



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE

Tesi di Specializzazione in Neuropsichiatria Infantile

TOPIRAMATO ED IPOTERMIA

NELL'ENCEFALOPATIA IPOSSICO ISCHEMICA DEL NEONATO

A TERMINE: FOLLOW UP NEI PRIMI DUE ANNI DI VITA

Direttore della Scuola di Specializzazione e Relatore

Prof. Giovanni Cioni

Candidato: Dott.ssa Simona Fiori

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

INDICE

RIASSUNTO	5
-----------	---

PARTE GENERALE

1. ENCEFALOPATIA IPOSSICO-ISCHEMICA

1.1. EZIOLOGIA	8
1.2. MANIFESTAZIONI CLINICHE E RUOLO DELLA RISONANZA MAGNETICA	10
1.3. PATTERN DI DANNO NEL NEONATO A TERMINE	12
1.4. EII E CASCATA NEUROTOSSICA	14
1.5. VULNERABILITA' NEURONALE SELETTIVA	17

2. NEUROPROTEZIONE

2.1. ASPETTI MOLECOLARI	19
2.2. NEUROPROTEZIONE NELL'EII NEONATALE	21
2.3. IPOTERMIA	22
2.4. EVIDENZE DEGLI EFFETTI CLINICI DELL'IPOTERMIA NELL'EII	24
2.5. IPOTERMIA "PLUS"	26

PARTE SPERIMENTALE

3. SCOPO DELLO STUDIO	29
------------------------------	----

4. METODI

4.1. DISEGNO DELLO STUDIO	31
4.2. IPOTERMIA E TOPIRAMATO	33
4.3. FOLLOW UP NEI PRIMI DUE ANNI DI VITA	37
4.4. MISURE DI OUTCOME	42
4.5. ANALISI STATISTICA	43

5. RISULTATI	
5.1. CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI	46
5.2. OUTCOME	46
6. DISCUSSIONE	50
APPENDICE	58
BIBLIOGRAFIA	64
RINGRAZIAMENTI	73

RIASSUNTO

Nonostante i progressi nell'assistenza neonatale e la riduzione della mortalità perinatale nelle ultime decadi, il danno cerebrale ipossico ischemico rimane una causa significativa di mortalità e morbilità a lungo termine. E' stato dimostrato in diversi trial che l'ipotermia moderata è in grado di ridurre le sequele neurologiche e incrementare la sopravvivenza di neonati a termine con encefalopatia ipossico ischemica (EII).

Il Topiramato (TPM) è un farmaco anticonvulsivante provato, che ha dimostrato un effetto sinergico all'ipotermia dopo un danno ipossico-ischemico in modelli animali, determinando una riduzione degli esiti neuromotori nel ratto. Questi effetti sono stati dimostrati a diversi livelli, recettoriali e nella cascata intracellulare, e lasciano ipotizzare la possibilità di utilizzare il TPM come agente neuroprotettivo attraverso la riduzione del rilascio di aminoacidi eccitatori e la modulazione di altri mediatori nelle cellule in condizioni di ipossia.

L'obiettivo dello studio proposto è quello di valutare attraverso un trial randomizzato controllato l'efficacia del trattamento combinato di ipotermia e TPM, rispetto a misure di sopravvivenza e outcome neurologico in un gruppo di neonati a termine con encefalopatia ipossico ischemica (EII). I pazienti sono stati monitorati attraverso un programma dettagliato di follow-up mediante strumenti standardizzati per misurare lo sviluppo neuropsichico e studi di Risonanza Magnetica (RM). Risultati preliminari non mostrano significative differenze tra il gruppo di pazienti trattati con TPM e i controlli per quello che riguarda le misure di outcome primario (tasso combinato di mortalità e disabilità neuropsichica di grado severo); alcune modeste differenze sono evidenziabili in misure di outcome secondario. La valutazione delle funzioni visive attraverso un metodo standardizzato, mostra risultati significativamente migliori nei pazienti trattati con TPM

rispetto ai controlli; questo effetto potrebbe essere riferibile ad un migliore precoce sviluppo neuropsichico rilevato da questo strumento e determinato dal TPM. Anche la frequenza dell'epilessia appare ridotta in pazienti trattati con TPM rispetto ai controlli. Questo dato potrebbe essere correlato col precedente sul funzionamento visivo, per una relazione già descritta in letteratura tra abilità visive, visuo-cognitive ed encefalopatie epilettiche. Sul piano strumentale, il trattamento con TPM non induce modifiche sostanziali alla Risonanza Magnetica strutturale, ma metodiche avanzate come l'Arterial Spin Labeling (ASL) per lo studio della perfusione cerebrale applicate a medio termine sembrano mostrare pattern di perfusione differenti nei pazienti trattati con TPM rispetto ai controlli, ad una preliminare valutazione qualitativa.

Un ulteriore prolungato monitoraggio clinico e un incremento del numero dei pazienti reclutati saranno necessari a supportare i dati presentati rispetto alle misure di outcome e fornire chiarimenti in merito ai possibili meccanismi d'azione o marker neurobiologici della neuroprotezione basata sull'utilizzo di ipotermia e TPM.

PARTE GENERALE

1. ENCEFALOPATIA IPOSSICO ISCHEMICA

1.1 EZIOLOGIA

Nonostante i progressi nell'assistenza neonatale e la riduzione di mortalità e morbilità perinatale nelle ultime decadi, il danno cerebrale ipossico ischemico rimane una causa significativa di mortalità e morbilità del neonato a termine (Lawn J, 2005; van Handel M, 2007).

La diagnosi di encefalopatia ipossico ischemica (EII) si basa sul riscontro di un insulto ipossico ischemico, seguito da un'encefalopatia neonatale. Esiste una stretta correlazione tra il tipo di insulto ischemico subito dal neonato e il danno cerebrale conseguente. La severità e l'estensione del danno sono in gran parte determinate dal momento di inizio, dalla severità e dalla durata dell'insulto. Infatti, la maturità e lo stato fisiologico del feto al momento dell'EII rivestono un ruolo fondamentale nella severità del danno indotto dall'EII (Perlman JM, 1999). L'insulto ipossico ischemico può avere un esordio pre-partumo, intra-partum o post-partum. Esistono diversi studi epidemiologici che esplorano il ruolo di diversi fattori in relazione al timing dell'insulto e sembra che solo il 20% delle paralisi cerebrali siano causate da un insulto incorso durante il parto. In alcuni casi si rileva il ruolo di alcuni fattori prenatali concausali, come ad esempio disgenesie cerebrali o ritardo di crescita intrauterino (IUGR) che possono aver predisposto all'asfissia perinatale.

Diversi livelli di ipossia-ischemia fetali possono accadere in maniera parafisiologica durante il parto. Ad esempio, una temporanea riduzione del flusso sanguigno uterino avviene durante le contrazioni del parto, fatto che tuttavia generalmente non compromette lo stato fetale, a meno che non ci siano significative condizioni anche placentari preesistenti o il verificarsi di complicanze durante il parto stesso. In questo senso sono da tenere in considerazione molteplici fattori, dalle modalità di concepimento, a possibili infezioni durante la gravidanza, all'abuso di sostanze o all'utilizzo di farmaci durante la

gravidanza. Altri dettagli riguardanti il travaglio di parto o il parto stesso rivestono un ruolo critico per stabilire il rischio di un insulto ipossico ischemico intra-partum, come ad esempio il riscontro di anomalie nel monitoraggio dell'attività cardiaca fetale, lo stato acido-base del neonato, l'indice di Apgar, la presenza di meconio, di patologie placentari, o procedure eventuali di rianimazione. Un fattore importante da considerare tuttavia è che, questi eventi rappresentano sì un elemento di rischio per un insulto ipossico ischemico, ma non devono essere considerati come predittivi di lesione cerebrale. Nel neonato a termine, rispetto al pretermine, gli eventi ipossici post-natali sono meno frequenti, seppure possibili (Swaiman KF, 2006).

Esperimenti in animali hanno permesso di stabilire una relazione tra il tipo di insulto ipossico ischemico e il danno cerebrale. Due principali modelli di insulto ipossico ischemico intra-partum sono stati descritti. Il primo consiste in un insulto ipossico globale, acuto, che determina un danno irreversibile dopo circa 10 minuti, con lesioni a livello della sostanza grigia profonda (talamo, gangli della base, midollo allungato), ed un risparmio relativo della corteccia cerebrale. Il secondo consiste in un insulto ipossico parziale, protratto, che determina un danno irreversibile dopo circa un'ora, con lesioni prevalenti della corteccia cerebrale e della sostanza bianca sottocorticale, ed un risparmio relativo della sostanza grigia profonda. Questi due tipologie di danno rappresentano gli estremi di un ampio spettro fisiopatologico e spesso esiti di entrambi i modelli coesistono, con prevalenza dell'uno o dell'altro. Evidenze anatomo-patologiche riferibili a questi modelli sono state ampiamente ottenute in esperimenti su animali, ma esistono chiare evidenze anatomo-cliniche sull'esistenza di pattern analoghi nel neonato a termine (Ahamed Hossain M, 2005).

1.2. MANIFESTAZIONI CLINICHE E RUOLO DELLA RISONANZA MAGNETICA

Nei neonati a termine che subiscono un insulto ipossico ischemico intra-partum tale da determinare sequele neurologiche, è possibile rilevare un'encefalopatia ipossico ischemica pressoché in tutti i casi. Tuttavia, l'assenza di manifestazioni riferibili a EII, dovrebbe orientare per un insulto accaduto durante la gravidanza, che non necessariamente si manifesta in modo acuto al momento del parto (Swaiman KF, 2006). Sebbene esista un ampio spettro di gravità dell'encefalopatia ipossico ischemica, come accennato nel precedente paragrafo, a fini prognostici si ritiene utile valutare l'EII come lieve, moderata e severa, in accordo con una versione modificata della classificazione di Sarnat e Sarnat (Sarnat H, 1976).

L'esordio della sintomatologia legata all'asfissia è variabile. Alcuni neonati mostrano segni di encefalopatia immediatamente dopo il parto, mentre altri appaiono normali per diverse ore dopo il parto. Un sintomo che deve allarmare rispetto alla possibilità di una EII è rappresentato dalle crisi epilettiche. Alcuni studi riportano un tempo medio prima della comparsa di crisi epilettiche dalla nascita di circa 10 ore (Ahn M, 1998). Tuttavia nella maggior parte dei casi di EII le crisi compaiono in un momento variabile nelle prime 24 ore di vita.

Nei bambini nati a termine con EII di grado severo, spesso le manifestazioni neurologiche si sviluppano con un decorso prevedibile. Nelle prime ore di vita si assiste ad una riduzione del livello di vigilanza, con risparmio della respirazione autonoma. Successivamente si verificano crisi, talvolta con semeiologia subdola, seguite da un decremento della responsività a sollecitazioni esterne e ipotonia. Nei casi più gravi le crisi possono diventare subentranti fino a richiedere imponente sedazione farmacologica e possono diventare evidenti segni di disfunzione tronco-encefalica, come ad esempio apnee, movimenti oculari anomali e risposte motorie abnormi. Questa sintomatologia può

peggiore durante i primi tre giorni di vita e culminare in arresto respiratorio ed exitus. Essa corrisponde al profilo temporale di evoluzione dell'edema cerebrale. L'edema cerebrale è il risultato da un lato della massiva necrosi tissutale, dall'altro della inappropriata secrezione di ormone antidiuretico che si riscontra in alcuni neonati con EII (Swaiman KF, 2006).

Con l'evoluzione delle fasi dell'EII, generalmente le crisi si riducono entro 3-4 giorni, con graduale stabilizzazione del quadro neurologico nelle settimane successive. Disfunzioni tronco-encefaliche persistenti si possono rilevare nei pazienti che presentano un pattern di coinvolgimento della sostanza grigia profonda (Ahamed Hossain M, 2005).

Diverse indagini biochimiche possono essere effettuate al fine di definire la gravità dell'EII. Tra queste, la determinazione dell'equilibrio acido base nel sangue cordonale e del neonato è di notevole supporto all'identificazione dell'EII (Swaiman KF, 2006).

La Risonanza Magnetica (RM) encefalo viene utilizzata nella definizione del danno nell'EII fin dalle fasi acute, per la sua alta sensibilità e specificità. Nel neonato a termine, la RM convenzionale effettuata tra 7 e 10 giorni dopo un insulto ipossico ischemico, può dimostrare la presenza di diversi pattern di lesione, prevalentemente da ischemia ma raramente con componente emorragica. I territori spartiacque parasagittali, pattern di lesione profonda dei gangli della base, o talvolta un interessamento anche degli ippocampi, del tronco-encefalo dorsale e della corteccia perirolandica si osservano più tipicamente e sono stati descritti in letteratura come riferiti a diversi livelli di gravità dell'insulto ipossico-ischemico (Okerefor A, 2009). E' stato inoltre dimostrato che questi pattern, descritti precocemente entro i primi dieci giorni di vita, correlano con la persistenza a 18-24 mesi di età delle anomalie rilevate e sono pertanto predittivi del danno cerebrale (Rutherford M, 1996; Rutherford M, 2006). Un ruolo di rilievo in particolare nella descrizione precoce delle lesioni cerebrali assumono le tecniche di Diffusione (DWI), che sono più sensibili nella diagnosi di lesioni nella EII delle tecniche convenzionali. Lesioni

ischemiche, definite come aree di diffusività ristretta dovute all'edema citotossico individuate nelle immagini pesate in diffusione, sono più cospicue che nell'imaging convenzionale (van Laerhoven H, 2013).

Una metodica che negli ultimi anni ha suscitato un crescente interesse è la perfusione studiata mediante Arterial Spin Labeling (ASL). Questa metodica analizza la perfusione cerebrale in modo non invasivo. E' noto che nelle fasi acute di un insulto ipossico ischemico, come dimostrato da studi di perfusione mediante PET, si verifica un incremento della perfusione, con un graduale successivo ritorno alla normoperfusione cerebrale (Meek JH, 1999; Rosenbaum JL, 1997; Ilves P, 2009; Ilves P, 2009b). Tuttavia, questa metodica è assai meno applicata nelle fasi subacute o croniche dell'EII, ed i pattern di perfusione a lungo termine sono misconosciuti. E' stato recentemente dimostrato che a due settimane dal trattamento con ipotermia si rilevano anomalie nella perfusione e che il flusso cerebrale è più basso in regioni danneggiate dall'insulto ipossico ischemico che corrispondono ad alterazioni di segnale nell'imaging convenzionale (Massaro AN, 2013).

Infine, grande interesse nella correlazione lesione-funzione, hanno suscitato applicazioni del DWI nello studio su popolazione o singolo soggetto mediante rispettivamente Tract-Based Spatial Statistic (TBSS), trattografia basata su Region of Interest (ROI) e studi di connettività morfologica o funzionale (Tusor N, 2012).

1.3. PATTERN DI DANNO NEL NEONATO A TERMINE

Diversi pattern lesionali possono manifestarsi in seguito ad un danno ipossico, per la diversa suscettibilità di strutture diverse all'ischemia (Volpe JJ, 1997; Rivkin MJ, 1997). In particolare la Risonanza Magnetica negli ultimi decenni ha permesso di individuare pattern specifici di lesioni per lo più bilaterali e simmetriche a livello della corteccia cerebrale rolandica, del putamen e del talamo (Menkes, 1994; Barkovich AJ, 1995; Hoon AH, 1997; Roland EH, 1998; Pasternak JF, 1998; Maller AI, 1998).

Danno corticale-sottocorticale. Questo pattern si verifica per il persistere di un insulto ipossico-ischemico parziale che può essere continuo o intermittente e che in genere si prolunga oltre i 60 minuti. Al livello più severo dello spettro si colloca la diffusa necrosi della corteccia e della sostanza bianca sottocorticale, spesso con risparmio relativo dei nuclei della base. Sul piano clinico questo tipo di insulto si manifesta con crisi, deficit della funzione motoria e ridotto livello di coscienza. Le crisi possono essere difficili da controllare farmacologicamente nei primi giorni di vita. Sequele a lungo termine possono comprendere disabilità intellettiva, paralisi cerebrale spastica ed epilessia (Swaiman KF, 2006).

Danno parasagittale. Questo pattern di lesione può essere considerato un sottotipo del precedente. Esso segue un insulto prolungato e parziale di intensità minore rispetto al precedente. Dal punto di vista patogenetico, il danno è dovuto al fatto che la corteccia parasagittale e le regioni sottocorticali, collocate nelle aree supero-mediali della convessità cerebrale, sono zone spartiacque con ridotto apporto ematico, localizzate al margine delle regioni rifornite dalle arterie cerebrali anteriore, media e posteriore. Queste regioni, in quanto terminali, sono particolarmente vulnerabili all'insulto ipossico ischemico, che risulta da una riduzione di grado minore della perfusione cerebrale. Spesso queste lesioni sono bilaterali e relativamente simmetriche, spesso più marcatamente posteriori. Sul piano clinico queste lesioni si manifestano con ipotonia e debolezza prossimale a livello degli arti, che correlano con la distribuzione topografica delle lesioni.

Le manifestazioni neurologiche possono essere subdole ma di entità variabile fino alla tetraplegia spastica. Lesioni di minore entità possono risultare in deficit linguistici specifici o in anomalie della percezione visuo-spaziale (Swaiman KF, 2006).

Pattern centrale: talami, gangli della base e tronco-encefalo. Il pattern di lesione che coinvolge le strutture centrali è stato ampiamente riprodotto in modelli animali. La porzione posteriore del putamen e il nucleo ventrolaterale del talamo sono particolarmente

coinvolti; possono coesistere anche lesioni del nucleo caudato e del globo pallido. Questo pattern di lesione si verifica nel modello animale, come conseguenza di un asfissia globale, acuta, di durata variabile tra 10 e 20 minuti. E' possibile ipotizzare che, nel feto, l'ischemia non sia totale ma sub-totale, determinando un prolungamento dell'insulto anche per un periodo di tempo maggiore. Dal punto di vista patogenetico, il danno è dovuto all'alta attività metabolica delle regioni coinvolte nel cervello del neonato a termine, per la rapida differenziazione dei neuroni, e alla transitoria, estesa innervazione Glutamatergica dei gangli della base (Johnston 2001). In alcuni casi possono essere coinvolti gli ippocampi, la corteccia perirolandica e il cervelletto, in particolare a livello del verme. Sul piano clinico queste lesioni sono inizialmente difficili da differenziare da quelle descritte a livello cortico-sottocorticale. In genere la sintomatologia tronco-encefalica è prominente, con diplegia facciale, anomalie del comportamento visivo, difficoltà di suzione e deglutizione. Spesso è necessario un supporto respiratorio prolungato. Un coinvolgimento multiorgano in questo gruppo è meno frequente, ma possibile, verosimilmente perché la minore durata dell'insulto riduce la possibilità di una deviazione del sangue dai comparti periferici al cervello.

