



**Università
degli Studi
di Ferrara**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
"SCIENZE BIOMEDICHE E BIOTECNOLOGICHE"**

CICLO XXXIII

COORDINATORE PROF. PAOLO PINTON

**UTILIZZO DELLA MELATONINA COME
NEUROPROTETTORE NELL'ENCEFALOPATIA
IPOSSICO ISCHEMICA NEONATALE E
IDENTIFICAZIONE DI UN POSSIBILE
BIOMARKER.**

Settore Scientifico Disciplinare MED/04

Dottoranda

Dott. Tarocco Anna

Tutor

Prof. Pinton Paolo

Anni 2018/2020

INDICE

INTRODUZIONE.....	3
ASFISSIA PERINATALE ED ENCEFALOPATIA IPOSSICO ISCHEMICA	3
AUTOFAGIA e MITOFAGIA	16
RAZIONALE.....	18
STUDIO MELPRO.....	21
SCOPO DELLO STUDIO	21
MATERIALI E METODI	23
FASE CLINICA	23
FASE PRECLINICA.....	28
RISULTATI	31
STUDIO AGAIN.....	36
SCOPO DELLO STUDIO	37
MATERIALI E METODI	38
FASE CLINICA	38
FASE PRECLINICA.....	42
RISULTATI	43
DISCUSSIONE	50
CONCLUSIONI.....	59
ALLEGATI.....	60
BIBLIOGRAFIA.....	63

INTRODUZIONE

ASFISSIA PERINATALE ED ENCEFALOPATIA IPOSSICO ISCHEMICA

L'encefalopatia neonatale (EN) è un problema sanitario di rilevanza mondiale, responsabile del 25% circa delle morti neonatali e di un notevole carico di disabilità a lungo termine¹. È definita come una condizione che si verifica nei neonati di età gestazionale superiore a 35 settimane e si caratterizza per un alterato stato di coscienza che può, anche se non necessariamente, associarsi ad altre anomalie della funzionalità neurologica tra cui convulsioni, ipotonia, alterazione dei riflessi neonatali e compromissione cardiorespiratoria². L'evento ipossico può svilupparsi in modo acuto o cronico durante il periodo prenatale, per fattori materni come ipotensione o infezioni, durante il periodo perinatale, per anomalie del cordone ombelicale, rottura d'utero, fattori placentari, o nel periodo postnatale per shock, anemizzazione acuta, arresto cardiaco².

Nel 2014, sono state pubblicate dalla *"Task Force on Neonatal Encephalopathy"* nuove linee guida sui criteri per la definizione retrospettiva di un evento intrapartum sufficiente a causare paralisi cerebrale. Il titolo del lavoro è stato modificato da encefalopatia neonatale e paralisi cerebrale a encefalopatia neonatale ed esiti neurologici per sottolineare che sono molte le cause di encefalopatia neonatale che possono esitare in un outcome neurologico sfavorevole che ha come grado più severo la paralisi cerebrale³. Tra le cause di encefalopatia neonatale si ritrovano infatti le infezioni perinatali, le anomalie

della placenta, i disordini metabolici, le coagulopatie, gli eventi ischemico/emorragici e l'ipossi-ischemia causa della più nota encefalopatia ipossico ischemica (EII).

Quest'ultima interessa prevalentemente il neonato a termine e si stima che a livello globale abbia un'incidenza media di 1,5 ogni 1000 nati vivi, interessando 1,15 milioni di neonati all'anno nel mondo.⁴

Una percentuale tra il 20 e il 50% dei neonati asfittici che sviluppano una encefalopatia ipossico-ischemica moderato-severa muore nel periodo neonatale, dei sopravvissuti circa il 25% presenta handicap neurologici maggiori tra cui paralisi cerebrale, ritardo mentale, disturbi dell'apprendimento, epilessia⁴⁻⁷. Solo recentemente gli autori si stanno concentrando sugli esiti a lungo termine dell'EII lieve ed è emerso che questi neonati, attualmente non trattati con l'ipotermia terapeutica, hanno un rischio aumentato di avere disabilità sia a breve che a lungo termine⁸⁻¹¹

