

RESOCONTO DELLA ATTIVITÀ SVOLTA

Progetto: Danno cerebrale ipossico/ischemico nel neonato:
Studi epidemiologici e sperimentali su diagnosi, terapie e recupero

Responsabile Scientifico: **Dr. Enrico ALLEVA**

L'encefalopatia ipossico-ischemica (H/I) è una condizione patologica che si presenta frequentemente nei neonati e nei bambini durante il periodo pre- e peri-natale e costituisce uno dei principali fattori di rischio per mortalità e morbidità. Sebbene negli ultimi anni il danno ipossico-ischemico sia stato oggetto di studi di tipo biochimico e molecolare, i meccanismi che sottendono il danno neuronale rimangono in gran parte poco conosciuti. Scopo complessivo del progetto era di condurre studi (di tipo sia preclinico che clinico) in vari modelli animali e in pazienti affetti da danno ipossico-ischemico, per meglio caratterizzare i processi biologici di base che determinano il danno e le conseguenze a medio e lungo termine sul fenotipo comportamentale. Inoltre, si voleva ottenere nuove informazioni, per individuare specifici marker da utilizzarsi quali indicatori precoci in ambito ospedaliero, e per proporre possibili strategie (farmacologiche e non) capaci di stimolare quanto più possibile il recupero del danno.

Il progetto comprendeva un approccio multi-disciplinare, avvalendosi infatti di unità operative (UU.OO.) con approccio sia preclinico (sul modello animale, per lo studio dei meccanismi biologici di base) che clinico (sui pazienti affetti, per la caratterizzazione di marker precoci e per un follow-up). Entrambi gli approcci si avvalevano inoltre di competenze di tipo bio-molecolare (U.O. Aloe, U.O. Confaloni), di tipo comportamentale (U.O. Laviola, U.O. Calamandrei), di tipo biochimico-clinico (U.O. Minghetti), di tipo clinico ospedaliero (U.O. Vicari, U.O. Supplej) e di tipo statistico epidemiologico (U.O. Orzalesi, U.O. Chiarotti).

STUDI IN VITRO E SU MODELLI ANIMALI

La U.O. coordinata dal Dr. Luigi Aloe (Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare, CNR, Roma) si occupava principalmente di studiare il ruolo delle neurotrofine nella patogenesi e nel recupero del danno.

I fattori neurotrofici sono molecole (sintetizzate e rilasciate da numerosi tessuti) che ricoprono un importante ruolo non solo nella crescita, differenziazione e funzione dei neuroni, ma anche nei meccanismi di morte neuronale. Infatti, esperimenti su modelli animali sembrano a favore del fatto che l'NGF ed il BDNF, i due più importanti rappresentanti della famiglia delle neurotrofine, sono capaci di prevenire e/o ridurre la morte neuronale indotta da eventi di tipo ipossico-ischemico. Studi più recenti in topi *knockouts* per il NGF suggeriscono che la somministrazione endocerebrale di NGF riduca il danno ischemico indotto su neuroni cerebrali da occlusione dell'arteria cerebrale.

Obiettivo principale del gruppo del dr. Aloe era di studiare **il potenziale ruolo protettivo/terapeutico delle neurotrofine** in lesioni associate a ipossia. I risultati ottenuti dimostrano la presenza di concentrazioni statisticamente significative di NGF nel liquido cerebrospinale e nel plasma di soggetti giovani con lesioni cerebrali associati a fenomeni di ipossia (Chiaretti et al., 2003, 2004; Antonelli et al., 2004). Evidenze su modelli animali condotti nel nostro gruppo di ricerca indicano che l'aumento di fattori neurotrofici (e in particolare di NGF) è associato a meccanismi di riduzione e/o recupero del danno cellulare indotto dall'insulto ipossico/ischemico (Aloe et al., 2002). L'effetto neuroprotettivo di NGF è stato osservato in un modello animale in cui il danno cerebrale ipossico-ischemico viene indotto a seguito della legatura unilaterale della carotide. Questa osservazione è avvalorata da studi condotti in collaborazione con il Dr. Chiaretti ("Pediatric Intensive Care", Università Cattolica di Roma) nell'ambito del progetto ipossia, che dimostrano la proprietà dell'NGF di stimolare la rivascolarizzazione indotta dal danno ischemico (Chiaretti et al., 2002).

Proprio per queste proprietà neuroprotettive, svolte sullo sviluppo dei neuroni cerebrali e sulla morte neuronale postnatale ed adulta, l'NGF potrebbe essere preso in considerazione come molecola potenzialmente coinvolta nella riduzione del danno ipossico cerebrale e/o di altre forme di insulti neuronali che si osservano durante il periodo perinatale.

La U.O. coordinata dalla Dr.ssa Annamaria Confaloni (Dip. Biologia Cellulare e Neuroscienze, ISS, Roma) aveva come obiettivo lo studio del ruolo delle proteine sinaptiche come potenziali marcatori precoci del danno ipossico perinatale.

La degenerazione neuronale a seguito di ipossia-ischemia (H/I) nel sistema nervoso centrale (SCN) in via di sviluppo è mediata da un meccanismo eccitotossico, che porta

all'attivazione un processo di tipo apoptotico. Come è noto, durante la sinaptogenesi, i neuroni possono andare incontro a morte cellulare nel momento in cui le cellule non sono più in grado di raggiungere una normale connessione sinaptica. Si ipotizza che, a seguito della H/I, si possa innescare un processo apoptotico in risposta ad una perdita della capacità di formare normali connessioni sinaptiche. Alcuni autori hanno dimostrato che, a seguito di H/I, la riorganizzazione sinaptica dell'ippocampo può condurre perfino allo sviluppo di epilessia (Williams et al., 2004).

Alcune proteine, come la proteina precursore dell'amiloide (APP) e le preseniline (PS-1 e PS-2), regolate nel corso dell'ontogenesi cerebrale e distribuite nei siti sinaptici anche nell'adulto, vengono sovra-esprese durante alcuni stadi maturativi (sinaptogenesi), per poi diminuire la loro espressione prima della nascita. In seguito ad insulti ambientali e nel corso di alcune malattie neurodegenerative, tali proteine tornano ad essere nuovamente espresse ad alti livelli. L'attività dell'U.O. Confaloni si è incentrata sul rilevamento dei prodotti genici delle preseniline e del loro substrato, per determinare se un insulto ipossico-ischemico perinatale fosse in grado di modularne l'espressione.

Studio sul modello animale - Il modello di asfissia perinatale veniva fornito dall'U.O. Calamandrei in esperimenti descritti nella sezione successiva. I campioni di corteccia ed ippocampo, complessivamente 50 ratti H/I e relativi controlli, venivano analizzati dopo 24 h, 4 giorni e 11 giorni dall'evento ipossico. In una prima fase, abbiamo condotto un'analisi semiquantitativa del profilo di espressione dei geni della **PS-1**, **PS-2** e dell'**APP** nella neocorteccia ed nell'ippocampo dei ratti H/I. Gli mRNA sono stati estratti dai tessuti e successivamente analizzati. Sono state quindi elaborate sequenze oligonucleotidiche per l'amplificazione delle porzioni di interesse dei geni suddetti utilizzando cDNA della β -actina come gene di riferimento (Ricceri et al., 2004). In una seconda fase è stata invece condotta un'analisi quantitativa, mediante Real Time PCR. Analogamente a quanto riportato in colture cellulari ipossiche di retine neonatali di ratto (Lukiw et al., 2001), i trascritti delle preseniline subiscono delle modificazioni significative, in funzione dell'intervallo temporale successivo all'insulto ipossico. L'espressione dei geni rilevata sia nella neocorteccia che nell'ippocampo ha mostrato alcune peculiarità associate ai due diversi distretti cerebrali in esame. In particolare, nella corteccia, entrambe le preseniline (PSs) mostrano, rispetto ai controlli, un incremento di circa il 30% a ventiquattro ore dall'insulto ipossico, incremento che tende a decrescere dopo quattro giorni ed a subire una diminuzione di oltre il 50% dopo gli undici giorni dall'induzione dello stimolo. Nell'ippocampo, invece, le preseniline tendono a rimanere costanti nelle prime ventiquattro ore, rispetto ai controlli, per poi aumentare del 50-70 % a quattro giorni dall'ipossia. Tuttavia, gradualmente, la situazione nei due distretti cerebrali torna ad essere comparabile, tanto che a undici giorni dallo stimolo anche nell'ippocampo si osserva una diminuzione di oltre il 50%.

Gli studi effettuati evidenziano come lo stimolo ipossico-ischemico induca un'attivazione delle preseniline, che gradualmente declina in un intervallo temporale definito. Anche se la

funzione delle PSs è ancora da definirsi, tuttavia alcune indicazioni sperimentali suggeriscono che esse potrebbero essere coinvolte nella regolazione dell'apoptosi. E' da notare, che analogamente a quanto verificato per le PSs, alcuni esperimenti preliminari, condotti dall'U.O.7 a ventiquattro ore dall'induzione dell'ipossia, indicano un incremento del prodotto del gene BAX sia nell'ippocampo che nella corteccia rispettivamente di due e tre volte. Anche l'attività caspasi 3 è risultata essere significativamente aumentata nella cortex dopo 24 h dal trattamento ipossico (Wolozin et al., 1998).