Le manifestazioni neurologiche a lungo termine consistono in paralisi cerebrale discinetica o mista spastico-discinetica, associata a disfunzione tronco-encefalica con difficoltà di suzione, deglutizione e frequenti ingesti. L'epilessia può essere presente ed è il segno di un interessamento della lesione esteso alle regioni corticali, in particolare a lesioni degli ippocampi e della corteccia perirolandica (Swaiman KF, 2006).

1.4. EII E CASCATA NEUROTOSSICA

La maggior parte degli studi di laboratorio sul flusso ematico cerebrale e la perfusione rilevano che la maggior parte degli insulti nel feto e nel neonato è il risultato della combinazione di ipossia e ischemia piuttosto che dell'ipossia da sola (Vannucci RC, 1990).

Non esistono infatti evidenze del fatto che una ipossiemia acuta possa danneggiare il cervello di un feto o di un neonato a meno che non ci sia una ischemia (Johnston MV, 1995). Questo rispecchia sia l'aumentata resistenza del cervello immaturo all'ipossia, se paragonato a quello dell'adulto, sia la rilevanza dei suoi meccanismi protettivi. Esiste anche un consenso rispetto al fatto che una EII che segue una grave asfissia è il risultato di un danno che evolve per una cascata di eventi biochimici (Sarnat HB, 1976; Towfighi J, 1995; Albeni BC, 1999). E' largamente riconosciuto che la cascata di eventi che si verifica durante una EII è accompagnato da un incremento dell'eccitabilità neuronale con frequenti crisi epilettiche e anomalie elettrofisiologiche (Sarnat HB, 1976; Towfighi J, 1995; Albeni BC, 1999; Williams CE, 1992). Queste osservazioni cliniche sono supportate dall'evidenza in studi di laboratorio che agenti farmacologici che bloccano il recettore NMDA del Glutammato proteggono il tessuto cerebrale dal danno ipossico ischemico se somministrati subito prima o durante una EII (McDonald JW, 1987; Hattori H, 1989; Hagberg H, 1994).

Quando eccitati da eccessivi livelli di Glutammato, i neuroni e altre cellule con recettori Glutammatergici possono andare incontro a una morte progressiva. Livelli eccessivi di Glutammato sinaptico e di altri neurotrasmettitori eccitatori come la Glicina, insieme con la depolarizzazione della membrana, possono contribuire all'apertura dei recettori del Glutammato del tipo NMDA, lasciando entrare il Calcio all'interno della cellula (Myers RE, 1972; Delivoria-Papadopoulos M, 1998). I canali NMDA si aprono passivamente quando il potenziale di membrana si riduce, anche se i livelli di Glutammato non sono alti (Novelli A, 1988; Hammond C, 1994). L'espressione età-dipendente delle subunità dei recettori del NMDA a favore di quelli con tempi di apertura prolungati e maggiore afflusso di Calcio potrebbe essere responsabile dell'incremento della degenerazione NMDA-mediata che si osserva in modelli di animali neonati (McDonald, 1988; Monyer H, 1993). Anche i recettori alfa-amino-3-idrossi-5-metil-isoazolo-4-propionato (AMPA) sembrano

rivestire un ruolo nell'innescare della cascata eccitotossica che risulta nella morte neuronale. Gli effetti del Calcio diretto e mediato dalla formazione di Ossido Nitrico Calcio-dipendente contribuiscono al danno cellulare. L'attivazione di lipasi, proteasi, incluse le citochine pro-infiammatorie contribuisce anch'essa all'insulto eccitotossico scatenato dall'ipossia-ischemia (Hara H, 1997; Hagberg H, 1997; Hagberg H, 1996). L'osservazione sperimentale che la somministrazione di bloccanti ai recettori NMDA diventa inefficace oltre 2 ore dopo l'insulto ipossico ischemico, suggerisce che questa cascata rapidamente diventa ingravescente e indipendente dai meccanismi che l'hanno innescata (McDonald JW, 1987; Hagberg H 1994). Questo verosimilmente contribuisce al ritardo nell'espressione della neurodegenerazione che si verifica nell'EII.

I mitocondri sembrano rivestire un ruolo cruciale nel destino delle cellule sottoposte a ipossia (Ankarcrona M, 1995; Abe K, 1998; Gilland E, 1998). I mitocondri sono responsabili di molteplici reazioni ossidative che possono produrre elevati livelli di radicali tossici in condizioni di stress ossidativo. Essi racchiudono la maggior parte del calcio intracellulare e possono divenire sovraccarichi di calcio citoplasmatico per l'apertura dei canali NMDA e voltaggio-dipendenti. Una riduzione della funzionalità mitocondriale può portare ad una riduzione dell'energia necessaria per mantenere i gradienti di membrana ionica, perpetuando potenzialmente un circolo vizioso di depolarizzazione di membrana e apertura dei canali NMDA (McDonald JW, 1990; Novelli A, 1988). Inoltre, una disfunzione mitocondriale durante l'EII potrebbe contribuire alla persistenza delle crisi e a anomalie EEG come il pattern di burst suppression (Thoresen M, 1996).

La neurodegenerazione che segue l'ipossia-ischemia può assumere la forma di necrosi o apoptosi, e questo dipende grandemente dall'intensità della disfunzione mitocondriale (Ankarcrona M, 1995). E' stato infatti dimostrato in colture cellulari che un insulto ipossico lieve può produrre una sia una rapida necrosi che una apoptosi ritardata. Insulti intensi producono rapida perdita del potenziale di membrana mitocondriale, riduzione della

produzione di ATP ed esplosione della membrana nucleare e citoplasmatica. Dall'altro lato, insulti meno intensi determinano un alternarsi di perdita e recupero del potenziale di membrana mitocondriale, con, in ultimo, frammentazione della cromatina e raggrinzimento del nucleo. L'apoptosi implica l'attivazione di un programma di "suicidio" cellulare, ed alcuni suoi componenti molecolari sono stati individuati in tessuto cerebrale dopo insulto ipossico ischemico nell'uomo e in modelli animali (Edwards AD, 1997; Beilharz EJ, 1995; Pulera MR, 1998; Yue X, 1997). Studi comparativi tra animale e uomo sull'EII suggeriscono che il meccanismo di apoptosi potrebbe essere prevalente nel cervello immaturo (McDonald HW, 1997; Li Y, 1998).

Un concetto molto importante nella caratterizzazione delle lesioni da EII, è quello di selettività del danno ipossico ischemico verso alcune strutture cerebrali, dimostrato nell'uomo in particolare attraverso l'utilizzo della Risonanza magnetica (RM).

1.5. VULNERABILITA' NEURONALE SELETTIVA

Diversi episodi di ipossia-ischemia abbastanza severi da causare un danno nel cervello immaturo possono causare un danno variabile in diverse selezionate strutture piuttosto che un insulto globale diffuso (Volpe JJ, 1997; Rivkin MJ, 1997). Queste diversità possono risultare in diversi pattern clinici di paralisi cerebrale, come ad esempio una paralisi cerebrale discinetica per prevalente coinvolgimento delle strutture dei gangli della base o spastica per prevalente coinvolgimento della corteccia rolandica o della sostanza bianca discendente. La RM negli ultimi decenni ha permesso di descrivere pattern di danno nell'EII, in particolare lesioni simmetriche a livello dei talami, del putamen e della corteccia cerebrale perirolandica dopo un'asfissia severa o subtotale nel neonato a termine (Menkes JH, 1994; Barkovich AJ, 1995; Hoon AH, 1997; Roland EH, 1998; Pasternak JF, 1998; Maller AI, 1998). Lesioni associate del tronco-encefalo sono anch'esse abbastanza comuni. Generalmente nei pazienti con EII la sostanza bianca periventricolare è

risparmiata, ma una alterazione del segnale transitoria della porzione posteriore della capsula interna è descritta come indice di danno nelle strutture adiacenti (Pasternak JF, 1998; Rutherford MA, 1998). Sebbene il meccanismo fisiopatologico di questo tipo di danno sia solo parzialmente noto nei neonati, esistono diverse consistenti evidenze da dati di laboratorio così come da studi sperimentali nell'uomo che questo pattern è il risultato di una disfunzione specifica di alcuni circuiti neuronali eccitatori che innescano la morte neuronale selettiva (McDonald JW, 1990). La corteccia perirolandica, il putamen e il talamo in particolare sembrano vulnerabili all'asfissia per il loro marcato grado di attività dovuto agli input Glutamatergici. L'iperattività di questi circuiti eccitatori durante l'EII predispone queste strutture alla eccitotossicità mediata dal Glutammato (Sarnat HB, 1976; Olney JW, 1986). Dall'altro lato, l'iperattivazione in questi circuiti dovrebbe inibire i segmenti interno e esterno del globo pallido, che tendono a non essere coinvolti nell'asfissia, come dimostrato anche alla RM (Hoon AH, 1997). Esistono diverse evidenze dall'imaging funzionale di un accelerato metabolismo del glucosio nelle regioni dei gangli della base e della corteccia rolandica (Blennow M, 1995). Diverse evidenze supportano l'ipotesi che il metabolismo del glucosio sia direttamente collegato all'attività delle sinapsi eccitatorie Glutamatergiche (Sokoloff L, 1999; Pfund Z 2000), ed in particolare che esso sia il risultato di un incremento del rilascio di Glutammato sinaptico. Diversi dati sperimentali a supporto della selettività del danno neuronale trovano la loro ragione nel fatto che le strutture più vulnerabili, quindi il putamen, il talamo e la corteccia perirolandica, abbiano un diretto coinvolgimento in circuiti maturativi eccitatori (Johnston MV, 2000). Al contrario, altre aree potrebbero essere meno vulnerabili perché i loro circuiti eccitatori sono ancora scarsamente sviluppati in epoca neonatale (Johnston MV, 2001). Questo meccanismo sembra verosimilmente legato a proprietà intrinseche dei neuroni di diverse aree piuttosto che a una proprietà primaria della distribuzione del circolo.

2. NEUROPROTEZIONE

2.1. ASPETTI MOLECOLARI

Dal momento della scoperta di potenti agenti in grado di promuovere la sopravvivenza cellulare attraverso un effetto neuroprotettivo, è stato ipotizzato il loro impiego nel trattamento di patologie del sistema nervoso centrale (Johnston MV, 2011; Gunn AJ, 1999). Anche l'effetto protettivo sui neuroni, e verosimilmente su molti altri tipi di cellule, potrebbe essere mediato da interazioni extracellulari ligando-recettore e dall'attivazione di specifiche cascate di segnale intracellulare. A livello del SNC, questi segnali sono costituiti in gran parte da fattori di crescita neurotrofici come il Nerve Growth factor (NGF), il fattore di crescita dei fibroblasti (FGFs), la Neurotropina (NT)-3, l'Insulin-like growth factor (IGF), il Fattore di Crescita Ciliare Neurotrofico (CNTF) e il Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (Holtzman DM, 1996, Johnston BM, 1996). Questi fattori neurotrofici supportano la crescita, la differenziazione, la maturazione, il mantenimento e la sopravvivenza neuronale ed hanno dimostrato possedere un'attività neuroprotettiva in molte popolazioni neuronali dopo un insulto ipossico. Per valutare l'efficacia terapeutica di alcuni di questi fattori bisogna considerare le evidenze a favore del loro potenziale protettivo nei confronti della morte neuronale e della disfunzione cellulare di particolari popolazioni neuronali in certi momenti dello sviluppo. Il fattore di crescita neurotrofico BDNF e il suo recettore proteico Tirosin Kinasi (Trk B) sono espressi in un'ampia gamma di sottopopolazioni neurali, e si ritiene che abbiano un marcato effetto protettivo nei confronti della perdita tissutale dovuta all'EII perinatale. La somministrazione intraventricolare di BDNF sembra attenuare l'effetto dell'EII nel ratto neonato di 7 giorni (Cheng Y, 1997). Questa risposta sembra tuttavia limitata a stadi specifici e precoci dello sviluppo cerebrale del ratto e si esaurisce rapidamente. La Neurotropina NGF, che funziona come recettore Tirosin Kinasi A (Trk A), sembra avere un effetto protettivo a

partire dal VII giorno post insulto ipossico in un modello di ratto. Il NGF potrebbe manifestare il suo effetto attraverso l'inibizione dell'apoptosi, poiché la carenza di NGF, indotta utilizzando inibitori delle Caspasi, causa l'apoptosi dei neuroni dei gangli simpatici. L'IGF viene infine anch'esso considerato un potenziale agente protettivo contro l'insulto ipossico in un modello ovino. Il trattamento con IGF-1 sopprime la morte oligodendrogliale e aumenta il grado di mielinizzazione dopo l'ischemia nel modello di feto di pecora vicino all'epoca del termine (Guan J, 2001). Un ulteriore fattore il cui effetto neuroprotettivo è stato dimostrato nell'insulto perinatale è il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF-1), il cui effetto come promotore della crescita e della differenziazione cellulare è stato ampiamente dimostrato. Fattori della famiglia FGF sono inoltre espressi dalle cellule in risposta ad un insulto ipossico-ischemico. Tuttavia, solo per il FGF-1 sono note le capacità di attivare la variante cerebrale del recettore FGF, pertanto esso potrebbe essere l'unico a rivestire un effettivo ruolo nella neuroprotezione.

Per quello che riguarda la cascata di segnale intracellulare attraverso la quale i fattori di crescita promuovono la sopravvivenza cellulare, ed in particolare delle cellule neuronali, essa è scarsamente conosciuta. L'effetto di promozione della sopravvivenza cellulare da parte delle neurotropine è sostenuto attraverso l'attivazione di diversi meccanismi intracellulari, che dipendono da caratteristiche quali il tipo cellulare, le caratteristiche colturali, e dalla tipologia dell'insulto ipossico. Inoltre, l'abilità di diversi fattori neurotrofici di influenzare l'attività delle cellule neuronali varia durante lo sviluppo, ed i meccanismi attraverso cui questo effetto viene regolato sono anch'essi largamente sconosciuti.

Una molecola che recentemente ha suscitato notevole interesse nell'ambito della neuroprotezione è l'Eritropoietina, originariamente caratterizzata come proteina derivata dal rene, che regola la produzione di cellule della serie rossa. Essa ha un potente effetto a livello del sistema nervoso centrale. I recettori eritropoietinici sono abbondantemente

espressi nel cervello dei mammiferi in via di sviluppo e l'Eritropoietina sembra rivestire un effetto neuroprotettivo e neurotropico, attraverso anche l'induzione di fattori anti-apoptotici, attraverso la soppressione dell'infiammazione e attraverso un effetto antiossidante (Wu YW, 2012; Elmahdy H, 2010; Xiong T, 2011).

2.2. NEUROPROTEZIONE NELL'EII NEONATALE

Gli studi in merito a meccanismi coinvolti nel danno ipossico ischemico neuronale e a potenziali fattori neuroprotettivi sono complessivamente incoraggianti in merito alla possibilità di sviluppare protocolli di neuroprotezione per il danno ipossico-ischemico neonatale. Ad oggi è difficile prevedere quali neonati andranno incontro a rilevanti sequele neurologiche, considerando che il 30% di neonati che presentano una encefalopatia ipossico-ischemica di grado moderato andrà incontro ad uno sviluppo normale. Studi su modelli animali hanno dimostrato che il cervello immaturo risponde in modo diverso al trattamento rispetto al cervello adulto. Inoltre, non si può escludere che agenti che hanno un effetto benefico nel cervello adulto possano invece avere un effetto deleterio nel neonato, peggiorando il quadro clinico promuovendo la cascata apoptotica. Il controllo dell'apoptosi, come già riportato, coinvolge il bilanciamento nell'espressione di molti fattori pro-apoptotici e anti-apoptotici, offrendo molti spunti per un intervento a favore di un outcome migliore. Inoltre, il ritardo nell'attivazione della cascata delle caspasi dopo l'insulto ipossico-ischemico suggerisce la presenza di una finestra terapeutica prolungata durante la quale gli effetti di un'attivazione indotta di circuiti che promuovano la sopravvivenza cellulare attraverso meccanismi trascrizione dipendenti e trascrizione indipendenti possano essere cruciali nella promozione della sopravvivenza cellulare. E' inoltre possibile che l'ipotermia, considerata ad oggi una delle strategie di neuroprotezione più efficaci nell'insulto ipossico-ischemico, possa rallentare o ridurre la cascata eccitotossica alterando il processo che conduce all'apoptosi. Un dato rilevante è costituito

dal fatto che nell'encefalopatia ipossico ischemica di grado severo la fase latente che intercorre tra la fase di danno neuronale primario e secondario, cioè la fase tra il ristabilirsi di un flusso cerebrale normale e quindi di un normale profilo metabolico, e l'inizio della fase di insulto secondario, appare ridotta rispetto alla EII moderata e la carenza energetica secondaria risulta maggiore; questo rende gli interventi di neuroprotezione meno efficaci, almeno in teoria, nell'EII di grado severo (Swaiman KF, 2006; Shankaran S, 2012).

Prima dell'introduzione di terapie neuroprotettive come l'ipotermia, la gestione del paziente con EII era limitata al supporto dei parametri vitali, alla rianimazione perinatale successiva alla stabilizzazione emodinamica e respiratoria, alla correzione dei disequilibri metabolici, al trattamento delle crisi epilettiche e al monitoraggio dell'eventuale disfunzione multiorgano (Shankaran S, 2012).

2.3. IPOTERMIA

Attualmente l'intervento neuroprotettivo che è stato dimostrato avere maggior effetto nell'EII è l'ipotermia moderata. Essa si ottiene attraverso la riduzione della temperatura corporea di 3-4°C mediante appositi presidi. Studi sperimentali condotti nell'animale dimostrano che l'abbassamento della temperatura corporea di 2-4°C dopo l'ischemia riveste un effetto protettivo nei confronti del danno neuronale e della morte cellulare, migliorando l'outcome neurologico e neurocomportamentale (Wagner BP, 2002). Esistono una serie di meccanismi descritti a favore del ruolo neuroprotettivo dell'ipotermia. Essa può agire modificando il programma di apoptosi, a favore della sopravvivenza cellulare (Gunn AJ, 1997; Bona E, 1998). In un modello di maiale neonato, 12 ore di ipotermia moderata dopo la rianimazione riducono significativamente il numero di cellule apoptotiche, ma non quello di cellule necrotiche (Tooley JR, 2003). L'ipotermia inoltre protegge il tessuto cerebrale attraverso la riduzione della richiesta metabolica, riducendo il rilascio di aminoacidi eccitatori (Glutammato, Dopamina), migliorando l'uptake del

Glutammato sinaptico alterato dall'ischemia ed abbassando la produzione di Ossido Nitrico tossico e di altri radicali liberi.