Al fine di garantire una migliore e ottimale assistenza ai neonati con encefalopatia ipossico ischemica la società scientifica si è concentrata nel comprendere meglio la fisiopatologia, il tempo della lesione e il timing del trattamento poiché questi giocano un ruolo importante nella risposta cellulare e nel processo di reazione a cascata del danno^{12,14}. Secondo Wang, sulla base di differenze significative nella fisiopatologia e biochimica dei tessuti cerebrali, è possibile suddividere l'HIE in tre fasi, tutte aventi come esito finale del danno cerebrale l'apoptosi o la necrosi delle cellule nervose.^{12,13}

- ***Fase acuta dell'ipossi-ischemia***

Durante il normale decorso del travaglio, gli eventi che fisiologicamente si verificano possono determinare nel neonato una scarsa riserva di ossigeno. Tra

questi per esempio giocano un ruolo importante la diminuzione del flusso sanguigno alla placenta a causa delle contrazioni uterine e della compressione cordonale, l'alcalosi materna per l'iperventilazione, la riduzione del trasporto di ossigeno al feto per riduzione del flusso ematico placentare e l'aumento del consumo di ossigeno sia nella madre che nel feto.

L'ipossi-ischemia che ne deriva determina una serie di anomalie fisiologiche e biochimiche che in condizioni fisiologiche possono essere sopportate dai meccanismi di compenso fetale, ma nel caso in cui l'evento sia eccessivamente grave o prolungato, possono determinare un danno cellulare.

In caso di asfissia breve ma grave (come per esempio nel distacco di placenta) la redistribuzione della gittata cardiaca per la protezione degli organi nobili (cuore cervello e surrene) non ha tempo di verificarsi e le strutture più profonde del cervello, nuclei della base e tronco dell'encefalo, vengono danneggiate. Nel caso invece di un'asfissia prolungata, si innesca il metabolismo anaerobio che esita, nelle forme più gravi, in una carenza energetica a livello cellulare e in una riduzione della concentrazione di glicogeno, fosfocreatina e ATP determinando una lesione diffusa sia alle strutture corticali che sottocorticali, con maggior danno alle popolazioni neuronali particolarmente suscettibili all'insulto ipossico ischemico.¹¹⁻¹⁴

La disfunzione cellulare si verifica a causa della diminuzione della fosforilazione ossidativa e della produzione di ATP. La mancanza di substrato energetico compromette la pompa ionica causando accumulo di Na⁺, Cl⁻, H₂O e Ca²⁺ intracellulari, K⁺ extracellulare e neurotrasmettitori eccitatori come il glutammato.

Alte e tossiche concentrazioni di Ca²⁺ citoplasmatico derivano sia dall'iperattivazione dei recettori del glutammato (NMDA) e di altri canali, sia dal rilascio dei depositi interni attraverso danno fisico ai mitocondri e al reticolo

endoplasmatico¹⁵. Questo innesca diverse cascate neurotossiche che, oltre a generare un gradiente osmotico che porta a edema e lisi delle cellule, produce alti livelli di ossido nitrico e specie reattive dell'ossigeno.

Ad alte concentrazioni, l'ossido nitrico danneggia i mitocondri tramite perossidazione e nitrosilazione dei lipidi di membrana; la disfunzione mitocondriale e la depolarizzazione della membrana che ne derivano, determinano un ulteriore rilascio di specie reattive dell'ossigeno, riduzione degli antiossidanti endogeni come il glutatione e incremento dell'infiammazione.

- *Fase latente*

Dopo la riperfusione determinata prevalentemente dalle cure perinatali e dalla rianimazione cardiopolmonare, l'edema citotossico indotto dall'ipossia e l'accumulo di aminoacidi eccitatori si risolvono parzialmente in 30–60 minuti, con apparente recupero del metabolismo ossidativo cerebrale.

La fase latente caratterizzata da una riduzione della cascata neurotossica e del metabolismo ossidativo viene seguita da una fase di relativa iperperfusione nella fase secondaria con aumento dell'ossigenazione tissutale.¹⁶ Questa fase, la cui durata è inversamente correlata alla gravità dell'insulto, rappresenta la "finestra terapeutica".¹⁷

La fase di mancanza di energia primaria (fase I) si verifica 0–6 ore dopo la lesione ipossico ischemica e, in base alla durata e alla gravità dell'insulto, determina la necrosi cellulare. Clinicamente, le strategie di trattamento durante la fase I utilizzano metodi convenzionali: i pazienti devono essere trattati con ipotermia, scavenger di radicali liberi (ad esempio melatonina, eritropoietina, coenzima Q10), agenti bloccanti dei recettori degli aminoacidi eccitatori e/o agenti neuroprotettivi.