In conclusione questo studio contribuisce a chiarire alcuni aspetti molecolari della risposta cellulare successiva al danno ipossico-ischemico perinatale. I risultati ottenuti stabiliscono *in vivo* una prima connessione tra l'induzione dello stress ipossico e la variazione a breve termine dell'espressione delle preseniline, suggerendo un rapporto causa-effetto il cui significato fisiologico necessita, tuttavia, di un ulteriore approfondimento.

La U.O. coordinata dalla Dr.ssa Gemma Calamandrei (Dip. Biologia Cellulare e Neuroscienze, ISS, Roma) ha svolto una valutazione delle alterazioni comportamentali a breve, medio e lungo termine in un modello animale di ipossia/ischemia perinatale.

La U.O. ha messo a punto e caratterizzato il profilo neuro-comportamentale di un modello animale di ipossia/ischemia perinatale. Tra gli obiettivi vi era la identificazione di biomarcatori, con potenziale trasferibilità clinica per la diagnosi precoce, e il monitoraggio del danno ipossico/ischemico nel neonato. Nel modello sperimentale prescelto (descritto da Bjelke et al., 1991), l'evento di asfissia acuta viene indotto dopo isterectomia a termine immergendo l'utero in un bagno termostato a 37°C per periodi variabili dai 5 ai 20 minuti. I feti vengono quindi liberati dal sacco amniotico e stimolati fino al verificarsi del primo respiro, prima di essere affidati ad una madre adottiva che abbia partorito normalmente nelle 24 ore precedenti. Per periodi di asfissia non superiori a 18-20 minuti, i ratti neonati hanno un'alta percentuale di sopravvivenza, e possono essere perciò seguiti fino all'età adulta, valutando eventuali effetti a breve, medio e lungo termine sul comportamento e su altri parametri biologici di interesse.

Nel corso del primo anno del progetto, nei ratti ipossici sottoposti a periodi di asfissia compresi tra 5 e 20 minuti sono stati analizzati parametri comportamentali relativi allo sviluppo motorio (comportamenti spontanei emessi dai neonati a 7 e 12 giorni di vita), nonché la frequenza di emissione delle vocalizzazioni ultrasoniche nei neonati isolati dal contesto del nido. I risultati (Calamandrei et al., 2004) hanno evidenziato alterazioni della motricità spontanea, più accentuate nei maschi che nelle femmine, e della frequenza di emissioni ultrasoniche a carico dei ratti sottoposti a ipossia severa (20 min). Tali alterazioni del comportamento correlavano positivamente con un aumento significativo nei livelli di F2 isoprostani nei tessuti cerebrali nelle due ore successive all'insulto asfittico (si veda U.O. Minghetti e Confaloni). Questi risultati hanno confermato nel modello murino dati ottenuti in

neonati prematuri con lesioni alla sostanza bianca, nei quali i livelli di F2 isoprostani nel liquor cerebrospinale sembrerebbero correlare con la gravità del danno neurologico (Inder et al., 2002). Inoltre, suggeriscono che tali molecole potrebbero rappresentare un marcatore clinico precoce di disturbi comportamentali ad insorgenza più tardiva. Le alterazioni motorie osservate nei ratti ipossici sono inoltre in accordo con dati recenti che riportano alterazioni sottili della motricità spontanea intorno al 2° mese di vita nel neonato con asfissia perinatale ma senza sequele neurologiche importanti (Cioni et al, 1997).

Nel secondo anno del progetto si è proceduto all'analisi degli effetti a lungo termine dell'asfissia perinatale, selezionando alcuni parametri relativi all'esplorazione di un ambiente nuovo in fase adolescenziale (test di *novelty-seeking*), alle funzioni cognitive e attenzionali (test di *open-field* spaziale), alla risposta a uno stress acuto e cronico, e infine agli effetti comportamentali della stimolazione farmacologica con un agonista specifico dei recettori dopaminergici della classe D1. Nella fase adolescenziale, non è stata osservata alcuna alterazione significativa a carico dell'attività esplorativa degli animali ipossici. Nell'adulto, non si sono evidenziati effetti significativi dell'asfissia perinatale sulla capacità dell'animale di memorizzare la topografia di specifici oggetti in uno spazio circoscritto e di discriminare cambiamenti di tale disposizione, anche se i ratti adulti precedentemente esposti a ipossia severa rispondevano al cambiamento dell'organizzazione spaziale con un incremento dei comportamenti di allarme (i.e. *rearing*). Un'alterata reattività a stimoli ambientali significativi è stata osservata anche nelle femmine adulte, che presentavano un aumento dell'attività locomotoria/esplorativa a scapito di comportamenti di cura dei piccoli quando venivano saggiate in un paradigma di comportamento materno (Cirulli et al., 2003). L'analisi della risposta allo stress acuto e cronico, attraverso la misurazione dei livelli plasmatici di corticosterone, non ha evidenziato differenze marcate nell'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene nei ratti con asfissia perinatale, se non in termini di una risposta più lenta dell'asse allo stress acuto negli animali esposti a ipossia severa. Il dato di maggior rilievo, per quanto riguarda gli effetti a lungo termine, è relativo alla risposta alla somministrazione dell'agonista farmacologico: nei ratti sottoposti a ipossia severa, si osservava una diminuzione dell'attività motoria e una minore incidenza di comportamenti stereotipati rispetto ai ratti di controllo, dato che suggerirebbe un'alterata funzionalità dei recettori dopaminergici D1 (Venerosi et al., 2004). Tale risultato, in accordo con dati recenti, indica **difetti della trasmissione dopaminergica** tra le conseguenze di maggiore rilevanza dell'insulto anossico perinatale di livello lieve/moderato.

Nell'ultima fase del progetto, la caratterizzazione del modello animale si è focalizzata sullo studio delle risposte emozionali nella fase neonatale (analisi delle vocalizzazioni ultrasoniche dopo isolamento e successivo ricongiungimento con la madre), dello sviluppo dei comportamenti affiliativi e sociali nell'adolescenza, e infine della risposta di *fear conditioning* nell'adulto, che prevede il condizionamento a un contesto o a un insieme di stimoli ambientali associati a una punizione. I risultati di questo studio hanno confermato le alterazioni nella frequenza di emissione ultrasonica nei ratti neonati esposti a ipossia severa, che emettono un

numero di vocalizzazioni ultrasoniche significativamente superiore degli animali di controllo in seguito a separazione dalla madre, un effetto osservato selettivamente nel sesso maschile. Un'alterazione nel profilo di vocalizzazione ultrasonica è stata anche osservata nei neonati sottoposti a parto cesareo ma in assenza di ipossia. All'adolescenza, non sono emerse marcate anomalie nel comportamento sociale dei ratti ipossici. Una significativa persistenza nell'investigazione sociale nei confronti di un conspecifico sconosciuto è stata invece osservata nei ratti, sia maschi che femmine, sottoposti a parto cesareo ma in assenza di ipossia. Nel paradigma del *fear conditioning*, i ratti sottoposti a ipossia severa non hanno mostrato deficit associativi, ma presentavano una marcata risposta emozionale (aumentata emissione di ultrasuoni) durante l'esposizione alla stimolazione avversiva (Venerosi et al., 2005). In questi stessi animali, si sta valutando l'espressione del recettore metabotropico per il glutammato in diverse aree cerebrali, con l'obiettivo di evidenziare eventuali alterazioni a lungo termine in un sistema neurochimico coinvolto nella modulazione delle risposte emozionali e dell'ansia.

In conclusione, il modello murino di asfissia perinatale caratterizzato e validato da questa U.O. può essere utilizzato quale riferimento sperimentale per quadri clinici di danno asfittico da lieve a moderato, dove lo stress ossidativo che segue all'insulto (in assenza di marcati quadri lesivi) induce alterazioni funzionali nella maturazione di sistemi neurochimici quali quello dopaminergico, tali da esitare in alterazioni del comportamento a breve, medio e lungo termine, soprattutto nell'ambito delle risposte emozionali e di ansia. In tale contesto, questo modello si presta sia allo studio della patogenesi dei disturbi neuro-comportamentali dell'età evolutiva (come p.es. ADHD, schizofrenia), per i quali le complicazioni ostetriche rappresentano un fattore di rischio, sia per la verifica dell'efficacia di potenziali strategie di recupero e/o neuroprotettive (arricchimento ambientale, fattori neurotrofici).

La U.O. coordinata dal Dr. Giovanni Laviola (Dip. Biologia Cellulare e Neuroscienze, ISS, Roma) ha caratterizzato alterazioni neurocomportamentali in un modello di asfissia neonatale nel ratto, valutando inoltre il ruolo di una possibile strategia terapeutica basata su una stimolazione di tipo ambientale volta a favorire la plasticità e consentire la messa in opera di processi di compensazione e recupero dal danno.

