishma KK, Herbert J. Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression: DHEA in hippocampus. *Eur J Neurosci.* agosto 2002;16(3):445-53.
95. Maingat FG, Polyak MJ, Paul AM, Vivithanaporn P, Noorbakhsh F, Ahboucha S, Baker GB, Pearson K, Power C. Neurosteroid-mediated regulation of brain innate immunity in HIV/AIDS: DHEA-S suppresses neurovirulence. *FASEB J.* febbraio 2013;27(2):725-37.
96. Yawno T, Yan EB, Walker DW, Hirst JJ. Inhibition of neurosteroid synthesis increases asphyxia-induced brain injury in the late gestation fetal sheep. *Neuroscience.* giugno 2007;146(4):1726-33.
97. Yawno T, Hirst JJ, Castillo-Melendez M, Walker DW. Role of neurosteroids in regulating cell death and proliferation in the late gestation fetal brain. *Neuroscience.* ottobre 2009;163(3):838-47.
98. Bialer M, Johannessen SI, Levy RH, Perucca E, Tomson T, White HS. Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Tenth Eilat Conference (EILAT X). *Epilepsy Res.* dicembre 2010;92(2-3):89-124.

99. Reddy DS, Rogawski MA. Chronic Treatment with the Neuroactive Steroid Ganaxolone in the Rat Induces Anticonvulsant Tolerance to Diazepam but Not to Itself. 2000;295:8.
100. Reddy DS, Rogawski MA. Ganaxolone suppression of behavioral and electrographic seizures in the mouse amygdala kindling model. *Epilepsy Res.* maggio 2010;89(2–3):254–60.
101. Nohria V., Giller E. Ganaxolone. *Eurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics.* gennaio 2007; 4:102-105
102. Demarque M, Represa A, Becq H, Khalilov I, Ben-Ari Y, Aniksztejn L. Paracrine Intercellular Communication by a Ca<sup>2+</sup>- and SNARE-Independent Release of GABA and Glutamate Prior to Synapse Formation. *Neuron.* dicembre 2002;36(6):1051–61.
103. Tyzio R, Cossart R, Khalilov I, Minlebaev M, Hübner CA, Represa A, Ben-Ari Y, Khazipov R. Maternal Oxytocin Triggers a Transient Inhibitory Switch in GABA Signaling in the Fetal Brain During Delivery. *Science.* 15 dicembre 2006;314(5806):1788–92.
104. Mazzuca M, Minlebaev M, Shakirzyanova A, Tyzio R, Taccola G, Janackova S, Gataullina S, Ben-Ari Y, Giniatullin R, Khazipov R. Newborn Analgesia Mediated by Oxytocin during Delivery. *Front Cell Neurosci.*2011;5.  
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2011.00003/abstract>
105. Yawno T, Miller SL, Bennet L, Wong F, Hirst JJ, Fahey M, Walker DW. Ganaxolone: A New Treatment for Neonatal Seizures. *Front Cell Neurosci.* 22 agosto 2017;11:246.
106. Severyanova LA, Lazarenko VA, Plotnikov DV, Dolgintsev ME, Kriukov AA. L-Lysine as the Molecule Influencing Selective Brain Activity in Pain-Induced Behavior of Rats. *Int J Mol Sci.* 17 aprile 2019;20(8):1899.
107. Kondoh T. Lysine and arginine reduce the effects of cerebral ischemic insults and inhibit glutamate-induced neuronal activity in rats. *Front Integr Neurosci* [Internet]. 2010 [citato 25 maggio 2022]; Disponibile su:  
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnint.2010.00018/abstract>
108. Cheng J, Tang JC, Pan MX, Chen SF, Zhao D, Zhang Y, Liao HB, Zhuang Y, Lei RX, Wang S, Liu AC, Chen J, Zhang ZH, Li HT, Wan Q, Chen QX. l-lysine confers neuroprotection by suppressing inflammatory response via microRNA-575/PTEN signaling after