- **Fase secondaria**

Sia gli studi preclinici che clinici di risonanza magnetica e spettroscopia hanno dimostrato che il deterioramento del metabolismo ossidativo cerebrale avviene a partire dalle 6 ore fino alle 24 dopo l'insulto ipossico; si tratta del fallimento energetico secondario¹⁸⁻¹⁹. Nonostante vengano garantiti una circolazione e un'ossigenazione adeguate, l'ATP e la fosfocreatina PCr (che lega l'ADP per formare ATP) risultano ridotti e il fosfato inorganico aumentato (Pi). Un ridotto rapporto PCr / Pi, un aumento dell'acido lattico cerebrale e un pH intracellulare alcalino nei primi giorni dopo la nascita sono stati associati a compromissione dello sviluppo neurologico e aumento della mortalità¹⁹⁻²².

La fase di fallimento energetico secondario (fase II) si verifica 6-72 ore dopo HI ed è caratterizzata dal deterioramento del metabolismo ossidativo. Nonostante un'adeguata ossigenazione e circolazione, i neurotrasmettitori eccitatori ed i radicali liberi continuano a essere rilasciati, le riserve di fosforo sono esaurite, sono coinvolti fattori infiammatori e inizia l'apoptosi delle cellule nervose. Questa fase è caratterizzata dall'insorgenza di convulsioni secondarie a edema eccitotossico, accumulo di citochine e disfunzione mitocondriale più grave¹².

Poiché i meccanismi di compenso associati al supporto trofico influenzano l'angiogenesi e la soprattutto la neurogenesi durante la fase di recupero dopo l'insulto ipossico, le strategie di trattamento durante la fase II seguono i trattamenti impiegati durante la fase I: i neonati devono essere trattati con agenti antinfiammatori, neuroprotettivi o neurorigenerativi ad esempio il fattore di crescita nervoso e trapianto di cellule staminali.

- **Fase terziaria**

La fase di riparazione delle lesioni e infiammazione cronica si verifica giorni, mesi e anni dopo l'insulto ipossico ischemico. In base alla gravità della malattia, alla durata dell'ipossi-ischemia e agli effetti di precedenti interventi terapeutici, i risultati sono generalmente due: il primo riguarda il recupero, in cui il tessuto cerebrale danneggiato entra nel processo di riparazione e i neuroni e le cellule gliali sopravvissuti iniziano a differenziarsi, proliferare e rigenerarsi; in caso contrario, il tessuto danneggiato continua a deteriorarsi e il meccanismo del danno persistente produce gliosi con la perdita del supporto di fattori neurotrofici, l'attivazione persistente dei recettori infiammatori e cambiamenti nella microglia e negli astrociti che continuano a rilasciare citochine dannose, promuovendo la morte neuronale e la lesione assonale. Anche in questo caso, il trattamento dovrebbe includere agenti antinfiammatori, agenti neuroprotettivi o agenti rigeneranti nervosi (ad esempio, fattore di crescita nervoso) e trapianto di cellule staminali. Una volta che le condizioni del paziente si sono stabilizzate, dovrebbe essere pianificato un programma di riabilitazione il più precoce possibile.^{12,23-25}

Diagnosi

L'elemento fondamentale nella diagnosi di asfissia è rappresentato dalla valutazione del rischio perinatale che include la conoscenza di problemi materni o fetali e i cambiamenti delle condizioni della placenta e del feto. Questo permette di riconoscere la presenza di sofferenza fetale e porre diagnosi differenziale con altre condizioni che possono manifestarsi con depressione alla nascita, come per esempio le sindromi genetiche. L'encefalopatia ipossico ischemica dovrebbe essere sospettata in tutti i neonati

con una storia di sofferenza fetale e/o neonatale, in presenza di aspirazione di meconio, ipertensione polmonare, traumi perinatali, emorragie materno-fetali, dove l'EI potrebbe essere misconosciuta a causa del grave quadro polmonare o anemico. Le condizioni essenziali per la diagnosi di sofferenza perinatale sono il **dato ostetrico di ipossia intrapartum**, i **sintomi neurologici** e le **anomalie dell'attività elettrica cerebrale**. L'asfissia inoltre determina alterazioni multiorgano coinvolgendo il rene, il cuore, il fegato, i polmoni, l'intestino, con conseguenti alterazioni metaboliche quali ipoglicemia, ipocalcemia, alterazioni idro-elettrolitiche, diatesi emorragica, iperammoniemia, che contribuiscono ad aggravare le condizioni di un sistema nervoso già compromesso.²⁶⁻³⁰