Scopo della U.O. Laviola era quello di mettere a punto un modello di anossia in fase neonatale e approfondire la caratterizzazione di un quadro di alterazione neuro-comportamentale. E' importante sottolineare che il livello di maturazione cerebrale proprio del ratto durante la prima settimana di vita può considerarsi di riferimento a quello proprio del feto umano durante l'ultimo trimestre di gravidanza. L'intervento anossico è stato realizzato con esposizione (*whole body*) ad atmosfera satura di azoto (adattando e modificando quello originariamente proposto da Dell'Anna e colleghi, 1996). Tale modello è stato preferito ad altri per una serie di motivi: 1) non è invasivo e non comporta necessità di chirurgia; 2) permette di

evitare interazioni spesso confondenti associate con la procedura del parto cesareo; 3) non implica la necessità di dare in adozione i piccoli, consentendo invece uno studio fine dell'interazione tra la prole con sofferenza asfittica e la madre naturale; 4) permette la ripetizione dell'evento anossico con possibilità di mimare condizioni di sofferenza croniche e prolungate. I ratti neonati mostrano un'ampia tolleranza fisiologica all'insulto anossico, permettendo la valutazione di eventuali effetti a breve e lungo termine. Un secondo scopo importante di questa U.O. era quello di valutare le possibilità di recupero mediante una strategia di intervento di tipo non farmacologico (o che potesse affiancarsi a quest'ultima) che consisteva nella esposizione della prole durante la fase ancora plastica di tarda infanzia e adolescenza ad un ambiente fisicamente arricchito.

Una certa letteratura, sviluppata originariamente nel campo dell'*animal welfare*, e che più recentemente ha trovato applicazione e interesse nelle neuroscienze ha comparato la fisiologia e il comportamento di animali allevati in condizioni "standard" oppure di "arricchimento" (gabbie più ampie, dotate della presenza di oggetti da manipolare o su cui arrampicarsi o celarsi alla vista, come ad es. ruote per la pratica spontanea dell'esercizio fisico, gallerie, scale, altalene, sonagli, ecc.). La possibilità di interagire con un ambiente fisicamente complesso, specialmente durante fasi sensibili dello sviluppo, stimola la plasticità neuro-comportamentale, consentendo (in una qualche misura) la compensazione e/o recupero da profili alterati neuro-comportamentali di origine genetica o conseguenti a condizioni avverse in fase perinatale (Morley-Fletcher et al., 2001). Queste nozioni sono state confermate dalla U.O. Laviola in una serie di studi preliminari nel ratto, in cui la procedura di arricchimento ambientale è stata applicata al modello dello stress in gravidanza (Morley-Fletcher et al., 2003). La prole esposta a stress precoce mostrava in età giovanile una marcata depressione dei comportamenti affiliativi e di gioco sociale, alterazioni nella fisiologia della risposta allo stress acuto consistenti in una secrezione prolungata di corticosterone, e una riduzione profonda della funzione immunitaria (Laviola et al., 2004a). **La esposizione in adolescenza ad un ambiente arricchito si è rivelata in grado di ricondurre a livelli di normalità l'attività ludica giovanile e la risposta emozionale, e inoltre recuperava gran parte delle alterazioni immunologiche e neuroendocrine.** Questi risultati indicano che l'applicazione di una strategia terapeutica basata sulla stimolazione, mediata dall'ambiente, di una serie di comportamenti propri della specie, a valenza positiva, permette di modulare la consistenza del deficit in modelli di danno neuro-comportamentale precoce.

Un primo studio di esposizione neonatale nel ratto ad asfissia è stato condotto mediante una singola esposizione di 30 minuti ad atmosfera satura di azoto, applicata 12-24 ore dopo la nascita (Laviola et al., 2004b). Intorno alle due settimane di vita postnatale, i ratti con una storia di ipossia neonatale esibivano una ridotta risposta di iperattività locomotoria, associata invece ad una maggiore frequenza di stereotipie comportamentali a seguito di una iniezione con anfetamina, potente agonista indiretto monoaminergico (paradigma sperimentale messo a punto da questa U.O., Tirelli et al., 2003). Tale dissociazione di effetti indica che differenti domini

comportamentali e quindi anche le sottostanti regolazioni a carico di separate aree encefaliche (mesolimbiche e striatali) sono affette in conseguenza della sofferenza anossica neonatale.

Durante la adolescenza, il gruppo esposto ad ipossia risultava fortemente inibito quando confrontato con la scoperta di un ambiente nuovo, e mostrava di evitarlo piuttosto che esplorarlo (padigma di *novelty seeking*, sviluppato da questa U.O., Laviola et al., 2003). Inoltre, questi soggetti esprimevano una riduzione importante dei comportamenti sociali di tipo affiliativo e sollecitativo, ed invece un interesse esagerato per gli oggetti inanimati rispetto ai controlli. In collaborazione con la U.O. Aloe, si è dimostrato che i livelli della neurotrofina *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), che svolge un'azione trofica importante per i neuroni dopaminergici, risultavano significativamente ridotti nell'area dello striato in ratti adulti esposti ad asfissia neonatale. Questo dato rappresenta l'identificazione di un marcatore di alterata plasticità neuronale, e specificamente suggerisce una ridotta funzionalità delle vie dopaminergiche come conseguenza a lungo termine di una asfissia neonatale. Tale quadro neurobiologico può dar conto dei deficit di interesse verso l'interazione sociale, della ridotta motivazione verso stimoli legati all'ambiente, fino a sfociare in una franca neofobia. Consistente con un quadro patologico comportamentale generale è anche l'accresciuta suscettibilità all'espressione di stereotipie comportamentali, uno degli endofenotipi caratteristici di sindromi psichiatriche autistiche e schizofreniche.

In un secondo studio, a seguito della fruttuosa interazione e stimolazione da parte delle U.O. cliniche, ci si è avvalsi della possibilità offerta dal modello adottato di applicare una esposizione ripetuta (20 minuti al dì, ad atmosfera satura di azoto) nei giorni postnatali 1, 3, 5 e 7 volta a valutare la possibilità di graduare e eventualmente accentuare le conseguenze dell'asfissia neonatale. Questa procedura si è dimostrata in grado di indurre cambiamenti comportamentali in età adulta, quali ridotta reattività emozionale e di ansia (test del *plus maze*) che si associava a bassi livelli di attenzione verso gli stimoli presenti nell'ambiente. In associazione con tale quadro alterato di comportamento si sono evidenziate modifiche importanti neurobiologiche per quanto riguarda il sistema degli aminoacidi eccitatori. Specificamente si è evidenziata una ridotta funzionalità dei recettori metabotropici per il glutammato in area ippocampale, come conseguenza di una condizione asfittica cronica neonatale (studi condotti in collaborazione con le Dr.sse Casolini e Catalani, Dip. di Farmacologia, Università "La Sapienza", Roma; Casolini et al., 2005). In una successiva replica di tale procedura con asfissia ripetuta, una metà della prole è stata alloggiata durante la fase dell'adolescenza (giorni 21-35 di vita) in un ambiente arricchito, al fine di valutare le potenzialità di contrastare efficacemente le alterazioni legate alla sofferenza ipossica neonatale. Durante un test di competenza sociale, i ratti adolescenti con ipossia neonatale esibivano livelli esagerati di investigazione anogenitale; un profilo interpretabile in termini di aggressività latente. In età adulta, gli stessi soggetti esibivano un aumento notevole dei livelli di comportamento impulsivo (misurato tramite un paradigma sperimentale messo a punto da questa U.O., Adriani et al., 2003; Adriani & Laviola, 2004), indicativo di deficit nelle capacità

di autocontrollo. Consistente con tale quadro, venivano evidenziate alterazioni neurobiologiche nella area dello striato, con la densità dei recettori 5-HT(2A) per la serotonina che risultava notevolmente aumentata nel gruppo esposto ad asfissia neonatale alloggiato in condizioni standard. Tutti questi parametri risultavano invece normalizzati negli animali alloggiati in condizioni di arricchimento ambientale (Adriani et al, 2005).

Si può pertanto concludere che il modello di asfissia neonatale nel ratto messo a punto e caratterizzato da questa U.O. mette a disposizione uno strumento di analisi patogenetica di complicate ostetriche per coloro che nel campo biomedico e psicologico-sperimentale ne studiano le conseguenze e le alterazioni relative alla maturazione del sistema nervoso e del comportamento. Una serie di eventi ambientali avversi occorsi precocemente, spesso in interazione con specifiche vulnerabilità di natura genetica, danno luogo a profili di alterato neurosviluppo sino a sfociare in sindromi neuropsichiatriche importanti dell'età evolutiva (vedi Laviola & Andersen, 2003). Dal modello animale, emerge che la stimolazione e soprattutto la possibilità di mettere in atto comportamenti motori e sociali più articolati propri della specie, a seguito della interazione con un ambiente spazialmente complesso in età adolescenziale, permetterebbe un certo grado di recupero (a livello neurobiologico e comportamentale) dalle alterazioni conseguenti a sofferenza asfittica neonatale.

La U.O. coordinata dalla Dr.ssa Luisa Minghetti (Dip. Biologia Cellulare e Neuroscienze, ISS, Roma) si è occupata di identificare potenziali “marker” precoci del danno ossidativo causato da ipossia/ischemia perinatale, mediante studi in vitro and ex vivo in modelli animali, e valutarne la applicabilità nella pratica clinica.