Diversi modelli sperimentali di animali a termine e pretermine hanno dimostrato che la riduzione della temperatura corporea di 2-3 gradi Celsius immediatamente successiva a un insulto ipossico ischemico aumenta le performance in test specifici, riducendo il numero di neuroni persi alla valutazione istologica del tessuto cerebrale. Nel feto ovino a termine, una riduzione significativa di neuroni è stata osservata per una temperatura extradurale di 35 gradi Celsius. Modelli inoltre di calcolo della temperatura suggeriscono che è necessario scendere al di sotto di 35 gradi Celsius sistemici per ottenere una riduzione della temperatura cerebrale profonda. L'ipotermia terapeutica, secondo quindi quanto dimostrato negli studi sperimentali, dovrebbe abbassare la temperatura corporea delle strutture profonde cerebrali più vulnerabili all'insulto ipossico-ischemico, i gangli della base, a 32-34 gradi Celsius (Gunn AJ, 2009; Eicher DJ, 2005; Gluckman PD, 2005).

Per molti anni, è stato dimostrato che un'ipotermia profonda, inferiore ai 28 gradi Celsius, è necessaria per ottenere un effetto neuroprotettivo durante l'arresto cardiaco o nelle procedure chirurgiche a cuore aperto. Esistono inoltre almeno tre review di Cochrane sugli effetti benefici del raffreddamento in seguito a traumi cranici nell'adulto, dopo stroke o nella chirurgia per bypass coronarico (Den Hertog HM, 2009). Non esiste evidenza tuttavia ad oggi basata su studi randomizzati controllati a supporto dell'utilizzo dell'ipotermia per il trattamento sia del trauma cranico che dello stroke, o per la prevenzione del danno neurologico dopo interventi per bypass arterioso coronarico.

L'ipotermia moderata sembra essere ben tollerata in un'ampia varietà di modelli animali, così come in studi nell'uomo. Non ci sono evidenze di effetti avversi rilevanti in quattro studi pilota sull'ipotermia in neonati (Gunn AJ, 1998). Effetti avversi quali bradicardia sinusale, aumento della pressione sanguigna e incremento di bisogno di ossigeno, risultano tutti effetti transitori e reversibili con il riscaldamento.

Due metodi nel bambino con encefalopatia ipossico ischemica sono stati utilizzati per l'induzione di una ipotermia cerebrale: i) l'ipotermia *whole body* (Shankaran S, 2005) e ii) il raffreddamento selettivo del capo (Gunn AJ, 1998). Il raffreddamento sistemico si basa sul principio che la temperatura corporea interna e quella delle strutture cerebrali profonde sono simili. Il razionale su cui si basa l'ipotermia selettiva è che il cervello del neonato produce il 70% del calore corporeo e che l'ipotermia sistemica può essere dannosa al neonato in condizioni di sofferenza. Inoltre, gli effetti avversi del raffreddamento sistemico possono essere ridotti raffreddando selettivamente il cervello. Tuttavia, sulla base del modello teorico precedentemente citato per rappresentare il modello di abbassamento della temperatura all'interno del cervello del neonato suggerisce che una possibile ottimale situazione in grado di determinare una significativa riduzione della temperatura delle strutture profonde è quando la temperatura corporea interna è abbassata a almeno 34 gradi Celsius. Questo implica che è necessario abbassare la temperatura sistemica per ottenere un reale abbassamento della temperatura cerebrale.

2.4. EVIDENZE DEGLI EFFETTI CLINICI DELL'IPOTERMIA NELL'EII

In due recenti review (Jacobs S, 2013; Jacobs S, 2007) si afferma che 72 ore di ipotermia moderata, iniziata entro 6 ore dalla nascita nei bambini con encefalopatia ipossico-ischemica moderata o severa, determinano una riduzione della mortalità e della disabilità neuropsichica valutate tra i 18 e i 24 mesi di età. La review include 11 trial randomizzati controllati e mostra un livello significatività statistica per una riduzione del rischio relativo (RR) di mortalità e disabilità neuropsichica severa combinate del 25%. Valutando in modo separato i risultati in due gruppi, sulla base della gravità dell'encefalopatia, questa riduzione di rischio appare presente sia nel gruppo di pazienti con encefalopatia moderata che in quello che encefalopatia di grado severo. Per quello che riguarda invece la stratificazione in gruppi per gravità di EEG al reclutamento, il trattamento con ipotermia

sembra mostrare un effetto significativo sulle misure di outcome primario sia nel sottogruppo di EEG con anomalie di grado moderato che severo, mentre i pazienti con EEG severo non sembrano mostrare una riduzione significativa del tasso di disabilità maggiori agli outcome secondari. Se si considera invece il grado di alterazione dell'aEEG al reclutamento non viene riportata una riduzione di mortalità o disabilità severa nel sottogruppo con aEEG severo; in particolare c'è una riduzione della disabilità severa, ma non della mortalità. Si evince pertanto che il trattamento con ipotermia generalizzata ha un effetto globalmente positivo in neonati con encefalopatia ipossico-ischemica, ma alcune minime differenze possono dipendere dalla diversa gravità di alcuni parametri al reclutamento. Sia la mortalità che il rischio di disabilità maggiore risultano ridotti in bambini trattati con ipotermia rispetto ai controlli, ed in particolare la mortalità si riduce senza determinare un aumento del rischio di disabilità maggiore. Nonostante un incremento di trombocitopenia e ipotensione, i benefici del trattamento con ipotermia rendono questi effetti avversi trascurabili.

Complessivamente quindi esistono molte evidenze rispetto all'effetto terapeutico dell'ipotermia nell'EII, e molti centri in tutto il mondo hanno introdotto questo trattamento come standard di assistenza. Nel 2010, l'International Liaison Committee on Resuscitation (ILCOR) ha raccomandato di inserire l'ipotermia terapeutica come trattamento nell'encefalopatia di grado moderato o severo (Perlman J, 2010). Sebbene quindi l'utilizzo dell'ipotermia sia diventato routinario, esistono ancora moltissimi ambiti di studio ad essa correlati. Ad esempio, mentre studi nell'animale hanno dimostrato che l'ipotermia è efficace se applicata entro 6 ore dalla nascita (Gunn AJ, 1998), sono in corso alcuni studi sull'utilità dell'ipotermia applicata anche tardivamente (Jacobs SE, 2013).

2.5. IPOTERMIA “PLUS”

Se l'ipotermia è quindi uno standard approvato nell'EII, negli ultimi anni è cresciuto l'interesse per la somministrazione precoce di farmaci o molecole ad azione neuroprotettiva in aggiunta all'ipotermia (ipotermia “plus”). In modelli animali sono stati effettuati esperimenti incoraggianti basati sull'utilizzo dello xenon (Chakkarapani E, 2010), seguiti da trial in corso sull'utilizzo dello xenon in associazione all'ipotermia (Thorensen 2009). Anche l'Eritropoietina è oggetto di studio in trial (Iwai M, 2010; Fan X, 2011). Limitata rimane tuttavia la letteratura in merito a possibili farmaci con effetto neuroprotettivo provato in associazione all'ipotermia. Recentemente è stato pubblicato uno studio retrospettivo sull'effetto del Fenbarbitale (FB) somministrato prima dell'inizio del trattamento con ipotermia (Sarkar S, 2012). I risultati sembrano non mostrare significativi benefici sull'outcome a breve termine, sebbene diversi potrebbero essere gli effetti valutabili a lungo termine. Lo studio mostra che i pazienti che hanno ricevuto il barbiturico prima del trattamento hanno un incremento di exitus correlato alla EII ed un aumento delle anomalie alla RM. Esistono invece evidenze nell'animale del fatto che l'esposizione al FB possa portare ad una degenerazione apoptotica delle cellule neuronali del cervello immaturo a concentrazioni che hanno un effetto terapeutico nel bambino con epilessia. Inoltre, l'effetto negativo del FB si manifesterebbe anche come interferenza verso la proliferazione e migrazione cellulare, arborizzazione assonale, sinaptogenesi e plasticità sinaptica.

Per quello che riguarda eventuali protocolli di neuroprotezione “plus”, altre molecole che hanno dimostrato una certa efficacia almeno in modelli animali sono il Levetiracetam, la N-acetilcisteina e la Melatonina (Jacobs SE, 2013). E' stato recentemente dimostrato che in un modello di EII nel ratto, la somministrazione di Topiramato (TPM), un farmaco antiepilettico con effetto AMPA antagonista, sembra attenuare il danno cerebrale e migliorare l'outcome funzionale (Filippi L, 2009); questo effetto sembra superiore a quello

di ciascun trattamento (ipotermia vs TPM) somministrato singolarmente (Shankaran S, 2012).

PARTE SPERIMENTALE

3. SCOPO DELLO STUDIO

Diversi studi sperimentali in vitro e in vivo in modelli animali, hanno dimostrato che sia l'ipotermia che il TPM possono ridurre il danno neuronale post-ischemico. Nessuno studio ha investigato se la combinazione di questi due presidi possa avere un effetto additivo rispetto al loro potenziale neuroprotettivo nell'EII del neonato a termine. Gli effetti dell'ipotermia sulle proprietà farmacocinetiche del TPM sono stati recentemente studiati nel neonato, ed è stato dimostrato che nonostante il trattamento con ipotermia il metabolismo del farmaco appare conservato nelle sue caratteristiche e il range terapeutico plasmatico si mantiene costante, anche in associazione ad altri farmaci anticonvulsivanti (Filippi L, 2009).

E' stato quindi ipotizzato che la combinazione del trattamento con ipotermia moderata *whole body* associata alla somministrazione di TPM sia grado di aumentare le proprietà neuroprotettive dell'ipotermia nel trattamento dell'EII.

I principali obiettivi dello studio sono stati perciò:

- 1) Valutare l'efficacia del TPM in aggiunta all'ipotermia nel trattamento dell'encefalopatia ipossico ischemica del neonato a termine. Questo dato è stato valutato mediante la determinazione di misure di outcome a breve-medio e lungo termine. Le misure di outcome comprendono oltre a misure primarie di mortalità e disabilità severa, anche test standardizzati per la quantificazione dello sviluppo neurologico, neuropsichico, visivo e comportamentale dei pazienti reclutati.
- 2) Valutare l'effetto della somministrazione di Topiramato sulle caratteristiche dei pattern di Risonanza magnetica (RM) che si riscontrano in pazienti con EII sottoposti a ipotermia; in un sottogruppo di pazienti, applicare una metodica avanzata di perfusione in RM (Arterial Spin Labeling, ASL), per valutare modificazioni della

perfusione a medio termine eventualmente indotte dal trattamento nei pazienti che hanno ricevuto il TPM rispetto ai controlli.

- 3) Confermare la sicurezza della somministrazione di TPM nei neonati con encefalopatia ipossico ischemica, considerando che il profilo di tollerabilità del farmaco è già stato dimostrato come buono in neonati trattati con ipotermia sistemica (Filippi et al, 2009), mentre consolidata è la somministrazione nel bambino o nell'adulto con epilessia. A questo proposito, parametri cardiologici e respiratori (frequenza cardiaca, pressione sanguigna, saturazione di ossigeno, supporto respiratorio) sono stati monitorati in modo costante durante il trattamento, insieme con il bilancio renale, epatico e metabolico, monitorati attraverso i parametri ematici.

4. METODI

4.1. DISEGNO DELLO STUDIO E CRITERI DI INCLUSIONE

Un trial multicentrico randomizzato controllato è stato disegnato per paragonare la tollerabilità e l'efficacia del TPM come terapia in aggiunta all'ipotermia moderata *whole body*. Tutti i pazienti che hanno soddisfatto i criteri di inclusione sono stati sottoposti a ipotermia sistemica moderata (33,5°C) per 72 ore e assegnati in modo randomizzato al gruppo di trattamento con ipotermia e TPM in associazione, o al gruppo di controllo, che ha ricevuto il solo trattamento con ipotermia. Un consenso informato è stato sottoscritto dai genitori al momento del reclutamento.

Sono stati reclutati nello studio i neonati afferiti presso due centri (Ospedale Santa Chiara, Pisa e Ospedale pediatrico Meyer, Firenze), di età gestazionale superiore a 36 settimane e con peso superiore o uguale a 1800 grammi, che abbiano soddisfatto i seguenti criteri di inclusione.

- 1) Criterio metabolico.
 - a) Punteggio di Apgar < o uguale 5 a 10 minuti dalla nascita;
 - b) persistente necessità di rianimazione, inclusa la ventilazione per via endotracheale o con maschera, prolungata oltre 10 minuti dopo la nascita;
 - c) acidosi con pH < 7.00 e/o deficit di basi > o uguale a -16 mmol/L (12 mmol/L secondo recenti modifiche delle linee guida) su sangue cordonale, arterioso, venoso o capillare che si manifesta entro 60 minuti dalla nascita.
- 2) Criterio neurologico (Sarnat e Sarnat modificato): encefalopatia da moderata a severa, che consiste in uno stato di coscienza alterato (irritabilità, letargia, stupore e coma) e almeno uno tra i seguenti segni:
 - a) ipotonia;

- b) riflessi anormali, incluse anomalie dell'oculomozione o dei riflessi pupillari;
 - c) assenza o debolezza del riflesso di suzione;
 - d) crisi epilettiche.
- 3) Criterio di gravità dell'elettroencefalogramma ad ampiezza integrata (aEEG):
- a) aEEG moderatamente alterato, intendendo un tracciato con margine superiore $>10 \mu\text{V}$ e margine inferiore $<5 \mu\text{V}$;
 - b) aEEG gravemente alterato, intendendo un tracciato con margine superiore $<10 \mu\text{V}$ e margine inferiore $<5 \mu\text{V}$; spesso questo pattern è associato a burst di attività ad alto voltaggio (*burst-suppression*, BS). Le crisi epilettiche sono descritte come periodi di improvviso incremento del voltaggio, accompagnato da un restringimento della banda di attività aEEG, seguito da un breve periodo di *suppression*, o dal costituirsi di una attività ritmica di ampiezza crescente e di frequenza ridotta.

Sono stati esclusi dallo studio i neonati che hanno assolto i seguenti criteri di esclusione.

- 1) Neonati di età gestazionale inferiore alle 36 settimane o di peso alla nascita inferiore ai 1800 gr, o arrivati presso la Terapia Intensiva Neonatale (TIN) dopo le 6 ore di vita.
- 2) Neonati con anomalie congenite maggiori o altre sindromi che includono malformazioni cerebrali, infezioni virali congenite o evidenza di una encefalopatia di diversa natura dall'EII.
- 3) Rifiuto del consenso informato.

I pazienti reclutati sono stati randomizzati per il trattamento con Topiramato, in aggiunta all'ipotermia. La randomizzazione è stata eseguita stratificando i neonati arruolati in accordo ai criteri aEEG per distinguere tra EII moderata e grave, in modo da garantire la massima omogeneità clinica tra i due gruppi. La randomizzazione è avvenuta alternando la

somministrazione di Topiramato associato all'ipotermia, alla sola ipotermia per ciascuna classe di gravità.

4.2. IPOTERMIA E TOPIRAMATO

Tutti i pazienti nati presso il centro di reclutamento che hanno soddisfatto i criteri di inclusione sono stati trattati con ipotermia moderata (33.5°C) a partire entro 6 ore dalla nascita, per le successive 72 ore. I bambini nati presso centri periferici, sono stati inizialmente raffreddati a 35°C al punto nascita, evitando il riscaldamento con l'ausilio di *cooled gel packs* posti intorno al neonato, mantenendo la temperatura desiderata durante il trasporto in TIN. Durante il trasporto il neonato è stato assistito in modo da mantenere una temperatura rettale o esofagea intorno ai 35°C.

Ipotermia

Presso la TIN, tutti i neonati per i quali è stata confermata l'indicazione al trattamento con ipotermia sono trattati in incubatrici o su isole neonatali per facilitare il raffreddamento. La temperatura target è stata raggiunta entro 60 minuti e mantenuta utilizzando uno speciale materassino raffreddato ad acqua, servo-controllato. I neonati sono stati mantenuti nudi e coperti da un lenzuolo, con pannolino attorno alla metà inferiore dell'addome. La temperatura rettale o esofagea posta come obiettivo è stata di 33.5 °C (range da 33 a 34 °C). La temperatura corporea è stata misurata a livello rettale, almeno 2 cm dall'orifizio anale, o a livello esofageo, preferibilmente con una sonda a permanenza. Come previsto, la durata del trattamento con ipotermia è stata di 72 ore ed il servocontrollo del materassino ha garantito di mantenere la temperatura nel range stabilito per tutto il periodo. Se la riduzione della temperatura risultava insufficiente, il materassino raffreddante veniva avvolto attorno al neonato o venivano applicati dei cool packs. Quando il periodo di raffreddamento si è concluso (dopo 72 ore), o prima se imposto da circostanze cliniche, la temperatura rettale o esofagea è stata fatta risalire ad una velocità circa di 0.5°C/ora, fino al

valore di $37^{\circ}\text{C} \pm 0.2$, quindi il neonato ha raggiunto la temperatura normale in 6-12 ore dall'interruzione del raffreddamento. Se il riscaldamento spontaneo del neonato non risultava sufficiente, il calore è stato fornito da un pannello radiante; se la temperatura invece risaliva più rapidamente di 0.5°C per ora, il lettino di raffreddamento è stato utilizzato per controllare la risalita. Dopo il raggiungimento dell'eutermia, la temperatura del neonato è stata controllata per almeno 4 ore, al fine di prevenire eventuali ricadute della temperatura.