L'ipossia intrapartum, secondo le linee guida della Società Italiana di Neonatologia, viene definita con la presenza di un Punteggio di Apgar a 10 minuti di vita inferiore o uguale a 5, oppure la necessità di proseguire la rianimazione con ventilazione in maschera o con tubo endotracheale prolungata a 10 minuti di vita oppure la presenza di acidosi fetale o neonatale definita con $\text{PH} \leq 7.0$ oppure eccesso basi ≤ 12 mmol/l da qualsiasi emogasanalisi ottenuta nei primi 60 minuti dalla nascita³¹.

La presentazione clinica di un neonato che ha sofferto di ipossia-ischemia dipende dal timing, dalla severità e dalla durata dell'insulto e può variare dalla completa normalità fino alla presenza di segni e sintomi immediatamente dopo la nascita. L'esame obiettivo neurologico del neonato a termine asfittico è stata classificata da Sarnat e Sarnat in 3 stadi progressivi di gravità: asfissia lieve (iperallerta, tono, motilità e postura normali, tremori, riflesso di Moro esagerato, non disfunzione del sistema nervoso autonomo), moderata (letargia, motilità ridotta, flessione distale o completa estensione degli arti,

ipotonia, riflessi primitivi deboli/incompleti, miosi, bradicardia), grave (stupore o coma, postura decerebrata, motilità assente, flaccidità, riflessi assenti, pupille midriatiche, deviate o non reattive alla luce, apnea)⁹.

Per definizione i neonati con EII devono presentare un livello di coscienza alterato, sia nelle forme lievi che nelle gravi. L'EII lieve si manifesta con uno stato di apparente iperallerta o agitazione con patologica risposta agli stimoli. L'EII moderata e quella grave si caratterizzano invece per risposte maggiormente compromesse a stimoli dolorosi, luminosi e tattili. Può essere presente la disfunzione del tronco encefalico che si manifesta con riflessi pupillari e corneali patologici e anomalie drive respiratorio (apnee). In presenza di encefalopatia di maggior gravità si osserva una riduzione del tono e anomalie della postura con assenza del tono flessorio, riflessi primitivi neonatali ridotti o incompleti. In alcuni giorni o settimane l'ipotonia può evolvere verso la spasticità e l'iperriflessia; nel caso in cui un neonato si presenti ipertonico nel primo giorno di vita è probabile che il timing dell'insulto ipossico ischemico sia riferibile al periodo ante partum e possa avere già provocato una lesione cerebrale di natura ipossico ischemica. Infine le crisi convulsive si verificano in più del 50% dei neonati con EII moderata-severa e iniziano, nella maggior parte dei casi, nelle prime 24 ore con un esordio tanto più precoce quanto più è grave l'asfissia^{25,28,29}.

L'attività elettrica cerebrale è il terzo elemento per la diagnosi di encefalopatia ipossico ischemica ed è utilizzata per rilevare e monitorare l'attività convulsiva e per definire pattern di attività di fondo patologici. Nel grado 1 della classificazione di Sarnat e Sarnat l'EEG è normale sia nella veglia che nel sonno attivo e calmo, il ciclo del sonno è presente mentre la durata degli stati è alterata. Nel grado 2 il tracciato è di basso voltaggio, caratterizzato da ritmi con

frequenza variabile dalla banda delta alla beta, a volte è del tipo “basso voltaggio più grafoelementi patologici”, il ciclo del sonno è presente ma spesso alterato, frequenti le crisi elettrocliniche. Nel grado 3 il tracciato è prevalentemente inattivo o parossistico, il ciclo del sonno è assente e sono presenti crisi con dissociazione elettroclinica. Per quanto riguarda la prognosi questa è generalmente favorevole per il grado 1, gravissima per il grado 3 in cui le caratteristiche del tracciato riflettono una necrosi neuronale corticale diffusa, mentre per il grado 2 è favorevole se i segni clinici ed EEG tornano nella norma entro 5-7 giorni^{32,33}.