L'attività dell'U.O. ha riguardato la ricerca di indici ossidativi ed infiammatori correlati al danno cerebrale, mediante l'utilizzo di sistemi cellulari ex vivo e in vitro. In particolare, come indicatori di stress ossidativo e di perossidazione lipidica sono stati scelti gli isoprostani, in quanto la loro misurazione ha già consentito alla nostra unità di dimostrare in maniera diretta la presenza di stress ossidativo in neuropatologie infiammatorie dell'adulto (Greco et al., 2000). Contestualmente, sono stati analizzati altri parametri legati alla risposta infiammatoria, quali la PGE₂ e gli enzimi ciclo-ossigenasi 2 (COX-2) e ossido-nitrico-sintetasi inducibile (iNOS).

Studi in vitro. In una prima fase, abbiamo utilizzato colture oligodendrocitarie preparate da cervello di ratto neonato, per approfondire la conoscenza sulla suscettibilità di queste cellule all'insulto da radicali liberi in funzione del loro stadio differenziativo. Gli oligodendrociti sono cellule preposte alla formazione della guaina mielinica nella sostanza bianca, e rappresentano un bersaglio elettivo del danno ipossico prenatale e perinatale. Dagli studi effettuati, è emerso che le forme più immature (pre-oligodendrociti) sono particolarmente vulnerabili al danno ossidativo rispetto alle cellule mature (oligodendrociti che sintetizzano proteine della mielina). Infatti, sono stati trovati elevati livelli di isoprostano (in particolare

l'isoprostano 8-epi-PGF₂ o, secondo la più recente classificazione IUPAC, 15-F_{2t}-IsoP), nei terreni di coltura degli oligodendrociti esposti a stress ossidativo e nitrosativo. Questi livelli erano maggiori nei pre-oligodendrociti rispetto alle cellule mature, e correlavano con la percentuale di cellule danneggiate, con l'aumento dei livelli di espressione della proteina pro-apoptotica caspasi 3, e con un squilibrio tra gli enzimi "scavenger" superossido dismutasi e catalasi, i quali potrebbe favorire la formazione di radicale idrossile, una delle specie radicaliche più reattive e dannose per gli oligodendrociti (Bernardo et al., 2003).

Studi su modelli animali. Studi effettuati su un modello animale di asfissia globale perinatale (sviluppato dall'U.O. Calamandrei) hanno dimostrato che i livelli cerebrali di isoprostano aumentano in maniera rapida e transitoria in seguito all'evento ipossico perinatale. Abbiamo, infatti, riscontrato un aumento dei livelli cerebrali di 15-F_{2t}-IsoP già dopo due ore dall'insulto. Tale aumento precede la comparsa di altri indici infiammatori, quali la prostaglandina E₂, e l'espressione degli enzimi inducibili COX-2 e iNOS (Calamandrei et al., 2004). Questi risultati suggeriscono che la formazione di isoprostano sia dipendente dalla perossidazione lipidica da parte di radicali liberi prodotti in seguito all'insulto ipossico, e che preceda la risposta infiammatoria che ha luogo in uno stadio successivo. Queste osservazioni ci consentono quindi di ipotizzare che i livelli di isoprostano possano rappresentare un marker precoce di insulto ipossico-ischemico, potenzialmente predittivo dei disturbi neurologici e comportamentali evidenziati negli animali ipossici a partire dalla seconda settimana di vita (si veda l'U.O. Calamandrei).

Studi sul plasma da cordone ombelicale. I dati ottenuti nel modello animale suggeriscono che l'isoprostano 15-F_{2t}-IsoP possa rappresentare un indicatore precoce di danno neurologico di lieve entità. Un indicatore di questo tipo potrebbe essere di grande utilità clinica, al fine di individuare precocemente neonati in cui un eventuale danno ipossico manifesterà i propri effetti solo successivamente, con sottili disturbi neurologici e del comportamento. La precoce individuazione di questi soggetti è un prerequisito essenziale per un efficace trattamento farmacologico. Al fine di avviare uno studio clinico, che consenta di verificare i risultati ottenuti nel modello animale, abbiamo sviluppato nuove procedure analitiche adatte alla misurazione di isoprostano in fluidi biologici, ottenibili con tecniche non invasive quali il plasma da sangue di cordone ombelicale o vasi placentari. La complessità della procedura di purificazione pre-analitica è legata sia all'interferenza della matrice (le proteine e i lipidi plasmatici), sia al ridotto volume di liquido biologico disponibile, soprattutto nel caso di neonati pretermine. Le procedure messe a punto prevedono la realizzazione di microcolonne per immunoaffinità (resine adsorbite con un anticorpo specifico per l'isoprostano 15-F_{2t}-IsoP). Dall'analisi preliminare, effettuata su campioni di plasma ottenuti sia da cordone ombelicale sia da placenta (forniti dall'U.O. Suppiej), è risultato che in entrambe le matrici è possibile estrarre e misurare, in maniera riproducibile, quantità rilevabili di isoprostano a partire da volumi di 50-100 microlitri di plasma. La disponibilità di questa metodica analitica consentirà di eseguire uno studio clinico volto a verificare la valenza diagnostica di questo marcatore, e il suo

possibile utilizzo nelle strategie di intervento terapeutico da adottare nelle ore immediatamente successive alla nascita.

In conclusione, i risultati complessivi degli studi hanno consentito di approfondire la conoscenza dei meccanismi biochimici alla base del danno neuronale ipossico-ischemico perinatale, e di sviluppare strumenti analitici necessari per la validazione del potenziale “marker” evidenziato dagli studi in vitro e in modelli animali (Greco & Minghetti, 2004)

STUDI CLINICI ED EPIDEMIOLOGICI

La U. O. coordinata dalla Dr.ssa Agnese Suppiej (Università di Padova) si è occupata delle correlazioni tra Potenziali Evocati Multimodali e indicatori bioumorali di insulto neurologico.

L’U.O. si è dedicata allo studio della capacità dei Potenziali Evocati (PE) nel predire precocemente eventuali sequele neurologiche e cognitive in neonati affetti da asfissia perinatale. I risultati ottenuti utilizzando i PE sono stati confrontati con quelli di altri indicatori prognostici che fanno parte della routine clinica: esame neurologico, elettroencefalogramma (EEG) ed ecografia cerebrale (EC).

Abbiamo studiato 61 neonati così suddivisi: 42 pazienti, 11 nati pretermine (28-36 SG) e 31 nati a termine (>36 SG), con indice di Apgar ≤ 6 al 5° minuto e pH ≤ 7.25 ; 19 neonati sani di cui 11 nati pretermine a basso rischio neurologico e 8 nati a termine. Su tutti i neonati abbiamo eseguito: a) una valutazione neurologica, l’EEG e l’ecografia cerebrale (EC) entro le prime 48 ore di vita; b) i potenziali evocati visivi (PEV) e somatosensoriali (PES), valutati alla seconda settimana di vita nei neonati a termine e all’età di 40 settimane post-concezionali nei neonati pretermine. Abbiamo seguito i neonati fino ai 2 anni di età. Il follow-up consisteva nella ripetizione di PES, PEV ed esame neurologico a distanza di 1, 3, 6 e 12 mesi, e nell’esecuzione del BSID-II a 24 mesi.

Abbiamo calcolato specificità, sensibilità, valore predittivo positivo e negativo dell’esame neurologico, dell’EEG, dell’EC e dei PE, ed abbiamo valutato la correlazione degli esami strumentali con l’esame neurologico alla nascita e con il follow-up a 12 e 24 mesi. Mediante t-test abbiamo confrontato i risultati ottenuti nei neonati con diagnosi di asfissia e nel gruppo di controllo. E’ stata effettuata una analisi separata dei neonati a termine e pre-termine, in quanto i “pattern” anatomico-funzionali di sofferenza ipossico-ischemica sono diversi; inoltre il “timing” nell’esecuzione dei PE rispetto alla fase acuta e’ stato diverso.

Nel **gruppo di controllo**, tutti i nati a termine sono risultati normali al follow-up a 12 e 24 mesi, tutti i nati pre-termine sono risultati normali al follow-up a 12 mesi, mentre a 24 mesi in un caso si è osservata un’anomalia del BSID-II.

Nel **gruppo con asfissia**, l'esame neurologico eseguito a 12 mesi è risultato patologico in 3/31 pazienti nati a termine e 2/11 pazienti pre-termine. In tutti si è osservata l'assenza bilaterale delle componenti corticali dei PES neonatali. **Nei nati a termine**, i PE hanno dimostrato la maggior correlazione con l'evoluzione ($p=0.001$), sensibilità e specificità sono buone per entrambe gli EEG (rispettivamente 68 e 84 %) e i PE (rispettivamente 63 e 83%). L'analisi dei singoli casi sembra indicare che i PES sono particolarmente utili nel precisare meglio la prognosi in quei casi con severità intermedia del quadro clinico-EEG. **Nei neonati pre-termine**, lo strumento con migliore predittività è stata l'ecografia cerebrale (EC); ipotizziamo che in questi pazienti la scarsa significatività dei PES sia dovuta ad un errato "timing" d'esecuzione: le registrazioni sono state infatti eseguite a 40 settimane post-concezionali, forse troppo tempo dopo la fase acuta dell'insulto asfittico.