Un monitoraggio aEEG è stato iniziato al momento del reclutamento, proseguito durante tutta la durata dell'ipotermia e del riscaldamento per 24 ore, salvo diversa necessità clinica. La registrazione video-EEG-poligrafica è stata effettuata a 24 ore dall'inizio dell'ipotermia e successivamente secondo necessità cliniche. Per quello che riguarda lo studio EEG, la gravità delle anomalie è stata classificata ai fini dell'analisi statistica come segue: 1 - EEG normale sia nella veglia che nel sonno attivo e calmo, in alcuni casi possono essere presenti modeste anomalie parossistiche tipo onda lenta (OA), punte (P), punte-onda (PO); 2 - EEG moderatamente depresso (tra 30-50 microvolt), caratterizzato da ritmi con frequenza variabile dalla banda delta alla beta; il ciclo del sonno è presente ma spesso alterato; frequenti le crisi elettrocliniche; 3 - EEG marcatamente depresso (<10 microvolt) che appare prevalentemente inattivo e/o parossistico. Il ciclo del sonno è assente e possono essere presenti crisi; 4 - EEG a tipo suppression burst (SB): quadro caratterizzato da frequenti sequenze di durata > 1 sec. di attività isoelettrica, intervallate a bursts di attività lenta o parossistica.

I neonati reclutati e trattati sono stati costantemente monitorati, attraverso il rilievo di parametri respiratori ed emodinamici, misurati prima dell'inizio dell'ipotermia (t_0) e a tempi successivi (in ore, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72) dall'inizio dell'ipotermia e al termine del processo di riscaldamento. Sono stati misurati parametri

respiratori, cardiaci, saturazione di ossigeno (SaO₂), frazione inspirata di ossigeno (FiO₂) e pressione cardiaca.

Tutti i neonati inoltre sono stati monitorati rispetto ai seguenti parametri ematochimici: emogas-analisi (parametro corretto per la temperatura cardiaca), elettroliti, funzionalità renale ed epatica, creatin kinasi (CK), e creatin kinasi isoenzima MB (CKMB), lattico deidrogenasi (LDH), troponina IC, emocromo con formula leucocitaria, proteina C reattiva, pro-calcitonina e assetto coagulativo. L'assunzione di liquidi iniziale è stata di 60-70 ml/kg e aumentata di 10-20 ml/kg ogni giorno, in base al peso e al livello degli elettroliti. Solo una piccola quantità di nutrizione per via enterale con latte umano è stata permesso nel primo giorno di vita. In caso di insufficienza respiratoria, il neonato è stato posto in ventilazione assistita. I bambini che hanno presentato crisi epilettiche, sono stati trattati con Fenobarbitale (dose carico: 20 mg/Kg; a seguire da 1.5-2.5 mg/Kg ogni 12 ore). In caso di insuccesso del barbiturico, è stato utilizzato il Midazolam con bolo di 0.15 mg/Kg, seguito da infusione continua (1µg/Kg/min), aumentato di 0.5-1µg/Kg/min ogni 2 minuti fino ad una risposta favorevole, utilizzando una dose massima di 18 µg/Kg/min. In caso di ipotensione (definita come una pressione arteriosa media <40 mmHg), è stato somministrato un singolo o multiplo bolo salino (10-20 ml/kg), in caso di refrattarietà, sono state progressivamente aggiunte: dopamina, dobutamina, norepinefrina, terlipressina (Filippi L, 2009). I neonati hanno ricevuto analgesia con Fentanyl alla dose di 1µ/kg/h, per agitazione e abbassamento della soglia del dolore causati dall'ipotermia.

Topiramato

Il Topiramato (TPM) è un farmaco anticonvulsivante, ampiamente utilizzato nell'adulto e nel bambino, dotato di caratteristiche di buon assorbimento, ampia biodisponibilità e buona tollerabilità (Guerrini R, 2006). I meccanismi d'azione del TPM sono diversi, ed alcuni coinvolgono l'inibizione dei recettori del Glutammato e del Kainato, con possibilità di esercitare un effetto di neuroprotezione. Il TPM ha infatti dimostrato di possedere un

effetto neuroprotettivo sia in vitro che in vivo in modelli animali, ed è stato recentemente proposto come farmaco neuroprotettivo nello stroke ischemico e nel danno ipossico ischemico neonatale (Kurul SH, 2009; Sfaello I, 2005). In colture neuronali, il danno cellulare indotto dalla carenza di ossigeno e glucosio e il livello di Glutammato eccitotossico si sono dimostrati sensibili e significativamente abbassati dall'impiego del TPM. In modelli animali di ischemia transitoria globale, l'impiego di TPM endovenoso, endoperitoneale o orale riduce la severità del danno cerebrale sia da solo che in associazione all'ipotermia, attraverso un meccanismo dose-dipendente, con una somministrazione variabile tra 5-200 mg/kg, generalmente in una singola dose (Lee SR, 2000; Edmonds HL, 2001; Liu Y, 2004). Il meccanismo neuroprotettivo del TPM sembra correlato non solo all'inibizione dei recettori AMPA e Kainato, ma anche al blocco dei canali del Sodio, delle correnti di Calcio voltaggio dipendenti, dell'isoenzima anidrasi carbonica e della permeabilità mitocondriale (Choi JW, 2007).

Ad oggi, nessuno studio clinico è stato pubblicato al fine di dimostrare un'azione additiva o sinergica del TPM in combinazione con l'ipotermia nel neonato con EII. Recentemente è stata dimostrata la sicurezza dell'impiego a breve termine del TPM nel neonato, in modo tale da assicurare rispetto alla possibilità di utilizzarlo con finalità neuroprotettiva (Filippi L, 2009). Bisogna inoltre considerare che la differenza tra la dose efficace e quella tossica è ampia per il TPM, e che inoltre una breve durata di terapia sembra limitare grandemente gli effetti collaterali del farmaco. Un effetto di morte neuronale è stato riportato per dosaggi superiori ai 50 mg/kg, che sono però enormemente maggiori delle dosi comunemente utilizzate a scopo neuroprotettivo. Gli effetti a lungo termine del TPM, somministrato precocemente, sulle funzioni cognitive non sono mai stati misurati nell'uomo. Necessario considerare, tuttavia, che in modelli animali di asfissia nei quali è stato utilizzato il TPM, non è stato dimostrato nessun effetto cognitivo a lungo termine; in

modelli di roditori neonati epilettici, anzi il TPM ha dimostrato una maggiore sicurezza di barbiturici o delle benzodiazepine.

Il Topiramato (Topamax, Janssen-Cilag, Cologno Monzese, Milan, Italy), è stato somministrato attraverso capsule gastroresistenti, all'inizio dell'ipotermia per i primi 3 giorni di vita, in 3 dosi complessive. La dose somministrata è stata di 10 mg/Kg/die, con misurazione della concentrazione plasmatica per ciascun paziente su spot di sangue essiccato come descritto in un precedente studio pilota (Filippi L, 2009).

4.3. FOLLOW UP NEI PRIMI DUE ANNI DI VITA

La durata del follow-up neuropsichiatrico nei pazienti reclutati è di 24 mesi. Diversi aspetti del complesso sviluppo neuropsichico del bambino sono stati valutati in momenti prestabiliti durante questo periodo, attraverso il ricorso a test standardizzati in grado di offrire una misura quantitativa o semi-quantitativa dello sviluppo neurologico, del sistema visivo, delle competenze cognitive, comprensive di abilità extra-verbali, verbali e motorie. I pazienti reclutati sono stati pertanto valutati secondo un preciso timing a 1 settimana, 1 mese, 3, 6, 12, 18, 24 mesi di età. Gli strumenti utilizzati per la valutazione standardizzata dello sviluppo neurologico sono i seguenti.

a) Esame della funzionalità visiva (FV). La valutazione delle funzioni visive è stata effettuata ai 7-10 gg di vita, con protocollo neonatale (Ricci D, 2008) e all'età di 4,5, 6 e 12 mesi (Randò T, 2005). Tali batterie prevedono la valutazione dei movimenti oculari sia organizzati spontaneamente che in risposta ad un target per elicitare alcune competenze più specifiche. Esse valutano in modo standardizzato se esistono delle limitazioni ad esempio nella motricità oculare, la presenza di movimenti abnormi come il nistagmo, o la presenza di una problematica nella convergenza oculare. Sono comprensive della valutazione delle capacità di fissazione e di inseguimento, utilizzando un target bianco e nero, che viene mantenuto circa a 25 cm di distanza dal volto del bambino e viene spostato lentamente sul

piano orizzontale o verticale e descrivendo un intero arco. Un altro elemento è la valutazione della presenza o assenza della capacità di discriminazione dei colori, attraverso l'utilizzo di un target colorato rosso e giallo. L'acuità visiva viene valutata attraverso l'abilità di discriminazione di un target, costituito da una griglia con strisce verticali bianche e nere di larghezza decrescente, mantenuto a circa 40 cm di distanza dal volto del bambino, notando quale è la minima distanza che il bambino riesce a individuare, iniziando dalle strisce con maggiore distanza. Un altro dato che viene fornito dalle batterie, è la massima distanza alla quale il bambino riesce a fissare un target. Nella valutazione dei 4,5 mesi, oltre alle suddette si studia anche la stereopsi. Essa viene valutata con il Frisby test, il quale consiste nel posizionamento all'altezza del volto del bambino di un pannello con 4 riquadri, in uno dei quali è visibile un cerchio tridimensionale; la presenza di stereopsi viene valutata sulla base della capacità del bambino di indirizzare l'attenzione visiva verso il riquadro con il cerchio.

Il punteggio ottenuto dalla somministrazione a seconda dell'età dei protocolli standardizzati viene utilizzato come variabile continua. Alla valutazione ad 1 settimana il punteggio ottenuto può variare in modo continuo tra 0 e 14, dove 14 indica la performance migliore e 0 la peggiore; alle valutazioni a 4,5, 6, 12, 18 mesi il punteggio può variare in modo continuo tra 0 e 21, dove 21 indica la performance peggiore e 0 la migliore.

b) General Movements (GMs): sono stati valutati a 1 settimana, 1 mese e 3 mesi di età.

I GMs sono movimenti di attivazione globale, che coinvolgono tutti i segmenti corporei. Essi possono durare da alcuni secondi a diversi minuti. La loro particolarità è che i movimenti del tronco, della testa e degli arti si presentano in sequenze variabili, delle quali si possono riconoscere la complessità e la fluidità. Essi hanno un andamento in crescendo decrescendo per quello che riguarda intensità, rapidità e forza, con un inizio e una fine graduale delle sequenze. In particolare, dalle 38 alle 44 settimane di età gestazionale la motricità spontanea assume le caratteristiche del *writhing*, mentre dalle 44 settimane di età

gestazionale fino alle 20 settimane post termine, essa assume le caratteristiche tipo *fidgety*. I movimenti di tipo *writhing* sono movimenti caratterizzati da velocità da bassa a moderata, di media o piccola ampiezza, rotatori a largo raggio, talvolta tipo “stiracchiamenti“ o “contorsivi”, di traiettoria ellittica dei diversi segmenti, che coinvolgono arti, tronco e collo. I movimenti tipo *fidgety* sono movimenti caratterizzati da piccola ampiezza, velocità moderata e accelerazione variabile, traiettoria a raggio ristretto, curvilinea, che coinvolgono anch’essi arti, tronco e collo. A partire da circa 15 settimane di età post-termine, insieme alla maturazione della motricità spontanea si assiste alla comparsa di schemi di motricità volontaria con progressiva scomparsa dei GMs. Gli schemi di motricità volontaria che si presentano da questo momento possono essere descritti insieme alla valutazione qualitativa dei GMs come repertorio motorio associato.

I GMs sono stati videoregistrati come raccomandato (Precthl HF, 1997; Einspieler C, 1997) e sono stati valutati qualitativamente da un neuropsichiatra infantile esperto. Le registrazioni sono state acquisite, per quanto possibile, durante lo stato di veglia tranquilla dei pazienti reclutati, con registrazioni della durata di alcuni minuti.

c) Hammersmith Neonatal Neurological Examination: applicato a 1 settimana e a 1 mese di età e c) Hammersmith Infant Neurological Examination (HINE), applicato a 3, 6, 12, 18, 24 mesi di età. Esso costituisce un metodo semplice e quantitativo per la valutazione neurologica del bambino tra 0 e i 24 mesi di età. Include item per la valutazione dei nervi cranici, della postura, dei movimenti, del tono muscolare e dei riflessi. Questo strumento è stato standardizzato in una popolazione di bambini a basso rischio a 12 e 18 mesi e può essere quantificato utilizzando un *optimality score*, dove si intende per “ottimale” il punteggio che è stato determinato in almeno il 90% della popolazione normale. Il punteggio grezzo varia da un minimo di 0 a un massimo di 78.

d) Bayley Scale for Infant and Toddler Development (III edizione). I punteggi compositi della scala cognitiva, linguistica e motoria della scala Bayley III sono stati raccolti per

ciascun paziente che abbia raggiunto almeno un anno di età. La scala è stata somministrata da un neuropsichiatra esperto e abilitato. La somministrazione della scala è avvenuta secondo quanto descritto nel manuale. *Scala Cognitiva (Cog)*: valuta lo sviluppo sensorio-motorio, l'esplorazione e la manipolazione, la formazione di concetti, la memoria ed altri aspetti del processo cognitivo. *Scala del linguaggio (Lang)*: due subtest: Comunicazione Recettiva (RC): valuta comportamenti preverbali, sviluppo del vocabolario e comprensione verbale; Comunicazione Espressiva (EC): valuta comunicazione preverbale (balbettii, gestualità, ecc.), sviluppo del vocabolario (denominazione di oggetti e attributi) e morfosintassi. *Scala motoria (Mot)*: due subtest: motricità fine (FM): valuta il tracciamento visivo, la motricità grossolana (GM): raggiungimento, manipolazione di oggetti, presa e risposta all'informazione tattile; valuta la postura, il movimento dinamico (locomozione e coordinazione), l'equilibrio e la pianificazione grossomotora. *Scala socio-emozionale*: valuta la padronanza che il bambino ha della propria funzionalità emotiva, bisogni comunicativi, capacità di relazionarsi con gli altri, di utilizzare le emozioni in modo interattivo e finalizzato e uso dei segnali emotivi per risolvere i problemi. *Scala del comportamento adattivo*: valuta le abilità funzionali quotidiane del bambino, quali: comunicazione, interesse per attività fuori casa, gioco, cura personale, autocontrollo e capacità di fare delle scelte, abilità prescolari, vita a casa, socialità e motricità.

Le scale cognitive, espressiva e recettiva linguistica, fino-motoria e grosso motoria sono riassunte sotto forma di punteggio scalato, con un valore medio di 10. Questo punteggio è convertito in un punteggio composito con un valore medio di 100, unico per la scala cognitiva, il risultato della somma dei punteggi scalati per le scale linguistico espressiva e recettiva e fino e grosso motoria.

e) Gross Motor Function Classification System (GMFCS): consiste in un sistema di classificazione per le paralisi cerebrali che pone particolare attenzione ai trasferimenti posturali e alla mobilità. Esso comprende 5 livelli, sulla base di limitazioni funzionali,

della necessità di dispositivi per la mobilità (come deambulatori, stampelle o bastoni) o della mobilità in carrozzina, e in misura inferiore sulla qualità del movimento. Le distinzioni tra livello 1 e livello 2 non sono così marcate come le differenze tra gli altri livelli, in particolare per i bambini di età inferiore ai 2 anni. Per ogni livello, sono fornite descrizioni separate per bambini di diverse fasce di età. Per i bambini sotto 2 anni di età (Palisano R, 2007; Palisano R, 1997) la classificazione è definita come segue. Livello 1: i bambini si alzano e si siedono a terra con entrambe le mani libere per manipolare oggetti. Gattinano, si alzano in piedi e camminano aggrappandosi ai mobili. I bambini camminano tra 18 mesi e 2 anni di età senza necessità di alcun ausilio per la mobilità. Livello 2: i bambini mantengono la posizione seduta a terra ma potrebbero necessitare dell'uso delle mani come sostegno per mantenere l'equilibrio. Strisciano o gattonano. Possono alzarsi in piedi e camminare aggrappandosi ai mobili. Livello 3: i bambini mantengono la posizione seduta a terra con sostegno alla parte inferiore del tronco. Rotolano e strisciano. Livello 4: i bambini hanno il controllo del capo ma è necessario il sostegno del tronco per la posizione seduta a terra. Raggiungono rotolando la posizione supina e possono rotolare in posizione prona. Livello 5: le menomazioni fisiche limitano il controllo volontario del movimento. In posizione prona e in posizione seduta i bambini non sono in grado di sostenere il capo e il tronco contro gravità. Necessitano di assistenza per rotolare.

f) Immagini di Risonanza Magnetica (RM) pesate in T1, T2, T2* sono state acquisite con scanner da 1.5 o 3 Tesla in sequenza SE, FSE, GRE, FLAIR sul piano assiale e coronale, ricostruite sui tre piani ortogonali in sequenza 3D FLAIR e FSPGR, e pesate in diffusione (Diffusion Weighted Imaging, DWI) alla fine del trattamento con ipotermia entro la prima settimana di vita, ed a tre mesi di vita; in aggiunta alle sequenze di imaging convenzionale, allo studio dei tre mesi, è stato effettuato studio di perfusione mediante ASL. Il neuroradiologo responsabile del follow-up è stato mantenuto cieco all'attribuzione del paziente al gruppo di trattamento o di controllo. Le immagini ottenute a 1 settimana di

vita sono state classificate secondo il criterio già citato di Okereafor (Okereafor A, 2008). In particolare sono stati individuati i seguenti pattern di gravità. Pattern 1: lesioni dei gangli della base (GB) con alterazioni severe della sostanza bianca (SB). Pattern 2: lesioni dei GB con alterazioni della SB lievi o moderate. Pattern 3: lesioni esclusive dei Talami. Pattern 4: lesioni moderate della SB. Pattern 5: normale o lievi alterazioni della SB. Per quello che riguarda la RM effettuata a 3 mesi, si è valutato un punteggio di gravità crescente, basato sulla presenza di uno o più dei seguenti riscontri: lesioni dei gangli della base, lesioni cortico-sottocorticali, lesioni parasagittali. Un punteggio di 1 è stato attribuito se il coinvolgimento di quelle strutture è presente, 0 se assente, determinando una somma variabile da 0 (meno grave) a 3 (più grave).

4.4. MISURE DI OUTCOME

La misura di outcome primario è composta dalla somma di mortalità e disabilità neuropsichiatrica severa nei sopravvissuti. La disabilità severa viene definita come un punteggio composito inferiore a 70 in almeno due dei tre domini della Scala Bayley III (dove il punteggio medio \pm DS è di 100 ± 15 e un punteggio più alto indica una performance migliore), uno score tra 3 e 5 alla Gross Motor Function Classification System (GMFCS, dove il punteggio varia tra 1 e 5 indicando con punteggi più alti una disabilità maggiore).