- mouse intracerebral hemorrhage injury. *Exp Neurol.* maggio 2020;327:113214.
109. Solberg R, Enot D, Deigner HP, Koal T, Scholl-Bürgi S, Saugstad OD, Keller M. Metabolomic Analyses of Plasma Reveals New Insights into Asphyxia and Resuscitation in Pigs. Gold JA, curatore. *PLoS ONE.* 9 marzo 2010;5(3):e9606.
  110. Noto A, Pomerio 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.* novembre 2016;4(21):417–417.
  111. Longo N, Frigeni M, Pasquali M. Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* ottobre 2016;1863(10):2422–35.
  112. Szabó K, Nagy Z, Juhász V, Zolnerciks JK, Csorba A, Tímár Z, Molnár É, Pádár P, Johnson W, Beéry E, Krajcsi P. Species specificity profiling of rat and human organic cation/carnitine transporter Slc22a5/SLC22A5 (Octn2/OCTN2). *Drug Metab Pharmacokinet.* giugno 2017;32(3):165–71.
  113. Jones LL, McDonald DA, Borum PR. Acylcarnitines: Role in brain. *Prog Lipid Res.* gennaio 2010;49(1):61–75.
  114. Scafidi S, Fiskum G, Lindauer SL, Bamford P, Shi D, Hopkins I, McKenna MC. Metabolism of acetyl-L-carnitine for energy and neurotransmitter synthesis in the immature rat brain: Metabolism of ALCAR in immature brain. *J Neurochem.* 9 giugno 2010;114(3):820–31.
  115. Rau TF, Lu Q, Sharma S, Sun X, Leary G, Beckman ML, Hou Y, Wainwright MS, Kavanaugh M, Poulsen DJ, Black SM. Oxygen Glucose Deprivation in Rat Hippocampal Slice Cultures Results in Alterations in Carnitine Homeostasis and Mitochondrial Dysfunction. Ceña V, curatore. *PLoS ONE.* 11 settembre 2012;7(9):e40881.
  116. Solberg R, Kuligowski J, Pankratov L, Escobar J, Quintás G, Lliso I, Sánchez-Illana Á, Saugstad OD, Vento M. Changes of the plasma metabolome of newly born piglets subjected to postnatal hypoxia and resuscitation with air. *Pediatr Res.* agosto 2016;80(2):284–92.
  117. Walsh BH, Broadhurst DI, Mandal R, Wishart DS, Boylan GB, Kenny LC, Murray DM. The Metabolomic Profile of Umbilical Cord Blood in Neonatal Hypoxic Ischaemic Encephalopathy. Baud O, curatore. *PLoS ONE.* 5 dicembre 2012;7(12):e50520.

118. El-Farghali OG, El-Chimi MS, El-Abd HS, El-Desouky E. Amino acid and acylcarnitine profiles in perinatal asphyxia: a case-control study. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 3 giugno 2018;31(11):1462–9.
119. Badawy AAB, Dougherty DM. Assessment of the Human Kynurenine Pathway: Comparisons and Clinical Implications of Ethnic and Gender Differences in Plasma Tryptophan, Kynurenine Metabolites, and Enzyme Expressions at Baseline and after Acute Tryptophan Loading and Depletion. *Int J Tryptophan Res.* gennaio 2016;9:IJTR.S38189.
120. Tricklebank MD, Pickard FJ, Dobbing J. Tryptophan and 5-hydroxytryptamine metabolism in the immature rat brain during recovery from asphyxia. *J Neurochem.* marzo 1977;28(3):641–4.
121. Liu J, Litt L, Segal MR, Kelly MJ, Yoshihara HA, James TL. Outcome-Related Metabolomic Patterns from <sup>1</sup>H/ <sup>31</sup>P NMR after Mild Hypothermia Treatments of Oxygen—Glucose Deprivation in a Neonatal Brain Slice Model of Asphyxia. *J Cereb Blood Flow Metab.* febbraio 2011;31(2):547–59.
122. 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.* gennaio 2019;39(1):147–62.
123. Beckstrom AC, Humston EM, Snyder LR, Synovec RE, Juul SE. Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry method to identify potential biomarkers of perinatal asphyxia in a non-human primate model. *J Chromatogr A.* aprile 2011;1218(14):1899–906.
124. Bagasrawala I, Zecevic N, Radonjić NV. N-Methyl D-Aspartate Receptor Antagonist Kynurenic Acid Affects Human Cortical Development. *Front Neurosci.* 30 settembre 2016;10. <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnins.2016.00435/abstract>
125. Adeyemi OS, Awakan OJ, Afolabi LB, Rotimi DE, Oluwayemi E, Otuechere CA, Ibraheem O, Elebiyo TC, Alejlowo O, Arowolo AT. Hypoxia and the Kynurenine Pathway: Implications and Therapeutic Prospects in Alzheimer’s Disease. Buoso E, curatore. *Oxid Med Cell Longev.* 10 novembre 2021;2021:1–11.
126. Mohapatra SR, Sadik A, Sharma S, Poschet G, Gegner HM, Lanz TV, Lucarelli P, Klingmüller U, Platten M, Heiland I, Opitz CA. Hypoxia Routes Tryptophan Homeostasis Towards Increased Tryptamine Production. *Front Immunol.* 19 febbraio 2021;12:590532.

127. Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G. Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci.* 12 aprile 2005;102(15):5606–11.
128. Bergeron R, Meyer TM, Coyle JT, Greene RW. Modulation of *N*-methyl-*D*-aspartate receptor function by glycine transport. *Proc Natl Acad Sci.* 22 dicembre 1998;95(26):15730–4.
129. Fuchs SA, Peeters-Scholte CMPCD, de Barse MMJ, Roeleveld MW, Klomp LWJ, Berger R, de Koning TJ. Increased concentrations of both NMDA receptor co-agonists d-serine and glycine in global ischemia: a potential novel treatment target for perinatal asphyxia. *Amino Acids.* luglio 2012;43(1):355–63.
130. Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Chem.* agosto 1984;259(15):9508–13.
131. Lu S.C. S-Adenosylmethionine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2000. 32:391-395
132. Aledo JC. Methionine in proteins: The Cinderella of the proteinogenic amino acids. *Protein Sci.* ottobre 2019;28(10):1785–96.
133. Bush LA, Herr JC, Wolkowicz M, Sherman NE, Shore A, Flickinger CJ. A novel asparaginase-like protein is a sperm autoantigen in rats. *Mol Reprod Dev.* giugno 2002;62(2):233–47.
134. Nakatani Y., Banner C. et al. Comparison of human brain and liver glutamate dehydrogenase cDNAs. *Biochemical and biophysical research communications.* Dicembre 1987. 149: 405-410
135. Ogawa H, Gomi T, Konishi K, Date T, Nakashima H, Nose K, Matsuda Y, Peraino C, Pitot HC, Fujioka M. Human Liver Serine Dehydratase. *J Biol Chem.* settembre 1989;264(27):15818–23.
136. Suchi M., Sano H., Mizuno H., Wada Y. Molecular cloning and structural characterization of human histidase gene (HAL). *Genomics.* 1995; 29: 98-104.
137. Kikuchi G. The glycine cleavage system: Composition, reaction mechanism, and physiological significance. *Mol Cell Biochem.* settembre 1973;1(2):169–87.
138. Esqué Ruiz MT, Figueras Aloy J, Salvia Roigés MD, Carbonell Estrany X. Amoníaco y transaminasas en sangre en el recién nacido a término afectado de asfixia perinatal. *Rev Neurol.* 2003;36(09):801.

139. Cueto-Rojas HF, Milne N, van Helmond W, Pieterse MM, van Maris AJA, Daran JM, Wahl SA. Membrane potential independent transport of NH<sub>3</sub> in the absence of ammonium permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Syst Biol.* dicembre 2017;11(1):49.
140. Mariño G, Kroemer G. Ammonia: A Diffusible Factor Released by Proliferating Cells That Induces Autophagy. giugno 2010;3(124). <https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.3124pe19>
141. Xiao D, Zeng L, Yao K, Kong X, Wu G, Yin Y. The glutamine-alpha-ketoglutarate (AKG) metabolism and its nutritional implications. *Amino Acids.* settembre 2016;48(9):2067–80.
142. Pucciarelli S, Moreschini B, Micozzi D, De Fronzo GS, Carpi FM, Polzonetti V, Vincenzetti S, Mignini F, Napolioni V. Spermidine and Spermine Are Enriched in Whole Blood of Nona/Centenarians. *Rejuvenation Res.* dicembre 2012;15(6):590–5.
143. Soda K, Dobashi Y, Kano Y, Tsujinaka S, Konishi F. Polyamine-rich food decreases age-associated pathology and mortality in aged mice. *Exp Gerontol.* novembre 2009;44(11):727–32.
144. Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, Büttner S, Ruckenstuhl C, Carmona-Gutierrez D, Ring J, Schroeder S, Magnes C, Antonacci L, Fussi H, Deszcz L, Hartl R, Schraml E, Criollo A, Megalou E, Weiskopf D, Laun P, Heeren G, Breitenbach M, Grubeck-Loebenstien B, Herker E, Fahrenkrog B, Fröhlich KU, Sinner F, Tavernarakis N, Minois N, Kroemer G, Madeo F. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol.* novembre 2009;11(11):1305–14.
145. Valerio E, Mardegan V, Stocchero M, Cavicchiolo ME, Pirillo P, Poloniato G, D'Onofrio G, Bonadies L, Giordano G, Baraldi E. Urinary metabolites of newborns with perinatal asphyxia undergoing therapeutic hypothermia. *Plos one* (submitted).