Una alterata evoluzione psico-motoria e comportamentale all'età di 24 mesi è emersa in 3/11 neonati a termine e 5/7 neonati pre-termine risultati esenti da alterazioni neurologiche all'età di 12 mesi. Questi bambini hanno presentato delle alterazioni nella qualità motoria nell'ambito della scala comportamentale, e nonostante il funzionamento mentale fosse complessivamente adeguato per l'età, si è osservato un disarmonico profilo delle competenze, possibile indice di un rallentamento in alcune aree, in particolare quella del linguaggio espressivo. Se questi risultati stiano a significare che i PES possono predire eventuali future difficoltà nell'apprendimento sarebbe da verificare su una più larga popolazione, estendendo il follow-up all'età scolare.

Dalla analisi dei dati, emerge che le anomalie più lievi dei PES, costituite da un rallentamento della conduzione lungo le vie somatosensoriali centrali, presentano una correlazione migliore, rispetto agli altri indicatori prognostici, con problemi psicomotori e comportamentali a 2 anni di età documentabili dal BSID-II ($p=0.0008$). I dati neurofisiologici ed ecografici sono complementari, ciò è particolarmente evidente nel neonato pretermine in cui la sede anatomica delle alterazioni è facilmente esplorabile con l'ecografia transfontanellare. Il follow-up neurofisiologico, infine, evidenzia una normalizzazione entro i primi 3-6 mesi di vita, anche nei bambini con alterazioni importanti dei PE alla nascita che hanno sviluppato una paralisi cerebrale.

In conclusione, questo studio suggerisce **un importante ruolo dei potenziali evocati nella prognosi di sequele neuro-psichiche** nel neonato affetto da encefalopatia ipossico ischemica. Essi sembrano aggiungere informazioni ulteriori rispetto a quelle che si ottengono con esami già entrati nella routine clinica di questi pazienti nelle seguenti situazioni: 1) per il paziente nato a termine che presenta una severità clinico-EEG intermedia (stadio 2 di Sarnat), in cui la previsione di futura paralisi cerebrale è più difficile; 2) per il paziente con un quadro clinico-EEG lieve, che potrebbe essere a rischio di esiti cognitivo-comportamentali a distanza. Il "timing" dell'esecuzione dei PE è cruciale, infatti si osserva una precoce scomparsa delle alterazioni anche in presenza di quadri neurologici severi.

La U.O. coordinata dal Dr. Stefano Vicari (IRCCS-Ospedale Bambin Gesù, Santa Marinella) si è occupata di valutare abilità cognitive verbali e visuospatiali in pazienti con lesioni precoci degli emisferi destro o sinistro.

Numerose osservazioni riportate in letteratura hanno discusso gli effetti di lesioni cerebrali focali, ovvero limitate ad un solo emisfero, sullo sviluppo del linguaggio e delle abilità cognitive in genere. Secondo la teoria della *plasticità cerebrale* il cervello dei bambini è particolarmente capace di mostrare un recupero dopo lesioni che in un adulto avrebbero, invece, effetti irreversibili (Kennard, 1936). Nella teoria dell'equipotenzialità emisferica (Lennenberg 1967), una lesione emisferica precoce può essere completamente recuperata dalle aree non lese all'interno dell'emisfero leso o dall'emisfero sano (Annett, 1973; Arena & Gainotti, 1978). Questa plasticità perderebbe di potenza via via che si procede verso un funzionamento cognitivo adulto. In contrapposizione si è andata via via affermando la teoria dell'invarianza della specializzazione emisferica: gli emisferi cerebrali sono sede di un programma genetico biologico che li differenzia. Questo significa che una funzione può essere processata, nei suoi aspetti più fini, solo dal suo emisfero. In caso di lesione, solo gli aspetti elementari, ma non gli aspetti più sofisticati, possono essere vicariati dall'emisfero sano. Anche lesioni acquisite in epoca prenatale o perinatale non sarebbero, quindi, del tutto recuperabili.

Sulla base di quanto riportato, la presente ricerca si è posta l'obiettivo di valutare le abilità cognitive (linguaggio, abilità visuo-spaziali, abilità visuo-percettive) di una ampia popolazione di persone con lesioni cerebrali unilaterali precoci, con riferimento alla sede della lesione (sinistra vs. destra) e con particolare attenzione agli aspetti metodologici. Capire e descrivere il profilo cognitivo dei bambini nati prematuri può fornire indicazioni fondamentali circa l'individuazione di possibili indici di rischio precoci e di adeguate strategie di intervento, e può dare nel contempo un contributo alla disputa "plasticità vs specializzazione emisferica".

Nel corso della ricerca abbiamo selezionato un gruppo di 34 bambini con lesioni focali unilaterali di cui 18 con lesione emisferica destra (età media = 8.3 anni, d.s. = 4.2) e 16 con lesione emisferica sinistra (età media = 7.9 anni, d.s. = 2.7). Le loro prestazioni sono state paragonate a quelle di 28 bambini con sviluppo tipico (ST), di pari età cronologica (età media = 8.1 anni, d.s. = 3.5) e livello socioculturale. Ai due gruppi sono state proposte prove psicometriche, prove di linguaggio, prove visuo-spaziali, prove visuo-percettive. Riportiamo di seguito i principali risultati emersi dallo studio:

Abilità linguistiche: In tutte le prove somministrate, i bambini con lesione focale sinistra mostravano prestazioni significativamente peggiori dei loro controlli con sviluppo tipico. Tali differenze apparivano fortemente significative in prove di comprensione lessicale e morfo-sintattica (Peabody Picture Vocabulary Test e Token Test). I bambini con lesione emisferica sinistra ottenevano prestazioni deficitarie alla prova di denominazione (Boston Naming Test) e soprattutto in prove di Fluidità Verbale sia ad accesso fonologico che

categoriale-semantic. Riguardo le prestazioni di bambini con lesioni focali, destre non sono emerse differenze statisticamente significative in nessuno dei compiti somministrati.

Abilità visuospaziali: Dal confronto diretto dei bambini con lesione sinistra e destra non sono emerse differenze statisticamente significative. Tuttavia, da un'analisi qualitativa delle prestazioni ottenute nel compito di integrazione visuomotoria, emerge che i due gruppi si comportano in modo diverso. In particolare, i bambini con lesione emisferica destra realizzano i loro disegni privilegiando la rappresentazione di elementi costitutivi parziali tralasciando invece la configurazione globale dello stimolo, in accordo a quanto trovato da Stiles-Davis [1988]. Al contrario, i bambini con lesione emisferica sinistra si comportano in modo esattamente speculare, ricordando quanto osservato in pazienti cerebrolesi adulti.

Abilità visuoperceptive: Sia nei bambini con lesione focale sinistra sia nei bambini con lesione focale destra, i risultati ottenuti risultano sovrapponibili a quelle del gruppo di bambini con sviluppo tipico (capacità di percezione visiva adeguate alla loro età cronologica).

Sulla base dei risultati descritti, è possibile affermare che in caso di coinvolgimento dell'emisfero sinistro il deficit sembra riguardare principalmente l'area delle abilità linguistiche (comprensione e produzione verbale). Al contrario, quando insorgono in età precoci lesioni a carico dell'emisfero destro, le maggiori difficoltà sono rilevabili nell'area delle abilità visuospaziali, ed in particolare difficoltà nella riorganizzazione globale degli stimoli. L'insieme dei nostri risultati sembra confermare alcune osservazioni riportate in letteratura, sottolineando, in particolare, come bambini con lesione cerebrale focale possano presentare deficit neuropsicologici anche a distanza d'alcuni anni dal momento in cui la lesione si è verificata.

La U.O. coordinata dal Prof. Marcello Orzalesi (IRCCS-Ospedale “Bambino Gesù”, Roma) si è occupata di studiare i principali fattori di rischio di morte e di esiti a distanza e di identificare indici prognostici affidabili nei neonati con peso alla nascita ed età gestazionale molto bassi.

La ricerca, si poneva l'obiettivo di identificare i principali fattori di rischio di mortalità e morbilità nei neonati con peso ed età gestazionale molto bassi (<1500g. e/o 32 sett.), i cosiddetti Very Low Birth Weight Infants (VLBWI) nel nostro Paese. La ricerca si è orientata prevalentemente su tre fronti: 1) l'identificazione dei principali fattori di rischio che determinano la prognosi immediata dei VLBWI in Italia (indagine multicentrica nazionale); 2) l'identificazione di indici prognostici di gravità clinica alla nascita o nelle prime ore di vita in grado di prevedere un esito infausto nei VLBWI (indagine multicentrica regionale nel Lazio; 3) la descrizione delle principali caratteristiche dei VLBWI al follow-up a distanza (indagine monocentrica presso l'Ospedale Bambino Gesù di Roma).