Misure di outcome secondario comprendono i) mortalità; ii) paralisi cerebrale; iii) epilessia; iv) outcome visivo a 1 settimana, 4,5 mesi, 6 mesi, 12 mesi, 18 mesi; v) outcome cognitivo valutato con scala Bayley (tre domini singolarmente e loro media) ad almeno un anno di età; vi) outcome motorio valutato a 1 settimana, 1 mese, 3 mesi, 6 mesi, 12 mesi, 18 mesi, 24 mesi valutato con Dubowitz e HINE a seconda dell'età; il punteggio assegnato è stato 0 se anormale o 1 se normale rispetto all'optimality score (Dubowitz L, 1998; Haataja L, 1999; Haataja L, 2003); vii) outcome motorio a breve termine, valutato con

GMs; viii) gravità della paralisi cerebrale secondo la GMFCS; ix) disabilità neuropsichica severa valutata come punteggio composito medio tra i domini della scala Balyley III (cognitivo, linguaggio, motorio) inferiore a 70; x) sopravvivenza senza sequele neurologiche, dato dal riscontro di un punteggio medio tra i domini della scala Balyley III (cognitivo, linguaggio, motorio) superiore a 70 in nei sopravvissuti.

L'outcome neuroradiologico è stato valutato a 1 settimana di vita e 3 mesi. Le immagini ottenute alla prima valutazione neuroradiologica e classificate secondo i criteri di gravità di Okereafor (Okereafor A, 2009), mentre le immagini acquisite a 3 mesi sono state classificate secondo il criterio di gravità descritto precedentemente. In un sottogruppo di pazienti, sono state analizzate le immagini ASL e ottenute mappe di perfusione. E' stata effettuata una analisi di gruppo mediante software dedicato, al fine di valutare eventuali modifiche dei pattern di perfusione a medio termine tra i pazienti che hanno effettuato TPM e i controlli.

Infine, misure di outcome avverso sono stati considerati eventi sfavorevoli quali bradicardia <80 bpm, ipotensione con valore pressorio medio tra pressione sistolica e diastolica <40, riduzione della conta piastrinica <50000. I relativi parametri sono stati monitorati durante l'ipotermia ogni 6 ore. Eventuali ipertensione polmonare, prolungamento di tempi di coagulazione, sepsi dimostrata alla coltura ematica, enterocolite necrotizzante, aritmie cardiache, trombosi venosa maggiore, insufficienza renale trattata con dialisi, polmonite, intercorsi durante il trattamento con ipotermia che siano manifestati entro il periodo di trattamento con ipotermia sono stati segnalati.

4.5. ANALISI STATISTICA

Le caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti sono state raccolte e conteggiate come percentuale del numero totale di neonati per quello che riguarda le variabili categoriali, come media (\pm DS) per le variabili continue con distribuzione normale, e come

mediana e ranghi per le variabili discrete. I dati sono stati analizzati tenendo conto dei due gruppi di trattamento ricevuto. In accordo con i precedenti studi pubblicati (Gluckman PD, 2005; Shankaran S, 2005; Azzopardi D, 2009), oltre alla correlazione con misure di outcome intermedio, la misura di outcome primario è stata calcolata per i pazienti sopravvissuti che sono stati disponibili per il follow-up.

Variabili continue con distribuzione normale sono state analizzate mediante la statistica comparativa del t test mentre variabili ordinali con distribuzione non normale sono state analizzate mediante test di Mann Whitney, considerando la differenza media e l'intervallo di confidenza al 95%. Inoltre, considerando le variabili categoriali si è utilizzato il test del chi quadro. Tutti i test statistici sono stati considerati a due code. Sono stati inoltre predisposti due sottogruppi stratificati sulla base della gravità dell'aEEG alla randomizzazione

In particolare sono state considerate variabili continue (t test) l'età gestazionale, il peso alla nascita e il tempo (in ore) trascorso tra il parto e l'inizio dell'ipotermia. Queste variabili sono state considerate per escludere eventuali differenze tra i gruppi al reclutamento. Le variabili continue considerate come misure di outcome sono state: la valutazione delle funzioni visive a 1 settimana, 4,5 mesi, 6 mesi e 12 mesi; il punteggio ottenuto nei singoli domini della scala Bayley III (cognitivo, linguaggio e motorio) e il punteggio medio tra i tre domini. Variabili ordinali (Mann Whitney) sono state considerate: l'indice di Apgar e la gravità dell'EEG a 24 ore, come variabili considerate per escludere eventuali differenze tra i gruppi al reclutamento. Le variabili ordinali considerate come misure di outcome sono state: la RM a 1 settimana e 3 mesi, la gravità del quadro motorio valutata tramite GMFCS. Variabili nominali (chi quadro) sono state considerate: il sesso e la gravità dell'aEEG per escludere eventuali differenze tra i gruppi al reclutamento. Le variabili nominali utilizzate come misure di outcome sono state: bradicardia, ipotensione e conta piastrinica per l'outcome avverso. Misure di outcome neurologico sono state i risultati alle scale

Dubowitz e HINE a 1 settimana, 1 mese, 3 mesi, 6 mesi, 18 mesi e 24 mesi (considerando i valori come 0=abnormale e 1=normale, rif. Haataja L, 1998; Guzzetta A, 2005), la presenza o assenza di epilessia, di paralisi cerebrale, di outcome primario sfavorevole, di score medio alla Bayley <70, di sopravvivenza senza sequele neurologiche.

5. RISULTATI

5.1. CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI

Dal 1 Luglio 2010 al 31 Dicembre 2012, 37 pazienti sono stati reclutati da 2 Aziende Ospedaliere. Cinque pazienti sono stati esclusi per mancanza di documentazione clinica necessaria all'analisi dei dati. Le caratteristiche basali dei pazienti non differiscono in modo significativo nei due gruppi di trattamento in merito a età gestazionale ($p=0.677$); peso alla nascita ($p=0.379$), sesso ($p=0.476$), ora d'inizio dell'ipotermia (0.797), Apgar a 5' ($p=0.108$), gravità dell'aEEG al reclutamento ($p=1.000$), EEG a 24 ore ($p=0.177$) (Tabella 1).

5.2. OUTCOME

Nel gruppo di 16 pazienti trattati con TPM, 2 pazienti sono deceduti e 5 sono sopravvissuti con disabilità neuropsichiatrica severa (outcome primario) (44%), mentre nel gruppo dei 16 pazienti trattati con la sola ipotermia 2 pazienti sono deceduti e 6 sono sopravvissuti con disabilità severa (50%) ($p=0.930$) (Tabella 2). Nel sottogruppo di pazienti con aEEG moderato, di quelli trattati con TPM nessuno ha avuto un outcome primario sfavorevole (0/7, 0%), mentre tra i controlli la percentuale di outcome primario sfavorevole è del 18% ($p=0.127$). Nel gruppo di pazienti con aEEG severo, quelli trattati con TPM hanno avuto un outcome sfavorevole nel 67% (6/9) dei casi, mentre tra i controlli la percentuale di outcome sfavorevole è del 44% (4/9) ($p=0.3428$).

Per quello che riguarda le misure di outcome secondario, i risultati sono stati i seguenti.

i) Il tasso di mortalità si è dimostrato simile nei due gruppi. Due soggetti sono deceduti nel gruppo di pazienti che hanno assunto Topiramato e 2 sono deceduti nel gruppo di pazienti che hanno ricevuto la sola ipotermia. Un paziente nel gruppo di quelli trattati con TPM è

deceduto entro la prima settimana di vita, così come 1 paziente nel gruppo non trattato con TPM. ii) Paralisi cerebrale; 6 pazienti su 14 sopravvissuti a un anno (42%) trattati con TPM hanno sviluppato una paralisi cerebrale infantile, ma 5 su 14 con GMCS>3 (35%), mentre 5 pazienti su 14 sopravvissuti a un anno (36%) tra i controlli hanno sviluppato una paralisi cerebrale infantile, tutti con GMCS>4 (p=0.713). iii) Epilessia; alla analisi statistica si ottiene un trend di riduzione del tasso di epilessia nei pazienti trattati con TPM rispetto ai controlli (RR=0.33, IC al 95%= 0.08-1.39, p=0.099; riduzione del RR del 67%) iv) l'outcome visivo a 1 settimana non risulta diverso nei due gruppi di trattamento (p=0.795) mentre l'outcome visivo a 4,5 mesi (p=0.034), 6 mesi (p=0.025) e 12 mesi (p=0.034) mostra una differenza significativa nei due gruppi, per punteggi migliori nel gruppo di trattamento con TPM. v) L'outcome cognitivo valutato con scala Bayley ad almeno un anno di età non risulta significativamente diverso nei due gruppi né per ciascun dominio, cognitivo (p=0.494), linguistico (p=0.572), motorio (p=0.393), media dei tre (p=0.439). In particolare, 6 su 11 (55%) pazienti trattati con TPM hanno avuto un punteggio superiore o uguale a 70 in tutti i domini (cognitivo, linguistico, motorio), mentre tra i controlli 4 su 11 (36%) hanno avuto un punteggio superiore a 70 (p=0.3918). Tra i pazienti con aEEG di grado moderato, tutti i pazienti di almeno un anno che hanno assunto il TPM hanno un punteggio alla scala Bayley >70, mentre 2 tra 7 pazienti che non hanno ricevuto il TPM hanno un punteggio <70, dato che assume una modesta tendenza alla significatività (p=0.113). vi) L'outcome motorio valutato a 1 settimana (p=0.723), 1 mese (p=0.362), 3 mesi (0.456), 6 mesi (p=0.891), 12 mesi (p=0.864), 18 mesi (p=0.515), 24 mesi (p=0.535) valutato con Dubowitz e HINE a seconda dell'età non mostra significative differenze tra i due gruppi. vii) L'outcome motorio a breve termine, valutato con GMs a 1 mese (p=0.766) e 3 (p=0.187) mesi non mostra differenze significative tra i due gruppi. viii) La gravità della paralisi cerebrale secondo la GMFCS non appare differente nei due gruppi (p=0.833). ix) Il tasso di disabilità neuropsichica severa appare non differente nei

due gruppi ($p=0.392$). Considerando tuttavia il solo gruppo di pazienti con aEEG moderatamente alterato, si vede come il valore statistico si avvicini alla tendenza ($p=0.114$). x) Il tasso di sopravvivenza senza sequele neurologiche risulta non differente nei due gruppi ($p=0.371$). In particolare, esso è stata riscontrato in 6 su 10 (60%) pazienti trattati con TPM, mentre si ritrova in 4 su 10 (40%) controlli ($p=0.3711$) (Tabella 2). Considerando i soli pazienti con aEEG di grado moderato, tutti i pazienti ($n=5$) che hanno ricevuto il TPM non hanno sequele neurologiche, mentre 3 pazienti su 5 (60%) che non hanno ricevuto il TPM hanno avuto sequele neurologiche pur con un aEEG moderatamente grave ($p=0.114$).

Cinque su 15 (33%) pazienti trattati con TPM, nei quali è stata effettuata RM encefalo a 1 settimana, hanno avuto un punteggio patologico (1-3 alla scala di Okereafor), mentre i restanti 10 hanno avuto un punteggio pressochè normale (4-5). Tra i controlli, ugualmente 5 su 15 (33%) pazienti, nei quali è stata effettuata RM a 1 settimana di vita, hanno avuto un punteggio patologico, mentre i restanti hanno avuto un punteggio pressochè normale ($p=0.542$). Nel sottogruppo di pazienti con alterazioni aEEG di grado moderato, tutti i pazienti trattati con TPM hanno avuto un punteggio di gravità alla RM di 4 o 5, mentre 2 su 7 controlli hanno avuto un punteggio <3 ($p=0.126$). La RM effettuata a medio termine (3 mesi) è stata effettuata in 12 pazienti che hanno ricevuto il trattamento con TPM e in 13 controlli. 4 su 12 (33%) pazienti del gruppo di casi e 6 su 13 (46%) controlli hanno avuto un punteggio positivo (almeno 1) ($p=0.477$) (Tabella 2).

Per quello che riguarda lo studio di perfusione, le sequenze ASL sono state analizzate in 6 pazienti complessivamente, tre per ciascun gruppo di trattamento. Le immagini acquisite sono state corrette per la presenza di artefatti e co-registrate su un atlante adeguato all'età, per produrre un set di immagini per ciascun gruppo. Sono state ottenute perciò due mappe di perfusione media per ciascun gruppo (Figura 3). Una misura media della perfusione, senza tenere conto delle differenze tra sostanza bianca (SB) e sostanza grigia (SG) è stata

calcolata, mostrando un livello di perfusione globale simile nei due gruppi (Cerebral Blood Perfusion, CBF, medio 68,5 mL/100g/min). Accettando un livello di significatività statistica per $p < 0.05$ e un cluster minimo di 50 voxel, sono state individuate 11 regioni per le quali è presente una significativa differenza di perfusione. Ad una valutazione qualitativa, i pazienti che hanno ricevuto trattamento con TPM sembrano mostrare una relativa maggiore perfusione a livello delle aree sottocorticali di SB fronto-parieto-occipitale, rispetto ai pazienti che non hanno ricevuto il TPM (Figura 1). Questi ultimi, sembrano mostrare invece una maggiore perfusione a livello corticale, fronto-parieto-occipitale (Figura 2). Ad una valutazione delle mappe di perfusione ottenute dalla sovrapposizione dei casi per ciascun gruppo, si osserva ad una valutazione qualitativa, una maggiore perfusione nelle aree di SB nei pazienti che hanno ricevuto il TPM, rispetto ai controlli (Figura 3).

L'incidenza di eventi avversi, in particolare di bradicardia ($p=0.310$), ipotensione (nessuno) e riduzione della conta piastrinica ($p=1.000$), è risultata basse in generale, e simile nei due gruppi. Durante il periodo di ipotermia un solo paziente tra quelli non trattati con TPM ha avuto una bradicardia significativa, mentre due pazienti, uno per ciascun gruppo ha avuto una conta piastrinica inferiore a 50000. Nessun paziente tra i sopravvissuti ha avuto complicanze maggiori legate al trattamento con ipotermia in frequenza minore di quanto atteso dalla letteratura. Non sono state riportate reazioni avverse primariamente riferibili al trattamento con TPM.

6. DISCUSSIONE

In questo studio randomizzato in neonati a termine con encefalopatia ipossico ischemica di grado moderato e severo, non sono emerse significative differenze nell'outcome primario, calcolato come tasso combinato di mortalità e disabilità neuropsichica severa, tra il gruppo di pazienti trattati con TPM e il gruppo di controlli. Tuttavia, certe differenze sono emerse in modo significativo o come tendenza in alcune misure di outcome secondario. Nel presente studio la misura di outcome primario è stata scelta sulla base dei dati disponibili in letteratura al fine di poter agevolare un confronto nei risultati con i principali trial. In letteratura è stato ampiamente dimostrato che l'ipotermia da sé incrementa la sopravvivenza senza sequele neuropsichiche. Il tasso combinato di mortalità e disabilità neuropsichica severa appare comparabile, sia nel gruppo di pazienti trattati con TPM (44%) che nel gruppo trattato con sola ipotermia (50%), a quanto descritto nei principali trial presenti in letteratura sulla sola ipotermia (TOBY trial: 45% nel gruppo trattato con ipotermia e 53% nei controlli; NICHD trial (Shankaran, 2005): 44% nel gruppo trattato e 62% nel gruppo di controllo; CoolCap study (Gluckman, 2005): 55% nel gruppo trattato e 66% nel gruppo di controllo). L'utilizzo del TPM in combinazione all'ipotermia come intervento tipo ipotermia "plus", sembra quindi non avere un effetto tale da incidere su mortalità e disabilità neuropsichica severa. Valutando tuttavia in un sottogruppo di pazienti con aEEG moderatamente alterato al reclutamento l'effetto del TPM sull'outcome primario si può osservare che nel nostro gruppo di pazienti i risultati dell'analisi statistica si avvicinano maggiormente alla significatività seppure il campione sia costituito da un numero esiguo di pazienti. Questo dato può essere spiegato ipotizzando che l'effetto di un intervento di neuroprotezione potrebbe essere più efficace in pazienti con alterazioni all'aEEG di grado moderato, e quindi con una EII verosimilmente di minore entità, in

quanto potrebbe risultare assai più complesso intervenire sull'outcome di una encefalopatia di grado severo, dove alcuni meccanismi del danno inducono un effetto irreparabile o più difficilmente contenibile.

Considerando le misure di outcome secondario per l'intero gruppo di pazienti reclutati, il tasso di sopravvivenza senza sequele neurologiche non presenta differenze significative tra i due gruppi di trattamento. Tuttavia, anche in questo caso, restringendo l'analisi al gruppo di pazienti con alterazioni all'aEEG di moderata entità, tutti (n=5) tra quelli che hanno ricevuto il TPM hanno una sopravvivenza senza sequele neurologiche, mentre 3 pazienti su 5 (60%) tra quelli che non hanno ricevuto il TPM hanno avuto sequele neurologiche pur con un aEEG moderatamente grave, avvicinandosi anche in questo caso il livello di tendenza statistica. Un analogo ragionamento per sottogruppo di analisi è possibile per la presenza di disabilità neuropsichica severa valutata alla Scala Bayley III. Se infatti restringiamo anche l'analisi di questo parametro ai pazienti con aEEG di grado moderato, tutti i pazienti di almeno un anno che hanno assunto il TPM hanno un punteggio alla scala Bayley >70, mentre 2 tra 7 pazienti che non hanno ricevuto il TPM hanno un punteggio <70, dato che assume una modesta tendenza di significatività ($p=0.114$).

Le misure di outcome secondario sono state scelte in parte in modo analogo a quanto descritto nel TOBY trial, nel CoolCap e nello studio NICHD, in particolare rispetto a paralisi cerebrale, GMFCS, scala Bayley e tasso di epilessia. Tuttavia, rispetto alla letteratura, misure di outcome anche a breve e medio termine sono state selezionate e utilizzate, come ad esempio la valutazione dei GMs, e l'applicazione di un esame neurologico standardizzato (Dubowitz e HINE) o misure per la valutazione della funzionalità visiva (FV).