La prima indagine, riferita a tutti i VLBWI nati vivi in un anno (2001) in Italia e ricoverati in un reparto di neonatologia, ha prodotto i seguenti risultati:

1 - I neonati VLBW rappresentano nel nostro Paese circa lo 0.9 % di tutti i nati vivi (4679 su 550.000), ma contribuiscono per circa il 50 % alla mortalità neonatale totale.

2 - La mortalità ospedaliera dei VLBW è stata del 19,6 %, con un incremento progressivo dalla classe di peso più alta (1250-1500 g; 5.5 %) a quella più bassa (<500 g; 87.7 %). La mortalità era più elevata nei neonati partoriti in strutture prive di una terapia intensiva neonatale (TIN) (“outborn”- 23.2 %), rispetto a quelli partoriti in ospedali con una TIN (“inborn”- 18.8 %).

3 - La proporzione di neonati “outborn” aumentava progressivamente dalle regioni del Nord (13.5 %), a quelle del Centro (16.3 %) e a quelle del Sud e Isole (25.4 %). Anche la mortalità dei VLBW aumentava dal Nord (14.5 %), al Centro (19.9 %) e al Sud (23.4 %); questo trend era attribuibile quasi esclusivamente ai neonati “inborn”. Anche la mortalità neonatale totale (in tutti i nati vivi in Italia) presentava un analogo gradiente Nord-Sud (0.27 %, 0.32 %, 0.44 %).

Questi dati indicano una forte disomogeneità nel nostro Paese sia nell’organizzazione che nella qualità delle cure al neonato, con una scarsa “regionalizzazione” delle cure perinatali e una quota elevata di neonati VLBW “outborn”, soprattutto nelle regioni del Sud. Tuttociò ha degli importanti riflessi negativi sulla prognosi immediata dei neonati di peso molto basso.

La seconda indagine è stata effettuata su tutti i VLBWI nati nel Lazio nell’arco di due anni e ricoverati presso le 12 TIN della regione (1447 neonati) ed ha prodotto i seguenti risultati:

1 - La mortalità ospedaliera è stata del 20.3 % e l’incidenza di esiti gravi alla dimissione è stata: del 5.7 % per la retinopatia della prematurità (ROP III e IV stadio); del 9.0 % per la malattia polmonare cronica (CLD/BPD); del 9.5 % per la leucomalacia periventricolare (PVL).

2 - La percentuale di nati “outborn” è stata del 28.4 % e quella dei neonati nei quali era stata effettuata una corretta profilassi prenatale con gluco-corticosteroidi è stata solo del 48.7 %.

3 - I principali determinanti della mortalità ospedaliera (in base ad un’analisi multivariata secondo il modello di Cox) sono stati: il basso peso alla nascita, il basso punteggio di Apgar a 5 minuti, il luogo di nascita (“outborn”/”inborn”), il non avere fatto una profilassi prenatale con gluco-corticosteroidi e un elevato fabbisogno di ossigeno nelle prime 12 ore di vita.

4 - Sia il punteggio CRIB (sei variabili) che un nuovo punteggio di gravità, il PAS, basato su sole quattro variabili (peso, Apgar a 5 min, profilassi con steroidi e luogo di nascita) hanno dimostrato un buon valore prognostico predittivo di mortalità (area sotto la curva ROC rispettivamente di 0.89 e di 0.88), nettamente migliore di quello del solo peso alla nascita o dell’età gestazionale.

Questi dati indicano come anche nel Lazio una quota ancora troppo elevata di VLBW nasca in ospedali non dotati di un reparto TIN (“outborn”) e non riceva una corretta profilassi prenatale con gluco-cortico-steroidi. Essi dimostrano anche l’applicabilità nel nostro Paese del punteggio CRIB, già utilizzato con successo in altri Paesi con contesti socio-assistenziali diversi dal nostro, e l’affidabilità di un nuovo e originale punteggio di gravità, il PAS, che ha il vantaggio di utilizzare un numero di variabili minore e meno soggettive del CRIB. Questi punteggi di gravità sono utili per identificare classi omogenee di rischio quando si effettuino studi controllati sull’efficacia di approcci diagnostico-assistenziali innovativi e/o quando si desideri valutare l’effetto di fattori di rischio aggiuntivi, come l’ipossia perinatale.

La terza indagine si riferisce a 49 VLBWI dimessi dalla TIN dell'Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù", senza sintomatologia clinica degna di rilievo, studiati all'età media di 4.5 anni, e paragonati ad un campione di 50 neonati a termine sani di pari età. In ambedue i gruppi è stata somministrata un'ampia batteria di test (Griffiths Mental Development Scales, Boston Test, Category Test, Rustioni, Storie Figurate "IL Palloncino", Visual Motor Integration, Block Building, Campanelle, Longoni).

La percentuale di bambini con quoziente di sviluppo globale nella norma è stata del 94 % nei VLBWI e del 98 % nei nati a termine. I valori medi dei punteggi nei VLBWI sono stati significativamente ($p < 0.005$) più bassi di quelli dei nati a termine in tutte le componenti del test: capacità visuo-motoria, motoria, linguaggio, autonomia, ragionamento, performance. Le differenze permanevano significative anche dopo aver controllato per l'effetto di variabili socio-demografiche (scolarità ed età dei genitori) in un modello di analisi multivariata. Questi dati dimostrano che la prematurità severa, anche in assenza di patologie neonatali importanti, si associa a problemi neuro-psicologici ancora presenti dopo i 4 anni di età.

La U.O. coordinata dalla dr.ssa Flavia Chiarotti (Dip. Biologia Cellulare e Neuroscienze, ISS, Roma) si è occupata di valutare gli effetti di fattori socio-ambientali sugli esiti neurocognitivi in età prescolare della prematurità e del basso peso alla nascita.

I bambini nati pretermine e/o VLBW (very low birth weight) costituiscono una parte consistente dei bambini con deficit neurologici maggiori. Altre sequele importanti della prematurità e/o basso peso sono rappresentate dai deficit sensoriali della vista e, meno frequentemente, dell'udito. Oltre a questi esiti, definiti maggiori, sono riportati in letteratura disturbi di sviluppo cosiddetti minori, che si concretizzano in problemi dello sviluppo motorio, dell'apprendimento e del comportamento sociale. I numerosi studi di follow-up, ormai disponibili in letteratura, sono generalmente centrati sul versante cognitivo dello sviluppo, ma negli ultimi anni altri studi si sono proposti di valutare in che modo la nascita prematura possa influenzare lo sviluppo dell'organizzazione della vita mentale del bambino. Pur essendo i risultati di questi studi poco standardizzabili e generalizzabili (date le notevoli difficoltà metodologiche), essi sembrano segnalare in modo unanime che i bambini nati pretermine mostrano di avere difficoltà più o meno intense nella maggior parte delle aree di sviluppo, particolarmente nel campo dell'alimentazione, dei ritmi sonno-veglia, dell'organizzazione motoria e dello sviluppo e utilizzazione del linguaggio pur senza presentare quadri patologici definiti. La maggior parte dei deficit di sviluppo gravi viene diagnosticata entro il primo anno di vita del bambino, mentre il riconoscimento delle disabilità minori è più difficile e spesso avviene solo in età prescolare o scolare (Chiarotti et al., 2001).

L'attività dell'U.O. ha riguardato la valutazione degli effetti di fattori socio-ambientali sugli esiti neuocognitivi minori della prematurità, mediante uno studio longitudinale

prospettico su bambini pretermine e bambini nati a termine, ai fini dell'individuazione di possibili strategie di supporto psicopedagogico di tipo familiare, per un miglioramento della prognosi di disturbi del comportamento nei bambini prematuri nella fascia di età prescolare. A tale scopo, è stata selezionata una coorte di 24 bambini nati pretermine (età gestazionale: 26-36 settimane) e/o basso peso alla nascita (550-2500g), senza disabilità maggiori, nati presso il centro di Terapia Intensiva Neonatale (TIN) dell'Ospedale S. Eugenio di Roma tra il 1996 e il 1998. Tali bambini vengono seguiti secondo un programma di visite standardizzato presso l'ambulatorio dedicato al *follow-up* dello stesso centro, per almeno 3 anni a partire dalla nascita (età all'ultima visita di *follow-up* compresa fra i 3 e i 6 anni). Sono stati selezionati inoltre 28 controlli, tra i bambini nati a termine frequentanti una scuola materna statale prossima all'ospedale S. Eugenio (stesso bacino di utenza dell'Ospedale).

Le informazioni sui fattori potenzialmente prognostici di tipo clinico sono state raccolte retrospettivamente, estraendole dalle cartelle cliniche dei bambini pretermine relative al periodo di ricovero nell'unità di terapia intensiva neonatale. È stato predisposto un questionario psicologico per l'acquisizione di informazioni sui fattori di tipo socio-ambientale e sullo stato emotivo materno relativamente ai vari momenti della vita familiare dalla nascita, al periodo di degenza in TIN e al momento del rientro e accoglienza nella famiglia. Il questionario consta di 86 voci, alcune delle quali suddivise in sotto-voci, organizzate nelle seguenti 5 sezioni: 1) Socio-demografia: composizione della famiglia ristretta e allargata, legami di parentela, nazionalità, bilinguismo, religione, caratteristiche del luogo di residenza e dell'abitazione nei due anni precedenti e seguenti la nascita del bambino; 2) Sviluppo: deambulazione, linguaggio, controllo sfinteri, ritmi sonno-veglia, alimentazione, crescita, raggiungimento dell'autonomia compatibile con l'età, inserimento e frequenza scolastica, socializzazione, gioco; 3) Attenzione: giudizio degli insegnanti e dei genitori, sport, valutazione soggettiva dell'intelligenza; 4) Anamnesi personale della madre: gravidanza, parto, complicanze materne e del bambino, permanenza nel TIN e in incubatrice, allattamento, depressione post-partum, sostegno psicologico e aiuto, assunzione di farmaci, ansie e preoccupazioni, qualità della comunicazione con il personale sanitario, inserimento del bambino nella vita familiare; 5) Anamnesi personale e patologica del bambino: ricoveri, interventi chirurgici, problemi neurologici, patologie psicosomatiche, necessità di fisioterapia e logopedia.

Il questionario è stato somministrato da una psicologa alle madri sia dei bambini pretermine sia dei bambini a termine. I bambini sono stati infine testati utilizzando il test di WPPSI per la valutazione del livello intellettuale. I dati emersi da una prima analisi dei risultati del questionario psicologico fanno ipotizzare **che la prematurità e/o VLBW rappresentino un significativo fattore di rischio** per l'instaurarsi di una non soddisfacente relazione madre-bambino, fin dai giorni in cui avvengono i primi contatti con il bambino reale in TIN. Ciò suggerisce la necessità, proprio in questo periodo della vita del neonato prematuro, di un lavoro con i genitori di prevenzione del rischio psicopatologico in età evolutiva. I risultati preliminari

della ricerca sono stati per ora presentati a congressi (Chiarotti et al., 2003; Castignani et al., 2004), mentre è in preparazione il manoscritto con i risultati finali dello studio.

CONCLUSIONI GENERALI

Studi di tipo preclinico a livello molecolare.

Questo studio contribuisce a chiarire alcuni aspetti molecolari della risposta cellulare successiva al danno ipossico-ischemico perinatale. I risultati ottenuti *in vivo* stabiliscono che la formazione di isoprostano sia dipendente dalla perossidazione lipidica che segue all'insulto ipossico, e che preceda la risposta infiammatoria che ha luogo in uno stadio successivo. Inoltre, viene stabilita una prima connessione tra stress ipossico e induzione dell'espressione delle **preseniline**, suggerendo un rapporto causa-effetto il cui significato fisiologico necessita, tuttavia, di un ulteriore approfondimento. Inoltre, sono state evidenziate proprietà neuroprotettive, svolte dall'NGF sullo sviluppo dei neuroni cerebrali e sulla morte neuronale postnatale ed adulta. **L'NGF** potrebbe potenzialmente essere preso in considerazione come molecola coinvolta nella riduzione del danno ipossico cerebrale (e/o di altre forme di insulti neuronali) che si osservano durante il periodo perinatale.

Studi di tipo preclinico a livello comportamentale.

I due modelli animali di asfissia perinatale, caratterizzati e validati nel corso del presente progetto, possono essere utilizzati quale riferimento sperimentale per quadri clinici di danno asfittico da lieve a moderato. **In assenza di marcati quadri lesivi, lo stress ossidativo che segue all'insulto sembra indurre alterazioni funzionali nella maturazione del sistema dopaminergico.** Questo profilo si accompagna ad alterazioni del comportamento a breve, medio e lungo termine, soprattutto nell'ambito delle risposte emozionali e di tipo ansioso.

Una ridotta funzionalità dopaminergica può spiegare il ridotto interesse sociale, la neofobia, e la suscettibilità verso l'espressione di stereotipie comportamentali. L'insieme di questi parametri risultavano normalizzati negli animali vissuti in condizioni di arricchimento ambientale durante la adolescenza. Pertanto, possiamo suggerire che **la stimolazione psicofisica durante la adolescenza possa produrre conseguenze benefiche** ai fini del recupero del danno neuro-comportamentale indotto da asfissia neonatale.

Entrambe i modelli si prestano pertanto allo studio della eziopatogenesi dei disturbi neuro-comportamentali dell'età evolutiva (come p.es. ADHD, schizofrenia), per i quali le complicazioni ostetriche rappresentano un fattore di rischio, sia per la verifica dell'efficacia di potenziali strategie di recupero e/o neuroprotettive (p.es. arricchimento ambientale, fattori neurotrofici). Sarà utile, in una seconda augurabile fase di questi studi, riutilizzare i modelli

così messi a punto per saggiare farmaci (o altri interventi di carattere riabilitativo) con connotati di innovatività e potenziale sviluppo economico.

Ricerca di marker precoci di sequele comportamentali sottili.

Poichè i neonati con asfissia perinatale sono a rischio di sviluppare sequele neurologiche, la precoce identificazione di questi neonati risulta di particolare importanza nell'ottica dei programmi di intervento e di supporto alle famiglie. I risultati complessivi hanno consentito di approfondire la conoscenza dei meccanismi biochimici alla base del danno neuronale ipossico-ischemico perinatale, suggerendo che **l'isoprostano 15-F_{2t}-IsoP possa rappresentare un indicatore precoce di danno neurologico di lieve entità**, e di sviluppare successivi strumenti analitici, necessari per la validazione di tale potenziale marker. Inoltre, questo progetto suggerisce che **i potenziali evocati possano svolgere un importante ruolo nella prognosi di sequele neuro-psichiche** nel neonato affetto da encefalopatia ipossico ischemica. Essi sembrano infatti aggiungere informazioni ulteriori rispetto a quelle che si ottengono con esami già entrati nella routine clinica. Infine, si è dimostrata l'applicabilità del **punteggio CRIB**, già utilizzato con successo in altri Paesi, e l'affidabilità di un **nuovo e originale punteggio di gravità, il PAS**, che ha il vantaggio di utilizzare variabili in minore numero e meno soggettive rispetto al CRIB.

Studio clinico con indagine psicometrica.

Sulla base dei risultati ottenuti, è possibile affermare che in caso di coinvolgimento dell'emisfero sinistro il deficit sembra riguardare principalmente l'area delle abilità linguistiche (comprensione e produzione verbale). Al contrario, quando insorgono in età precoci lesioni a carico dell'emisfero destro, le maggiori difficoltà sono rilevabili nella sfera delle abilità visuospaziali, ed in particolare difficoltà nella riorganizzazione globale degli stimoli.

Indagini di natura epidemiologica.

I risultati delle ricerche epidemiologiche indicano che in Italia è presente una eccessiva eterogeneità nell'assistenza e negli esiti a breve e lungo termine dei neonati molto pretermine); alcuni fattori di rischio (come la nascita in ospedali privi di un reparto TIN o la mancanza di una profilassi prenatale con gluco-cortico-steroidi) condizionano la prognosi immediata e a distanza indipendentemente dalla presenza o meno di ipossia perinatale. I dati suggeriscono inoltre che la prematurità grave, anche quando non è accompagnata da patologie neonatali importanti, rappresenta di per sé un significativo fattore di rischio sia per la presenza di problemi comportamentali e neuro-psicologici, rilevabili anche dopo i 4 anni di età, sia per l'instaurarsi di una non soddisfacente relazione madre-bambino, fin dai giorni immediatamente successivi al parto, in cui avvengono i primi contatti con il neonato. Infine, la ricerca ha permesso l'elaborazione e la validazione di utili strumenti per "standardizzare" la popolazione

dei nati pretermine per la presenza di variabili confondenti ed ottenere così gruppi omogenei per una valutazione affidabile degli eventuali effetti di un danno ipossico o di altra natura.

In ultima analisi, il presente progetto si è distinto per una forte componente multidisciplinare, in grado: a) di analizzare due diversi modelli animali di H/I sia dal punto di vista biomolecolare che comportamentale, e b) di produrre interessanti dati sia clinici che epidemiologici, ottenuti da pazienti ricoverati in varie strutture ospedaliere di Roma e provincia. Vanno infine sottolineate le strette interazioni scientifiche, createsi nell'ambito del presente progetto tra le varie UU.OO., che hanno permesso di valutare nei due modelli animali non solo il profilo di sviluppo neuro-comportamentale ma anche distinti parametri neurobiologici di potenziale utilità clinica. La presenza di gruppi di indagine sia clinica che epidemiologica, partecipanti al progetto, ha favorito lo stabilirsi di una rete interdisciplinare sulla tematica del danno asfittico perinatale. Tale rete potrà rappresentare un riferimento nazionale per ulteriori iniziative, sia di ricerca che di formazione, con la possibilità di fungere da supporto per eventuali interventi a carattere socio-sanitario.