Rispetto ai risultati proposti per le misure di outcome secondario, si nota che il tasso di paralisi cerebrale non differisce in modo significativo tra i due gruppi di trattamento, fatto che concorda anche con la mancanza di impatto del TPM sull'outcome primario. Per

quello che riguarda invece la presenza di epilessia, si trova nei risultati un trend ($p=0.099$) per un effetto protettivo del TPM rispetto al rischio di sviluppare epilessia nei pazienti con EII. In particolare, questo significa che i pazienti che hanno ricevuto il trattamento con TPM hanno un rischio inferiore del 67% di sviluppare epilessia rispetto ai controlli. Questo risultato assume ulteriore rilievo se si considera che non vi è differenza nel grado di alterazione alla RM, né nel rischio di sviluppare una paralisi cerebrale, entrambi fattori predisponenti all'epilessia. Tutti i pazienti con epilessia hanno comunque una lesione cerebrale; nessun paziente tra i reclutati ha infatti sviluppato epilessia in assenza di un esito documentato alla RM. Sul piano generale, questo dato appare suscitare un elevato interesse, se si considera che, come è ampiamente dimostrato in letteratura, l'epilessia costituisce un fattore peggiorativo sull'outcome neuropsichico di un paziente con paralisi cerebrale (Wallace SJ, 2001).

Un altro elemento significativo tra le misure di outcome secondario è costituito dal funzionamento visivo. Eccetto, infatti, la valutazione effettuata ad 1 settimana di vita, l'outcome visivo a 4,5 mesi, 6 mesi e 12 mesi mostra una differenza significativa nei due gruppi, per punteggi migliori nel gruppo di trattamento con TPM. È possibile che il dato più precoce della prima settimana di vita, risenta in qualche modo dello stato di sedazione cui i pazienti sono sottoposti nella maggior parte dei casi, determinando un bias che discosta quei punteggi dall'andamento più evidente nelle valutazioni successive. Tale andamento, potrebbe d'altronde costituire un limite reale della valutazione per una immaturità del sistema visivo nei primissimi giorni dalla nascita. Il dato tuttavia che invece emerge e si mantiene in valutazioni successive a 4,5 mesi, 6 mesi e 12 mesi, autorizza alcuni ordini di considerazioni. Intanto, è noto in letteratura, come la valutazione del funzionamento del canale visivo rappresenti un ambito relativamente nuovo ma di grande impatto sulla qualità della valutazione neuropsichica del bambino fin dalle prime settimane di vita (Ricci D, 2008). Pertanto, questo strumento potrebbe permettere di individuare in

una fase precoce di sviluppo una differenza tra due gruppi che altri strumenti che si utilizzano in modo tradizionale per valutare ad esempio il tono muscolare, i riflessi o le tappe di sviluppo neuromotorio non sono in grado di cogliere; tuttavia è opportuno considerare che in particolare nei primi mesi di vita esistono delle competenze che possono essere indicative dello sviluppo neuropsichico futuro che prescindono dal giudizio neurologico in senso stretto, come in questo caso le abilità visive e visuocognitive. A titolo esplorativo, per valutare la consistenza di questo dato, è stata studiata la correlazione (test di correlazione di Pearson) tra i punteggi ottenuti alla valutazione visiva per ciascuna età e i punteggi compositi ottenuti nei diversi domini della scala Bayley. Si è perciò osservato come tutte le variabili della valutazione visiva correlano con i punteggi alla Bayley, eccetto quella a una settimana, con un range per r compreso tra 0.597 ($p=0.059$) e 0.818 ($p=0.001$). Inoltre, se si considera il dato precedentemente citato della più bassa frequenza di epilessia nel gruppo di pazienti che hanno assunto TPM, si potrebbe ipotizzare che questo aspetto in qualche modo supporta o va di pari passo con i risultati del funzionamento visivo. Infatti, come noto in letteratura, esiste una relazione tra funzionamento visivo, competenze cognitive ed encefalopatie epilettiche come la Sindrome di West (Randò T, 2005), per cui non si può escludere che anche in questo caso la maggiore suscettibilità all'epilessia del gruppo di pazienti di controllo ricada in qualche modo sul loro funzionamento neurocognitivo e in particolare visivo. Andando quindi a riconsiderare in questa ottica l'outcome cognitivo valutato con scala Bayley ad almeno un anno di età, ci si potrebbe aspettare di cogliere un andamento, in qualche modo anticipata dal più positivo precoce outcome visivo dei pazienti che hanno assunto TPM. L'outcome cognitivo tuttavia, come già descritto, non risulta significativamente diverso nei due gruppi né per ciascun singolo dominio, cognitivo, linguistico, motorio, né per la media dei tre ad una valutazione complessiva. Alla valutazione dettagliata per ciascun dominio, si vede tuttavia che la media del punteggio composito ottenuto dai pazienti che hanno ricevuto il TPM è sempre

maggiore rispetto ai controlli. Inoltre, considerando il sottogruppo di pazienti con aEEG moderatamente alterato, nonostante si tratti di un sottogruppo, l'effetto protettivo del farmaco influenza in qualche misura l'outcome neuropsichico misurato con la Scala Bayley, per un livello di significatività che si avvicina maggiormente alla tendenza statistica. La correlazione con il dato visivo potrebbe rinforzare l'attendibilità di questo andamento. Considerando inoltre il tasso di sopravvivenza senza sequele neurologiche (ovvero assenza di PCI e punteggio alla Bayley >70), come già descritto, esso è stato riscontrato effettivamente più elevato nei pazienti trattati con TPM rispetto ai controlli, senza tuttavia raggiungere una significatività statistica, che sembra anche stavolta più vicina, considerando i soli pazienti con aEEG di grado moderato; anche questo dato potrebbe essere prudentemente interpretato nella stessa direzione del precedente, in correlazione al funzionamento visivo. Ulteriori dati di follow up saranno utili per chiarire questo andamento.

Il TPM, come ampiamente descritto, ha dimostrato un effetto neuroprotettivo in colture cellulari e in modelli di roditori sottoposti a ipossia, anche in combinazione con l'ipotermia (Kurul SH, 2009; Sfaello I, 2005). Le proprietà neuroprotettive sembrano in gran parte mediate dall'inibizione del canale alfa-amino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazolo-propionato (AMPA)-kainato, ma anche al blocco dei canali del Sodio, del Calcio, dell'enzima anidrasi carbonica e della permeabilità di membrana mitocondriale (Choi JW, 2007). Quale sia il meccanismo combinato dell'effetto di ipotermia e TPM non è chiaro, ma è stato ipotizzato un effetto sinergico rispetto alla salvaguardia del re-uptake del Glutammato e all'inibizione del danno ossidativo e dell'apoptosi. Inserendo i risultati di questo studio in questo contesto, si possono avanzare alcune ipotesi. Per quello che riguarda l'effetto sull'epilessia, da un lato è possibile che il TPM da solo abbia un effetto protettivo per sé in particolare nella modulazione della soglia epilettogena, fatto che appare verosimile anche per le sue principali caratteristiche di anticonvulsivante. E' possibile quindi ipotizzare che

una modulazione dell'eccitotossicità induca una qualche modifica persistente, almeno nei primi due anni di vita, delle sinapsi per un effetto durante gli stadi precoci di sviluppo. Una seconda ipotesi potrebbe invece essere che sia l'effetto combinato di ipotermia e TPM a determinare un beneficio nella salvaguardia dei neuroni che risultano meno danneggiati dall'ipossia anche a livello molecolare e cellulare, con principale ricaduta nella eccitabilità sinaptica. Questo effetto protettivo, qualunque sia il meccanismo d'azione, potrebbe ricadere sullo sviluppo del bambino non solo in termini di danno neuromotorio, ma più in generale su uno sviluppo visivo e visuo-cognitivo che si può cogliere fin dai primi mesi di sviluppo.

Un ulteriore supporto alla comprensione del meccanismo alla base dei risultati descritti proviene dall'approccio neuroradiologico. In questo senso, è opportuno effettuare due ordini di considerazioni. In primis bisogna osservare che il trattamento con TPM non sembra modificare la manifestazione dell'EII in termini di pattern di RM precoce o modificare le caratteristiche delle lesioni consolidate anche nel controllo a medio termine (3 mesi) al neuroimaging convenzionale. Questo dato appare concordare con il dato clinico espresso attraverso le misure di outcome primario, che, come ampiamente riportato, non sono modificate dal trattamento con TPM. In secundis, appare invece necessario sottolineare e collocare in questo contesto i risultati ottenuti con dall'analisi preliminare dei dati di perfusione, per incoraggiare la comprensione dei possibili effetti indotti dal TPM a livello cerebrale. Alla valutazione della perfusione globale (GBP) nei pazienti studiati appartenenti ai due gruppi di trattamento, non sono emerse significative differenze quantitative, come tuttavia atteso, essendo stati studiati 6 pazienti tutti con outcome primario favorevole. Appare di estremo interesse il diverso pattern di perfusione prominente nell'uno e nell'altro gruppo di pazienti ad una valutazione qualitativa. Infatti, il gruppo di pazienti che ha ricevuto il trattamento con TPM sembra mostrare un maggior grado di perfusione a livello sottocorticale nella SB non solo ascendente dalla corteccia

rolandica, come atteso per l'età, ma diffusamente a livello fronto-parieto-occipitale, mentre il gruppo di pazienti di controllo mostra una iperperfusione relativa prevalente a livello corticale. Questo risultato, seppure ad una sola valutazione qualitativa, permette di proporre alcune speculazioni. Riprendendo i dati emersi nell'analisi di outcome secondario, i pazienti trattati con TPM sembrano quindi avere una minore incidenza di epilessia rispetto ai controlli, in presenza di lesioni cerebrali. Come è noto in letteratura, lo studio di perfusione mediante ASL ha dimostrato una iperperfusione ictale nell'epilessia. Partendo da questi dati, si potrebbe ipotizzare che nei pazienti trattati con TPM, la relativa ipoperfusione corticale possa costituire un fattore protettivo verso la suscettibilità alle crisi, che invece è maggiore dove la perfusione cerebrale è maggiore, verosimilmente come segno indiretto di una maggiore attività neuronale corticale. Nei pazienti invece trattati con TPM, la relativa maggiore perfusione della SB potrebbe coincidere con un più avanzato stato maturativo (Vis, 2012), compatibile con una fase attiva di mielinizzazione, a scapito di una relativamente minore attività neuronale corticale e una conseguente relativamente minore perfusione.

Diversi sono i limiti di questo studio. In particolare, per quello che riguarda le misure di outcome primario e secondario, un numero maggiore di pazienti deve essere reclutato al fine di ottenere una significatività statistica dei dati individuati (sample size stimato *a priori* in base al size-effect atteso sull'outcome primario, 60 pazienti). Un'ulteriore nota merita la lunghezza del follow-up, che dovrebbe essere estesa per consentire da un lato di confermare il dato relativo alla protezione verso l'epilessia, dall'altro per permettere di differenziare l'outcome cognitivo e comportamentale dei pazienti più a lungo termine, valutando l'effetto secondario della riduzione delle crisi sullo stesso. Per quello che riguarda lo studio neuroradiologico di perfusione, anche in questo caso opportuno sarebbe allargare il numero di pazienti studiati. Informazioni aggiuntive si potranno ricavare da una analisi quantitativa basata sulla segmentazione tra SB e SG e sull'analisi di regioni di

interesse (ROI). Ulteriori informazioni si potranno infine ottenere completando questi dati preliminari con una analisi della diffusione e di parametri di maturazione della sostanza bianca nei pazienti studiati.

In conclusione, il trattamento combinato di ipotermia e TPM, seppure apparentemente non efficace su misure di outcome primario, sembra tuttavia effettivo per un beneficio sul funzionamento visivo che è un'importante misura di outcome a breve e medio termine nel neonato e nel bambino nei primi mesi di vita, e che potrebbe ricadere sul funzionamento intellettuale a più lungo termine. Inoltre, l'effetto del TPM, appare promettente relativamente alla attenuazione della problematica epilettologica che spesso influenza negativamente l'outcome di pazienti affetti da PC secondaria a EII, ricadendo sia sul versante generale che più specificatamente sullo sviluppo intellettuale. Questi dati potrebbero essere correlati ad un effetto mediato dal TPM sullo stato di attività dei neuroni corticali e sullo sviluppo differenziato di alcune strutture cerebrali, con ricadute che non si colgono all'imaging tradizionale ma che metodiche più sperimentali di neuroimaging come la perfusione, o la diffusione, potrebbero cogliere.

Questo studio rappresenta un primo incoraggiante approccio alle ipotesi di applicazione di protocolli di ipotermia "plus" nel paziente con EII.

APPENDICE

Caratteristiche	Ipotermia e TPM (n=16)	Ipotermia (n=16)	p value
Genere F – n(%)	6(38)	8(50)	0.476
Età gestazionale – sett.			
Media	39.06	39.31	0.677
DS(ES)	1.436(0.359)	1.887(0.472)	
Peso alla nascita – gr			
Media	3133.53	3284.67	0.379
DS(ES)	482.013(124.455)	443.454(114.499)	
Apgar score 5'			
Mediana(DS)	5.0(2.067)	4.0(2.151)	0.108
Anomalie aEEG Moderato – n(%)	7(44)	7(44)	1.000
Inizio ipotermia – ore dalla nascita			
Media	4.27	4.13	0.798
DS(ES)	1.438(0.399)	1.334(0.385)	
EEG 24 ore			
Mediana(DS)	3.00(0.674)	3.00(0.900)	0.177

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti.

Outcome	Ipotermia e TPM	Ipotermia	p value
Outcome primario			
Morte o disabilità neuropsichica severa combinate – n(%)	7/16(44)	8/16(50)	0.930
Outcome secondario			
Mortalità n/N(%)	2/16(13)	2/16(13)	1.000
Paralisi cerebrale n/N(%)	6/14(46)	5/14(36)	0.713
Epilessia n/N(%)	2/15(13)	6/15(40)	0.099
FV 1 sett.			
Media(DS)	2.13(0.835)	2.00(0.894)	0.795
FV 4,5 mesi			
Media(DS)	2.88(0.354)	1.67(1.033)	0.034
FV 6 mesi			
Media(DS)	3.00(0.000)	1.67(1.033)	0.025
FV 12 mesi			
Media(DS)	3.00(0.000)	2.00(0.707)	0.034
Bayley cognitivo			
Media(DS)	65.00(37.881)	52.73(44.405)	0.494
Bayley linguaggio			
Media(DS)	60.82(35.651)	50.91(44.606)	0.571
Bayley motorio			
Media(DS)	63.09(38.203)	47.91(43.177)	0.393
Bayley medio			
Media(DS)	63.27(36.434)	49.86(42.865)	0.439
Dubowitz 1 sett. abn n/N(%)	7/16(44)	8/16(50)	0.723
Dubowitz 1 mes. abn n/N(%)	7/14(50)	10/15(33)	0.362
HINE 3 mesi abn n/N(%)	7/15(46)	5/15(33)	0.456
HINE 6 mesi abn n/N(%)	4/12(33)	4/13(31)	0.891
HINE 12 mesi abn n/N(%)	4/10(40)	4/10(36)	0.864
HINE 18 mesi abn n/N(%)	2/7(29)	4/7(44)	0.515
HINE 24 mesi abn n/N(%)	2/5(40)	2/5(40)	1.000
GMs 1 mese abn n/N(%)	2/5(40)	2/3(67)	0.766
GMs 3 mesi abn n/N(%)	2/3(67)	1/5(20)	0.187
GMFCS			
Mediana(DS)	0.00(2.162)	2.00(2.539)	0.833
Disabilità neuropsichica severa – n/N(%)	4/11(36)	6/11(54)	0.392
Sopravvivenza senza sequele neurol. – n/N(%)	6/10(60)	4/10(40)	0.371
Outcome neuroradiologico			
RM 1 settimana			
Mediana(DS)	5.00(1.375)	2.00(1.801)	0.542
RM 3 mesi			
Mediana(DS)	0.00(1.036)	1.00(1.357)	0.477

Tabella 2. Misure di outcome.

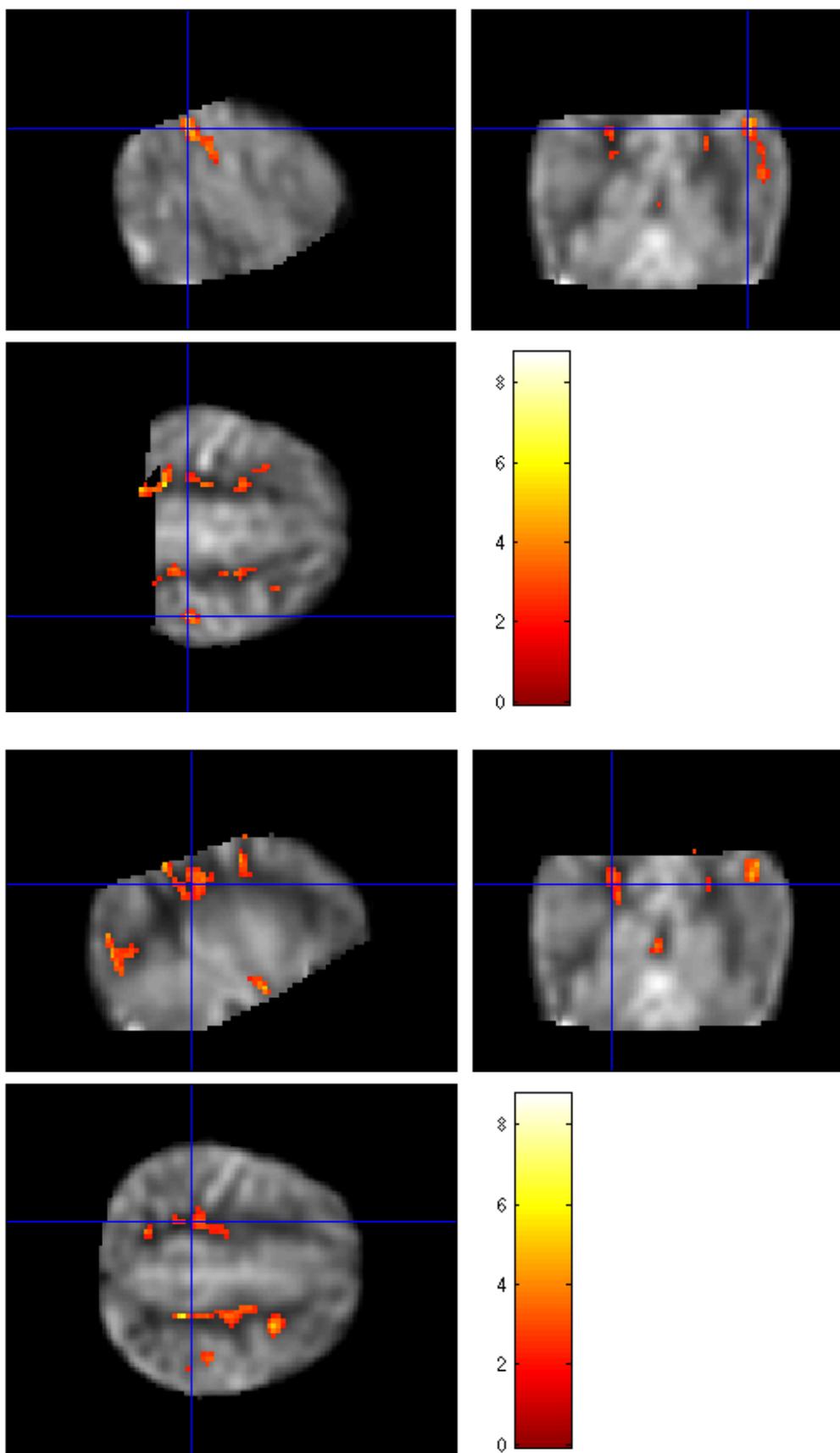


Figura 1. Pattern relativo di iperperfusione sottocorticale dei pazienti che hanno ricevuto trattamento con TPM. Le aree in gradazione di rosso indicano le regioni dove la perfusione determinata mediante ASL è significativamente ($p < 0.05$) maggiore (crescente dal rosso al giallo) nel gruppo di pazienti trattati con TPM rispetto ai controlli.