Referenze bibliografiche citate

- Annett M (1973). Laterality of childhood hemiplegia and growth of speech and intelligence. *Cortex* 9: 4-33.
- Arena R & Gainotti G (1978). Construction apraxia and visuoperceptive disabilities in relation to laterality of cerebral lesions. *Cortex* 14: 463-73.
- Bjelke B, Andersson K, Ogren SO, Bolme P (1991). Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission. *Brain Res* 543: 1-9.
- Cioni G, Prechtl HF, Ferrari F, Paolicelli PB, Einspieler C, Roversi MF (1997). Which better predicts later outcome in full-term infants: quality of general movements or neurological examination? *Early Hum Dev* 50: 71-85.
- Dell'Anna ME, Luthman J, Lindquist E, Olson L (1993). Development of monoamine systems after neonatal anoxia. *Brain Res Bull* 32: 159-170.
- Inder T, Mocatta T, Darlow B, Spencer C, Volpe JJ, Winterbourn C (2002). Elevated free radical products in the cerebrospinal fluid of VLBW infants with cerebral white matter injury. *Pediatr Res* 52: 213-218.
- Kennard M (1936). Age and others factors in motor recovery from precentral lesions in monkeys. *Am J Physiol* 115: 138-146.
- Lennenberg EH (1967). *Biological foundations of language*. New York: Wiley.
- Lukiw WJ, Gordon WC, Rogaev EI, Thompson H, Bazan NG (2001). Presenilin-2 (PS2) expression up-regulation in a model of retinopathy of prematurity and pathoangiogenesis. *Neuroreport* 12: 53-57.
- Stiles-Davis J (1988). Spatial dysfunction in young children with right cerebral hemisphere injury. In: Stiles-Davis J, Kritchevsky M & Bellugi U (eds). *Spatial cognition: Brain bases and development*. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum, pp. 251-272.
- Williams PA, Dou P, Dudek FE (2004). Epilepsy and synaptic reorganization in perinatal rat model of hypoxia-ischemia. *Epilepsia* 45: 1210-18.
- Wolozin B, Alexander P, Palacino J (1998). Regulation of apoptosis by presenilin 1. *Neurobiol Aging* 19: S23-S27.

STUDI PUBBLICATI RELATIVI AL PROGETTO

Adriani W, Caprioli A, Granstrem O, Carli M, Laviola G (2003) The spontaneously-hypertensive-rat as an animal model of ADHD: Evidence for impulsive and non-impulsive subpopulations. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 639-651

Adriani W, Laviola G (2004) Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behavioural Pharmacology* 15: 341-352

Adriani W, Giannakopoulou D, Bokulic Z, Jernej B, Alleva E, Laviola G (2005). Response to novelty, social and self-control behaviors, in rats exposed to neonatal anoxia: Modulatory effects of an enriched environment. *Pediatr Res*, submitted.

Aloe L, Alleva E, Fiore M (2002). Stress and nerve growth factor: findings in animal models and humans. *Pharmacol Biochem Behav* 73: 159-166.

Antonelli A, Chiaretti A, Amendola T, Piastra M, Di Rocco C, Aloe L (2004). Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in human paediatric hemi-megalocephaly. *Neuropediatrics* 35: 39-44.

Bernardo A, Greco A, Levi G, Minghetti L (2003). Differential lipid peroxidation, Mn superoxide, and bcl-2 expression contribute to the maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 509-519.

Calamandrei G, Venerosi A, Valanzano A, De Berardinis MA, Greco A, Puopolo M, Minghetti L (2004). Increased Brain Levels of F₂-Isoprostane Are an Early Marker of Behavioral Sequels in a Rat Model of Global Perinatal Asphyxia. *Pediatr Res* 55: 85-92.

Casolini P, Zuena A, Cinque C, Matteucci M, Adriani W, Laviola G, Catalani A (2005). Neonatal anoxia: Effects on behavior and glutamate receptors in rats. *Manoscritto in preparazione*.

Castignani AM, Chiarotti F, Minniti De Simeonibus E, Silvestri C, Menniti-Ippolito F, Puopolo M, Di Paolo A (2004). Prematurità o basso peso alla nascita: implicazioni sulla genitorialità e sullo sviluppo dei bambini in età prescolare. Relazione presentata al Congresso di Matera, Aprile 2004.

Chiaretti A, Antonelli A, Piastra M, Genovese O, Polidori G, Aloe L (2004). Expression of neurotrophic factors in cerebrospinal fluid and plasma of children with viral and bacterial meningoencephalitis. *Acta Paediatr* 93: 1178-1184.

Chiaretti A, Piastra M, Caresta E, Nanni L, Aloe L (2002). Improving ischaemic skin revascularisation by nerve growth factor in a child with crush syndrome. *Arch Dis Child* 87: 446-448.

Chiaretti A, Piastra M, Polidori G, Di Rocco C, Caresta E, Antonelli A, Amendola T, Aloe L (2003). Correlation between neurotrophic factor expression and outcome of children with severe traumatic brain injury. *Intensive Care Med* 29: 1329-1338.

Chiarotti F, Castignani AM, Minniti De Simeonibus E, Silvestri C, Menniti-Ippolito F, Puopolo M, Di Paolo A (2003). Assessment of socioenvironmental factor effects of prematurity and/or very low birth weight on cognitive development in preschool children. *J Child Neurol* 18: 492.

Chiarotti F, Castignani AM, Puopolo M, Menniti-Ippolito F, Minniti De Simeonibus E, Di Paolo A (2001). Effetti dei fattori socio-ambientali sugli esiti neurocognitivi in età prescolare dei bambini con prematurità o basso peso alla nascita. *Ann Ist Sup Sanità* 37: 553-559.

Cirulli F, Bonsignore LT, Venerosi A, Valanzano A, Chiarotti F, Alleva E (2003). Long-term effects of acute perinatal asphyxia on rat maternal behavior. *Neurotoxicol Teratol* 25: 571-8.

Greco A, Minghetti L (2004). Isoprostanes as biomarkers and mediators of oxidative injury in infant and adult central system diseases. *Curr Neurovasc Res* 1: 341-354.

Greco A, Minghetti L, Levi G (2000). Isoprostanes, novel markers of oxidative injury, help understanding the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res* 25: 1357-1364.

Laviola G, Adriani W, Rea M, Aloe L, Alleva E (2004b). Social withdrawal, neophobia, and stereotyped behavior in developing rats exposed to neonatal asphyxia. *Psychopharmacology* 175: 196-205.

Laviola G, Rea M, Morley-Fletcher S, Di Carlo S, Bacosì A, De Simone R, Bertini M, Pacifici R (2004a). Beneficial effects of enriched environment on adolescent rats from stressed pregnancies. *Eur J Neurosci* 20: 1655-1664.

Laviola G, Macri S, Morley-Fletcher S, Adriani W (2003) Risk-taking behavior in adolescent mice: Psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 19-31

Morley-Fletcher S, Rea M, Adriani W, Laviola G (2001). L'influenza dei fattori socio-ambientali sui processi fisiologici di recupero del danno cerebrale: Il contributo dei modelli animali. *Ann Ist Sup Sanità* 37: 567-572.

Morley-Fletcher S, Rea M, Maccari S, Laviola G (2003). Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. *Eur J Neurosci* 18: 3367-3374.

Ricceri L, Minghetti L, Moles A, Popoli P, Confaloni A, De Simone R, Piscopo P, Scattoni ML, di Luca M, Calamandrei G (2004). Cognitive and neurological deficits induced by early and prolonged basal forebrain cholinergic hypofunction in rats. *Exp Neurol* 189: 162-172.

Rufini O, Valanzano A, Calamandrei G (2001). Modelli animali di encefalopatia ipossico-ischemica. *Ann Ist Sup Sanità* 37: 561-6.

Tirelli E, Laviola G, Adriani W (2003) Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 163-178

Venerosi A, Cutuli D, Calamandrei G. Altered emotional responses in neonate, adolescent and adult rats following C-section birth with or without acute global asphyxia. *Manoscritto in preparazione*.

Venerosi A, Valanzano A, Cirulli F, Alleva E, Calamandrei G (2004). Acute global anoxia during C-section birth affects dopamine-mediated behavioural responses and reactivity to stress. *Behav Brain Res* 154: 155-64.

FASCICOLI MONOGRAFICI E WORKSHOP ORGANIZZATI IN I.S.S.

Calamandrei G, Chiarotti F, Orzalesi M (2001) “Stato dell’arte e prospettive diagnostiche e terapeutiche nell’encefalopatia ipossico-ischemica del neonato”. *Ann Ist Sup Sanità* 37: 471-593.

Laviola G, Andersen SL (Eds) (2003) “Brain development, sex differences and stress: Implications for psychopathology”. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 1-2.

Organizzazione del Workshop su “Il danno ipossico-ischemico cerebrale nel neonato: aspetti sperimentali e clinici”, Istituto Superiore di Sanità, 20 settembre 2002.

LISTA DEGLI ARTICOLI PUBBLICATI DOPO IL PROGETTO

Bonsignore LT, Venerosi A, Chiarotti F, Alleva E, Cirulli F.

Acute perinatal asphyxia at birth has long-term effects on behavioural arousal and maternal behaviour in lactating rats.

Behav Brain Res. 2006 172(1):54-62.

Venerosi A, Cutuli D, Chiarotti F, Calamandrei G.

C-section birth per se or followed by acute global asphyxia altered emotional behaviour in neonate and adult rats.

Behav Brain Res. 2006 168(1):56-63.

Roma, il

Il Responsabile Scientifico

Dr. Enrico ALLEVA