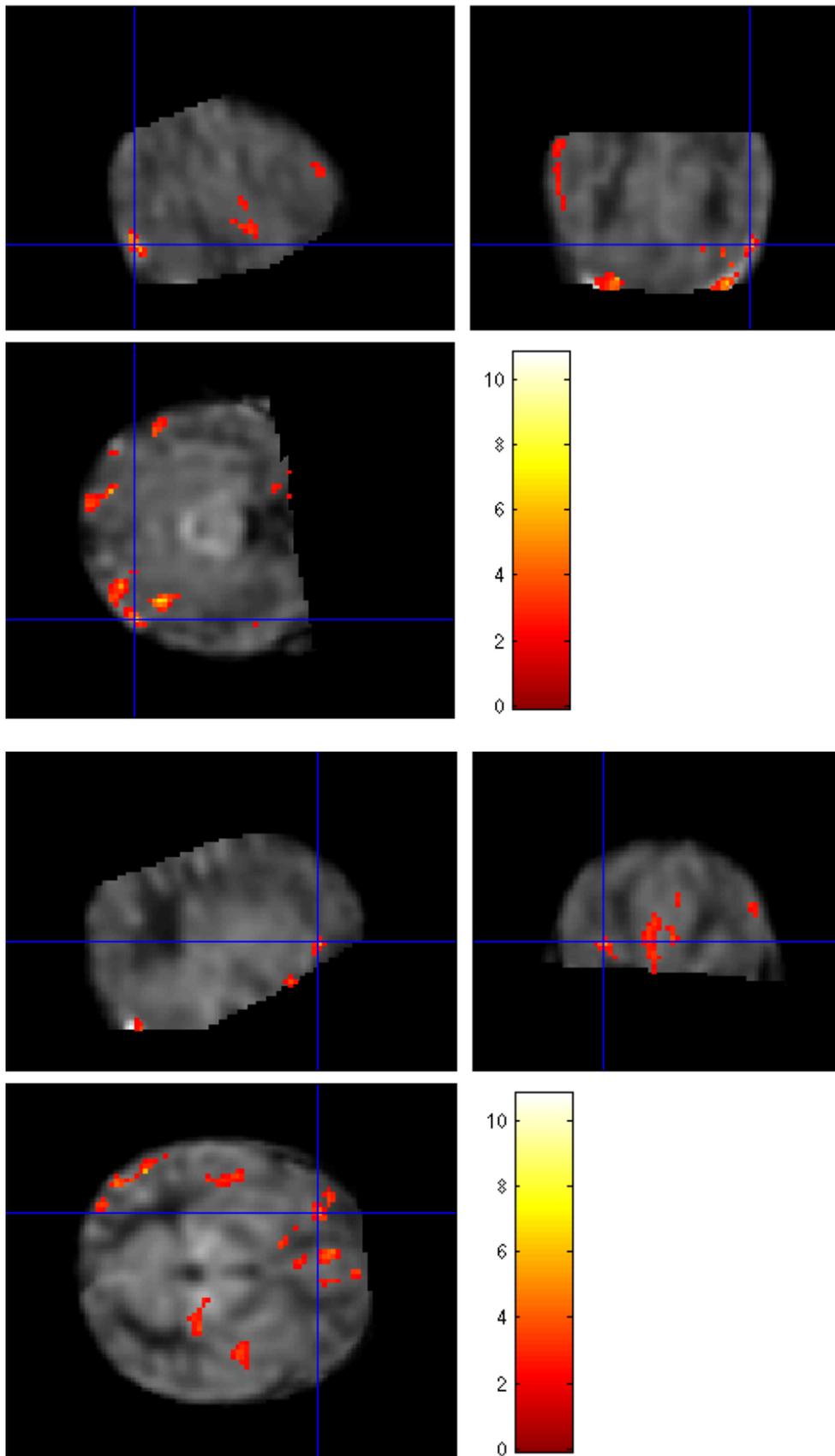
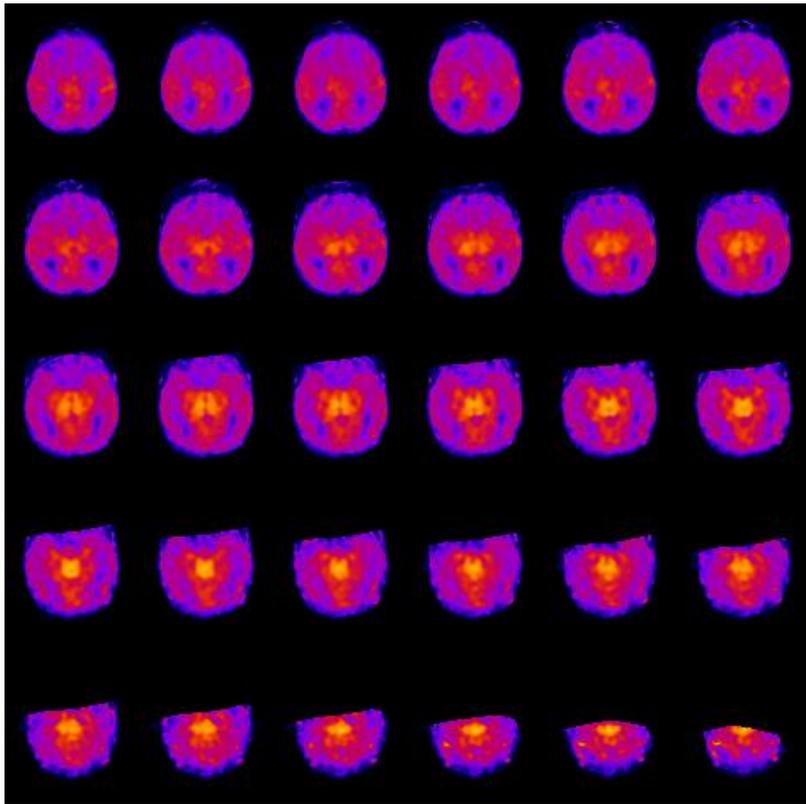
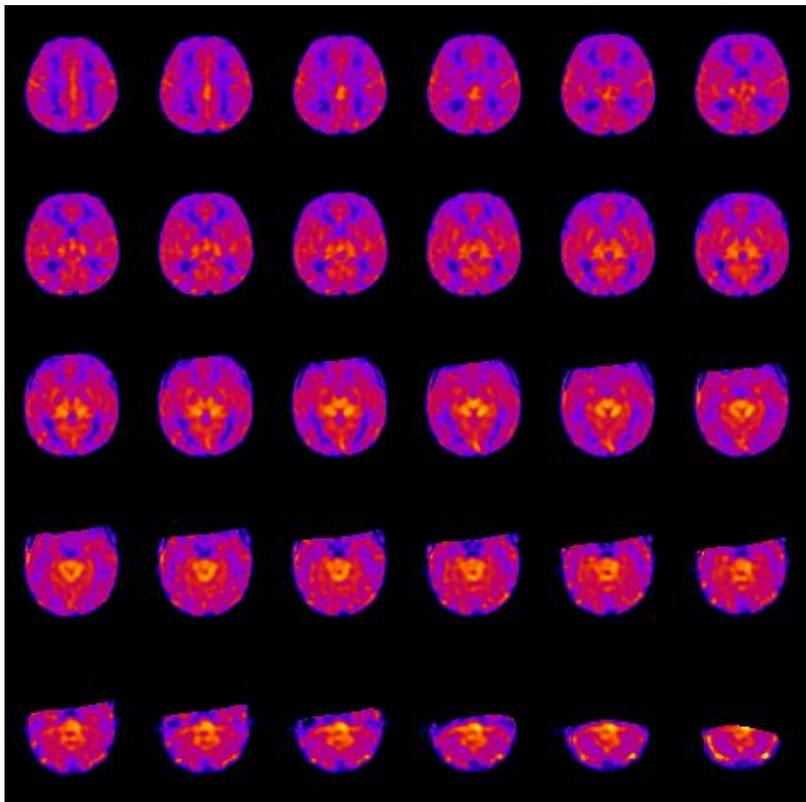


Figura 2. Pattern relativo di iperperfusione corticale dei pazienti che non hanno ricevuto trattamento con TPM. Le aree in gradazione di rosso indicano le regioni dove la perfusione determinata mediante ASL è significativamente ($p < 0.05$) maggiore (crescente dal rosso al giallo) nel gruppo di controllo rispetto ai pazienti trattati con TPM.



A



B

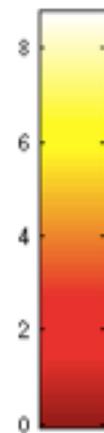


Figura 3. Mappe di perfusione ottenute per analisi di gruppo rispettivamente nei pazienti trattati con ipotermia e TPM (A) e controlli (B). Le aree in gradazione di rosso indicano le regioni dove la perfusione è relativamente maggiore (crescente dal rosso al giallo), rispetto alla gradazione di blu, che indica aree a minore perfusione relativa.

BIBLIOGRAFIA

- Abe, K., J. Kawagoe, M. Aoki, K. Kogure and Y. Itoyama (1998). "Stress protein inductions after brain ischemia." *Cell Mol Neurobiol* 18(6): 709-719.
- Ahn, M. O., L. M. Korst, J. P. Phelan and G. I. Martin (1998). "Does the onset of neonatal seizures correlate with the timing of fetal neurologic injury?" *Clin Pediatr (Phila)* 37(11): 673-676.
- Albensi, B. C., M. P. Schweizer, T. M. Rarick and F. Filloux (1999). "Unilateral hypoxic-ischemic injury in the neonatal rat brain evaluated by in vivo MRI. Correlation with histopathology and neuroprotection by MK-801." *Invest Radiol* 34(4): 249-261.
- Ankarcrona, M., J. M. Dypbukt, E. Bonfoco, B. Zhivotovsky, S. Orrenius, S. A. Lipton and P. Nicotera (1995). "Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function." *Neuron* 15(4): 961-973.
- Azzopardi, D. V., B. Strohm, A. D. Edwards, L. Dyet, H. L. Halliday, E. Juszczak, O. Kapellou, M. Levene, N. Marlow, E. Porter, M. Thoresen, A. Whitelaw, P. Brocklehurst and T. S. Group (2009). "Moderate hypothermia to treat perinatal asphyxial encephalopathy." *N Engl J Med* 361(14): 1349-1358.
- Barkovich, A. J., K. Westmark, C. Partridge, A. Sola and D. M. Ferriero (1995). "Perinatal asphyxia: MR findings in the first 10 days." *AJNR Am J Neuroradiol* 16(3): 427-438.
- Beilharz, E. J., C. E. Williams, M. Dragunow, E. S. Sirimanne and P. D. Gluckman (1995). "Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss." *Brain Res Mol Brain Res* 29(1): 1-14.
- Blennow, M., M. Ingvar, H. Lagercrantz, S. Stone-Elander, L. Eriksson, H. Forsberg, K. Ericson and O. Flodmark (1995). "Early [18F]FDG positron emission tomography in infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy shows hypermetabolism during the postasphyctic period." *Acta Paediatr* 84(11): 1289-1295.
- Bona, E., U. Aden, E. Gilland, B. B. Fredholm and H. Hagberg (1997). "Neonatal cerebral hypoxia-ischemia: the effect of adenosine receptor antagonists." *Neuropharmacology* 36(9): 1327-1338.
- Chakkarapani E., J. Dingley, X. Liu, N. Hoque, K. Aquilina, H. Porter, et al. "Xenon enhances hypothermic neuroprotection in asphyxiated newborn pigs". *Annals of Neurology* 2010;68(3):330-41.
- Cheng, Y., J. M. Gidday, Q. Yan, A. R. Shah and D. M. Holtzman (1997). "Marked age-dependent neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor against neonatal hypoxic-ischemic brain injury." *Ann Neurol* 41(4): 521-529.
- Choi, J. W. and W. K. Kim (2007). "Is topiramate a potential therapeutic agent for cerebral hypoxic/ischemic injury?" *Exp Neurol* 203(1): 5-7.

De Vis, J. B., E. T. Petersen, L. S. de Vries, F. Groenendaal, K. J. Kersbergen, T. Alderliesten, J. Hendrikse and M. J. Benders (2013). "Regional changes in brain perfusion during brain maturation measured non-invasively with Arterial Spin Labeling MRI in neonates." *Eur J Radiol* 82(3): 538-543.

Delivoria-Papadopoulos, M. and O. P. Mishra (1998). "Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention." *J Pediatr* 132(3 Pt 2): S30-34.

Den Hertog, H. M., H. B. van der Worp, M. C. Tseng and D. W. Dippel (2009). "Cooling therapy for acute stroke." *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD001247.

Dubowitz L., E. Mercuri and V. Dubowitz (1998). "An optimality score for the neurologic examination of the term newborn." *J Pediatr* Sept;133(3):406-16.

Edmonds H.L. Jr, Y.D. Jiang, P.Y. Zhang, R. Shank (2001). "Topiramate as a neuroprotectant in a rat model of global ischemia-induced neurodegeneration." *Life Sci* 69:2265-2277.

Edwards, A. D., P. Brocklehurst, A. J. Gunn, H. Halliday, E. Juszczak, M. Levene, B. Strohm, M. Thoresen, A. Whitelaw and D. Azzopardi (2010). "Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data." *BMJ* 340: c363.

Edwards, A. D., X. Yue, P. Cox, P. L. Hope, D. V. Azzopardi, M. V. Squier and H. Mehmet (1997). "Apoptosis in the brains of infants suffering intrauterine cerebral injury." *Pediatr Res* 42(5): 684-689.

Eicher, D. J., C. L. Wagner, L. P. Katikaneni, T. C. Hulsey, W. T. Bass, D. A. Kaufman, M. J. Horgan, S. Languani, J. J. Bhatia, L. M. Givelichian, K. Sankaran and J. Y. Yager (2005). "Moderate hypothermia in neonatal encephalopathy: efficacy outcomes." *Pediatr Neurol* 32(1): 11-17.

Einspieler C., H.F. Prechtel, F. Ferrari, G. Cioni G, A.F. Bos (1997) "The qualitative assessment of general movements in preterm, term and young infants--review of the methodology." *Early Hum Dev* Nov 24;50(1):47-60. Review.

Elmahdy, H., A. R. El-Mashad, H. El-Bahrawy, T. El-Gohary, A. El-Barbary and H. Aly (2010). "Human recombinant erythropoietin in asphyxia neonatorum: pilot trial." *Pediatrics* 125(5): e1135-1142.

Fan X., Heijnen C.J., van der KOOIJ M.A., Groenendaal F., van Bel F. "Beneficial effect of erythropoietin on sensorimotor function and white matter after hypoxia-ischemia in neonatal mice". *Pediatric Research* 2011;69(1):56-61.

Filippi, L., G. la Marca, P. Fiorini, C. Poggi, G. Cavallaro, S. Malvagia, D. E. Pellegrini-Giampietro and R. Guerrini (2009). "Topiramate concentrations in neonates treated with prolonged whole body hypothermia for hypoxic ischemic encephalopathy." *Epilepsia* 50(11): 2355-2361.

Gilland, E., M. Puka-Sundvall, L. Hillered and H. Hagberg (1998). "Mitochondrial function and energy metabolism after hypoxia-ischemia in the immature rat brain: involvement of NMDA-receptors." *J Cereb Blood Flow Metab* 18(3): 297-304.

Gluckman, P. D., J. S. Wyatt, D. Azzopardi, R. Ballard, A. D. Edwards, D. M. Ferriero, R. A. Polin, C. M. Robertson, M. Thoresen, A. Whitelaw and A. J. Gunn (2005). "Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial." *Lancet* 365(9460): 663-670.

Guan, J., L. Bennet, S. George, D. Wu, H. J. Waldvogel, P. D. Gluckman, R. L. Faull, P. S. Crosier and A. J. Gunn (2001). "Insulin-like growth factor-1 reduces postischemic white matter injury in fetal sheep." *J Cereb Blood Flow Metab* 21(5): 493-502.

Guerrini R, L. Parmeggiani(2006). "Topiramate and its clinical applications in epilepsy." *Expert Opin Pharmacother* 7:811–823.

Gunn, A. J. and L. Bennet (2009). "Fetal hypoxia insults and patterns of brain injury: insights from animal models." *Clin Perinatol* 36(3): 579-593.

Gunn, A. J., L. Bennet, M. I. Gunning, P. D. Gluckman and T. R. Gunn (1999). "Cerebral hypothermia is not neuroprotective when started after postischemic seizures in fetal sheep." *Pediatr Res* 46(3): 274-280.

Gunn, A. J., T. R. Gunn, H. H. de Haan, C. E. Williams and P. D. Gluckman (1997). "Dramatic neuronal rescue with prolonged selective head cooling after ischemia in fetal lambs." *J Clin Invest* 99(2): 248-256.

Gunn, A. J., T. R. Gunn, M. I. Gunning, C. E. Williams and P. D. Gluckman (1998). "Neuroprotection with prolonged head cooling started before postischemic seizures in fetal sheep." *Pediatrics* 102(5): 1098-1106.

Gunn A.J., Gunn T.R.. "The 'pharmacology' of neuronal rescue with cerebral hypothermia." *Early Human Development* 1998;53(1):19–35.

Haataja L., E. mercuri, R. Regev, F. Cowan, M. Rutherford, V. Dubowitz, et al (1999). "Optimality score for the neurologic examination of the infant at 12 and 18 months of age." *J Pediatr* 135:153-61.

Haataja L., F. Cowan, E. Mercuri, L. Bassi, A. Guzzetta, L. Dubowitz (2003). "Application of a scorable neurologic examination in healthy term infants aged 3 to 9 months." *J Pediatr* Oct;143(4):546.

Hagberg, H., E. Bona, E. Gilland and M. Puka-Sundvall (1997). "Hypoxia-ischaemia model in the 7-day-old rat: possibilities and shortcomings." *Acta Paediatr Suppl* 422: 85-88.

Hagberg, H., E. Gilland, E. Bona, L. A. Hanson, M. Hahin-Zoric, M. Blennow, M. Holst, A. McRae and O. Soder (1996). "Enhanced expression of interleukin (IL)-1 and IL-6 messenger RNA and bioactive protein after hypoxia-ischemia in neonatal rats." *Pediatr Res* 40(4): 603-609.

- Hagberg, H., E. Gilland, N. H. Diemer and P. Andine (1994). "Hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain: histopathology after post-treatment with NMDA and non-NMDA receptor antagonists." *Biol Neonate* 66(4): 205-213.
- Hammond, C., V. Crepel, H. Gozlan and Y. Ben-Ari (1994). "Anoxic LTP sheds light on the multiple facets of NMDA receptors." *Trends Neurosci* 17(11): 497-503.
- Hara, H., G. Ayata, P. L. Huang and M. A. Moskowitz (1997). "Alteration of protein kinase C activity after transient focal cerebral ischemia in mice using in vitro [3H]phorbol-12,13-dibutyrate binding autoradiography." *Brain Res* 774(1-2): 69-76.
- Hoehn, T., G. Hansmann, C. Buhner, G. Simbruner, A. J. Gunn, J. Yager, M. Levene, S. E. Hamrick, S. Shankaran and M. Thoresen (2008). "Therapeutic hypothermia in neonates. Review of current clinical data, ILCOR recommendations and suggestions for implementation in neonatal intensive care units." *Resuscitation* 78(1): 7-12.
- Holtzman, D. M., R. A. Sheldon, W. Jaffe, Y. Cheng and D. M. Ferriero (1996). "Nerve growth factor protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury." *Ann Neurol* 39(1): 114-122.
- Hoon, A. H., Jr., E. M. Reinhardt, R. I. Kelley, S. N. Breiter, D. H. Morton, S. B. Naidu and M. V. Johnston (1997). "Brain magnetic resonance imaging in suspected extrapyramidal cerebral palsy: observations in distinguishing genetic-metabolic from acquired causes." *J Pediatr* 131(2): 240-245.
- Ilves, P., M. Lintrop, I. Talvik, K. Muug and L. Maipuu (2009). "Changes in cerebral and visceral blood flow velocities in asphyxiated term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy." *J Ultrasound Med* 28(11): 1471-1480.
- Iwai M., Stetler R.A., Xing J., Hu X., Gao Y., Zhang W., et al. "Enhanced oligodendrogenesis and recovery of neurological function by erythropoietin after neonatal hypoxic/ischemic brain injury". *Stroke* 2010;**41**(5):1032–7.
- Jacobs, S., R. Hunt, W. Tarnow-Mordi, T. Inder and P. Davis (2007). "Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy." *Cochrane Database Syst Rev*(4): CD003311.
- Jacobs, S. E., M. Berg, R. Hunt, W. O. Tarnow-Mordi, T. E. Inder and P. G. Davis (2013). "Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy." *Cochrane Database Syst Rev* 1: CD003311.
- Johnston, M. V. (1996). "Developmental aspects of epileptogenesis." *Epilepsia* 37 Suppl 1: S2-9.
- Johnston, M. V. (2000). "Hypoxic-Ischemic Encephalopathy." *Curr Treat Options Neurol* 2(2): 109-116.
- Johnston, M. V. (2001). "Excitotoxicity in neonatal hypoxia." *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7(4): 229-234.

- Johnston, M. V., A. Fatemi, M. A. Wilson and F. Northington (2011). "Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care." *Lancet Neurol* 10(4): 372-382.
- Johnston, M. V., W. H. Trescher and G. A. Taylor (1995). "Hypoxic and ischemic central nervous system disorders in infants and children." *Adv Pediatr* 42: 1-45.
- Kurul, S. H., U. Yis, A. Kumral, K. Tugyan, S. Cilaker, E. Kolatan, O. Yilmaz and S. Genc (2009). "Protective effects of topiramate against hyperoxic brain injury in the developing brain." *Neuropediatrics* 40(1): 22-27.
- Lawn, J., K. Shibuya and C. Stein (2005). "No cry at birth: global estimates of intrapartum stillbirths and intrapartum-related neonatal deaths." *Bull World Health Organ* 83(6): 409-417.
- Lee S.R., S.P. Kim, J.E. Kim (2000). "Protective effect of topiramate against hippocampal neuronal damage after global ischemia in the gerbils." *Neurosci Lett* 281:183–186.
- Li, Y. B., C. Kaur and E. A. Ling (1998). "Neuronal degeneration and microglial reaction in the fetal and postnatal rat brain after transient maternal hypoxia." *Neurosci Res* 32(2): 137-148.
- Liu Y., J.D. Barks, G. Xu, F.S. Silverstein (2004). "Topiramate extends the therapeutic window for hypothermia-mediated neuroprotection after stroke in neonatal rats." *Stroke* 35:1460–1465.
- Ma, D., M. Hossain, A. Chow, M. Arshad, R. M. Battson, R. D. Sanders, H. Mehmet, A. D. Edwards, N. P. Franks and M. Maze (2005). "Xenon and hypothermia combine to provide neuroprotection from neonatal asphyxia." *Ann Neurol* 58(2): 182-193.
- Maller, A. I., L. L. Hankins, J. W. Yeakley and I. J. Butler (1998). "Rolandic type cerebral palsy in children as a pattern of hypoxic-ischemic injury in the full-term neonate." *J Child Neurol* 13(7): 313-321.
- Massaro A.N., M. Bouyssi-Kobar, T. Chang, L.G. Vezina, A.J. du Plessis and C. Limperopoulos (2013). "Brain perfusion in encephalopathic newborns after therapeutic hypothermia." *AJNR Am J Neuroradiol* Mar 14 [epub ahead of print]
- McDonald, J. W., F. S. Silverstein and M. V. Johnston (1987). "MK-801 protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic damage." *Eur J Pharmacol* 140(3): 359-361.
- McDonald, J. W., F. S. Silverstein and M. V. Johnston (1988). "Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system." *Brain Res* 459(1): 200-203.
- McDonald, J. W., F. S. Silverstein and M. V. Johnston (1990). "MK-801 pretreatment enhances N-methyl-D-aspartate-mediated brain injury and increases brain N-methyl-D-aspartate recognition site binding in rats." *Neuroscience* 38(1): 103-113.
- Meek, J. H., C. E. Elwell, D. C. McCormick, A. D. Edwards, J. P. Townsend, A. L. Stewart and J. S. Wyatt (1999). "Abnormal cerebral haemodynamics in perinatally

- asphyxiated neonates related to outcome." *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 81(2): F110-115.
- Menkes, J. H. and J. Curran (1994). "Clinical and MR correlates in children with extrapyramidal cerebral palsy." *AJNR Am J Neuroradiol* 15(3): 451-457.
- Monyer, H. and P. H. Seeburg (1993). "Constituents involved in glutamate receptor signaling." *Hippocampus* 3 Spec No: 125-129.
- Myers, R. E. (1972). "Two patterns of perinatal brain damage and their conditions of occurrence." *Am J Obstet Gynecol* 112(2): 246-276.
- Novelli, A., J. A. Reilly, P. G. Lysko and R. C. Henneberry (1988). "Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced." *Brain Res* 451(1-2): 205-212.
- Okerefor, A., J. Allsop, S. J. Counsell, J. Fitzpatrick, D. Azzopardi, M. A. Rutherford and F. M. Cowan (2008). "Patterns of brain injury in neonates exposed to perinatal sentinel events." *Pediatrics* 121(5): 906-914.
- Olney, J. W., M. T. Price, L. Samson and J. Labruyere (1986). "The role of specific ions in glutamate neurotoxicity." *Neurosci Lett* 65(1): 65-71.
- Palisano, R., P. Rosenbaum, S. Walter, D. Russell, E. Wood and B. Galuppi (1997). "Development and reliability of a system to classify gross motor function in children with cerebral palsy." *Dev Med Child Neurol* 39(4): 214-223.
- Palisano, R. J., W. P. Copeland and B. E. Galuppi (2007). "Performance of physical activities by adolescents with cerebral palsy." *Phys Ther* 87(1): 77-87.
- Pasternak, J. F. and M. T. Gorey (1998). "The syndrome of acute near-total intrauterine asphyxia in the term infant." *Pediatr Neurol* 18(5): 391-398.
- Perlman, J. M. (1999). "Maternal fever and neonatal depression: preliminary observations." *Clin Pediatr (Phila)* 38(5): 287-291.
- Perlman J., Davis P., Wyllie J., Kattwinkel J. "Therapeutic hypothermia following intrapartum hypoxia-ischemia. An advisory statement from the Neonatal Task Force of the International Liaison Committee on Resuscitation". *Resuscitation* 2010;81(11):1459–61.
- Pfund, Z., D. C. Chugani, C. Juhasz, O. Muzik, H. T. Chugani, I. B. Wilds, N. Seraji-Bozorgzad and G. J. Moore (2000). "Evidence for coupling between glucose metabolism and glutamate cycling using FDG PET and 1H magnetic resonance spectroscopy in patients with epilepsy." *J Cereb Blood Flow Metab* 20(5): 871-878.
- Prechtl H.F., C. Einspieler, G. Cioni, A.F: Bos, F. Ferrari, D. Sontheimer (1997). "An early marker for neurological deficits after perinatal brain lesions." *Lancet* May 10;349(9062):1361-3.

Pulera M. R., L. M. Adams, H. Liu, D. G. Santos, R. N. Nishimura, F. Yang, G. M. Cole and C. G. Wasterlain (1998). "Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia." *Stroke* 29(12): 2622-2630.

Randò T., Baranello G., Ricci D., Guzzetta A., Tinelli F., Biagioni E., La Torre G., Epifanio R., Signorini S., Fazzi E., Mercuri E., Cioni G., Guzzetta F (2005). "Cognitive competence at the onset of West syndrome: correlation with EEG patterns and visual function." *Dev Med Child Neurol* 47(11):760-5.

Ricci, D., D. M. Romeo, F. Serrao, L. Cesarini, F. Gallini, F. Cota, D. Leone, A. A. Zuppa, C. Romagnoli, F. Cowan and E. Mercuri (2008). "Application of a neonatal assessment of visual function in a population of low risk full-term newborn." *Early Hum Dev* 84(4): 277-280.

Rivkin, M. J. (1997). "Hypoxic-ischemic brain injury in the term newborn. Neuropathology, clinical aspects, and neuroimaging." *Clin Perinatol* 24(3): 607-625.

Roland, E. H., K. Poskitt, E. Rodriguez, B. A. Lupton and A. Hill (1998). "Perinatal hypoxic-ischemic thalamic injury: clinical features and neuroimaging." *Ann Neurol* 44(2): 161-166.

Rosenbaum, J. L., C. R. Almli, K. D. Yundt, D. I. Altman and W. J. Powers (1997). "Higher neonatal cerebral blood flow correlates with worse childhood neurologic outcome." *Neurology* 49(4): 1035-1041.

Rutherford, M., J. Pennock, J. Schwieso, F. Cowan and L. Dubowitz (1996). "Hypoxic-ischaemic encephalopathy: early and late magnetic resonance imaging findings in relation to outcome." *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 75(3): F145-151.

Rutherford, M., L. Srinivasan, L. Dyet, P. Ward, J. Allsop, S. Counsell and F. Cowan (2006). "Magnetic resonance imaging in perinatal brain injury: clinical presentation, lesions and outcome." *Pediatr Radiol* 36(7): 582-592.

Rutherford, M. A., J. M. Pennock, S. J. Counsell, E. Mercuri, F. M. Cowan, L. M. Dubowitz and A. D. Edwards (1998). "Abnormal magnetic resonance signal in the internal capsule predicts poor neurodevelopmental outcome in infants with hypoxic-ischemic encephalopathy." *Pediatrics* 102(2 Pt 1): 323-328.

Sarkar, S., J. D. Barks, J. R. Bapuraj, I. Bhagat, R. E. Dechert, R. E. Schumacher and S. M. Donn (2012). "Does phenobarbital improve the effectiveness of therapeutic hypothermia in infants with hypoxic-ischemic encephalopathy?" *J Perinatol* 32(1): 15-20.

Sarnat, H. B. and M. S. Sarnat (1976). "Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study." *Arch Neurol* 33(10): 696-705.

Sfaello, I., O. Baud, A. Arzimanoglou and P. Gressens (2005). "Topiramate prevents excitotoxic damage in the newborn rodent brain." *Neurobiol Dis* 20(3): 837-848.

Shankaran, S. (2012). "Hypoxic-ischemic encephalopathy and novel strategies for neuroprotection." *Clin Perinatol* 39(4): 919-929.

Shankaran, S., A. R. Laptook, R. A. Ehrenkranz, J. E. Tyson, S. A. McDonald, E. F. Donovan, A. A. Fanaroff, W. K. Poole, L. L. Wright, R. D. Higgins, N. N. Finer, W. A. Carlo, S. Duara, W. Oh, C. M. Cotten, D. K. Stevenson, B. J. Stoll, J. A. Lemons, R. Guillet, A. H. Jobe, H. National Institute of Child and Human Development Neonatal Research (2005). "Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy." *N Engl J Med* 353(15): 1574-1584.

Sokoloff, L. (1999). "Energetics of functional activation in neural tissues." *Neurochem Res* 24(2): 321-329.

Swaiman K.F, S. Ashwal, D.M. Ferriero (2006). "Pediatric neurology: principles and practice, IV edition."

Thoresen, M., R. Bagenholm, E. M. Loberg, F. Apricena and I. Kjellmer (1996). "Posthypoxic cooling of neonatal rats provides protection against brain injury." *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 74(1): F3-9.

Thoresen M. Xenon and cooling therapy in babies at high risk of brain injury following poor condition at birth: randomised pilot study (the CoolXenon2 Study). clinicaltrials.gov/show/NCT01545271 (accessed 7 December 2012).

Tooley, J. R., S. Satas, H. Porter, I. A. Silver and M. Thoresen (2003). "Head cooling with mild systemic hypothermia in anesthetized piglets is neuroprotective." *Ann Neurol* 53(1): 65-72.

Towfighi, J., N. Zec, J. Yager, C. Housman and R. C. Vannucci (1995). "Temporal evolution of neuropathologic changes in an immature rat model of cerebral hypoxia: a light microscopic study." *Acta Neuropathol* 90(4): 375-386.

Tusor, N., C. Wusthoff, N. Smee, N. Merchant, T. Arichi, J. M. Allsop, F. M. Cowan, D. Azzopardi, A. D. Edwards and S. J. Counsell (2012). "Prediction of neurodevelopmental outcome after hypoxic-ischemic encephalopathy treated with hypothermia by diffusion tensor imaging analyzed using tract-based spatial statistics." *Pediatr Res* 72(1): 63-69.

van Handel, M., H. Swaab, L. S. de Vries and M. J. Jongmans (2007). "Long-term cognitive and behavioral consequences of neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia: a review." *Eur J Pediatr* 166(7): 645-654.

van Laerhoven H., T.R de Haan, M. Offringa, B. Post, J.H. van der Lee (2013). "Prognostic tests in term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review" *Pediatrics* Jan;131(1):88-98.

Vannucci, R. C. (1990). "Current and potentially new management strategies for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy." *Pediatrics* 85(6): 961-968.

Volpe, J. J. (1997). "Brain injury in the premature infant--from pathogenesis to prevention." *Brain Dev* 19(8): 519-534.

Wallace S.J. (2001). "Epilepsy in cerebral palsy." *Dev Med Child Neurol* Oct;43(10):713-7.

Wagner, B. P., J. Nedelcu and E. Martin (2002). "Delayed postischemic hypothermia improves long-term behavioral outcome after cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats." *Pediatr Res* 51(3): 354-360.

Williams, C. E., A. J. Gunn, C. Mallard and P. D. Gluckman (1992). "Outcome after ischemia in the developing sheep brain: an electroencephalographic and histological study." *Ann Neurol* 31(1): 14-21.

Wu, Y. W., L. A. Bauer, R. A. Ballard, D. M. Ferriero, D. V. Glidden, D. E. Mayock, T. Chang, D. J. Durand, D. Song, S. L. Bonifacio, F. F. Gonzalez, H. C. Glass and S. E. Juul (2012). "Erythropoietin for neuroprotection in neonatal encephalopathy: safety and pharmacokinetics." *Pediatrics* 130(4): 683-691.

Xiong, T., Y. Qu, D. Mu and D. Ferriero (2011). "Erythropoietin for neonatal brain injury: opportunity and challenge." *Int J Dev Neurosci* 29(6): 583-591.

Yue, X., H. Mehmet, J. Penrice, C. Cooper, E. Cady, J. S. Wyatt, E. O. Reynolds, A. D. Edwards and M. V. Squier (1997). "Apoptosis and necrosis in the newborn piglet brain following transient cerebral hypoxia-ischaemia." *Neuropathol Appl Neurobiol* 23(1): 16-25.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i bambini e le famiglie che hanno permesso la realizzazione di questo studio.

Si ringraziano la Regione Toscana per il finanziamento fornito al progetto, il reparto di Neonatologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana, i reparti di Terapia Intensiva Neonatale e Neurologia Pediatrica dell'Ospedale Pediatrico Meyer per la collaborazione nella raccolta dei dati.

Un ringraziamento personale al Professor Giovanni Cioni, ad Andrea Guzzetta e Ada Bancale per gli insegnamenti e la passione per questo lavoro, trasmessi quotidianamente.

Grazie a tutte le persone speciali della Sezione di Neurologia della Prima Infanzia per il vostro cuore e la vostra mente.

Un ringraziamento a G. e alla mia famiglia, instancabili e insostituibili sostenitori di ogni giornata.