Quando non è facilmente disponibile l'elettroencefalogramma convenzionale con montaggio neonatale, è possibile utilizzare l'elettroencefalogramma ad ampiezza integrata che, attraverso il cerebral function monitor e con soli 2 canali, può valutare l'attività di fondo e rilevare la presenza di crisi convulsive. Nonostante questa tecnica possa rilevare solamente le alterazioni maggiori dell'attività elettrica cerebrale (tracciato inattivo, di basso voltaggio, burst suppression, discontinuo, crisi convulsive), offre il vantaggio di poter essere eseguita in continuo come monitoraggio e di rilevare quindi in tempo reale non solo eventuali cambiamenti dell'attività di fondo ma anche il controllo della terapia sulle crisi elettriche o in neonati curarizzati^{34,35}.

L'ecografia cerebrale può visualizzare l'edema cerebrale, le lesioni dei gangli della base, del talamo, i danni ischemici focali e multifocali, ma non è in grado di rilevare lesioni corticali o del tronco encefalo in quanto spesso molto piccole o comunque troppo periferiche.³⁶⁻³⁹ La risonanza magnetica è l'indagine sicuramente più accurata e più utile per stabilire l'entità e il timing del danno, soprattutto con le nuove applicazioni in spettroscopia e diffusione. Queste

nuove applicazioni infatti non solo consentono una maggiore sensibilità nell'individuazione delle lesioni, ma permettono di anticipare l'indagine alle prime ore di vita consentendo di formulare una prognosi tanto accurata quanto precoce^{38,40}. Le immagini pesate in diffusione possono mostrare anomalie entro poche ore da un insulto e può rappresentare un indicatore precoce di possibili lesioni cerebrali. La risonanza magnetica in spettroscopia d'altro lato è stata utilizzata per studiare i cambiamenti biochimici associati con il danno cerebrale. In particolare può rilevare metaboliti quali l'N-acetilaspargato (NAA) che rappresenta essenzialmente un marker neuronale; creatina (Cr) e fosfocreatina che sono marker energetici; Colina (Cho) che viene rilasciata a seguito di un danneggiamento delle membrane e lattato (Lac) che si accumula in risposta a metabolismo anaerobico. Inoltre sono stati dimostrati un aumento del lattato e una diminuzione del NAA nel talamo e un aumento del lattato e una riduzione della Cr nei gangli della base dei neonati asfittici. Alcuni autori hanno dimostrato che una diminuzione del rapporto NAA/Cho e NAA/Cr e un aumento del rapporto Cho/Cr si associa a gravi deficit dello sviluppo neuroevolutivo ad un anno di vita⁴⁰⁻⁴⁴.

Trattamento

Gli esiti dell'insulto cerebrale e della successiva riparazione sono il risultato di un equilibrio tra i meccanismi morte cellulare, di infiammazione persistente (danno neuronale) e di protezione endogena (risposta acuta, recupero, riparazione). La comprensione di questi meccanismi e la ricerca rivolta all'assistenza ottimale di questi pazienti, hanno aperto nuove opportunità terapeutiche da attuare nell'intervallo che segue la rianimazione del neonato asfittico prima che la fase secondaria del danno energetico metabolico sia

pienamente in atto, impedendo la morte delle cellule cerebrali e promuovendone la riparazione¹²

Poiché il neonato asfittico alla nascita presenta una risposta endogena di raffreddamento, l'ipotermia terapeutica, iniziata entro 6 ore dall'insulto e mantenuta per 72 ore, rappresenta il trattamento di scelta dell'encefalopatia ipossico ischemica.^{2,6,12,14,31}

- **Trattamento ipotermico**

L'ipotermia terapeutica sistemica a 33,5°C rettale o selettiva con cool cap, iniziata entro 6 ore dall'insulto e mantenuta per 72 ore, rappresenta il trattamento di scelta dell'encefalopatia ipossico ischemica³¹ poiché riduce l'edema vasogenico, il rilascio di neurotrasmettitori eccitatori e di radicali liberi dell'ossigeno, l'attivazione di citochine ed il metabolismo cerebrale⁴⁵⁻⁴⁶. Alcune metanalisi della letteratura⁴⁷⁻⁵⁰ hanno riportato una riduzione di mortalità nei trattati con ipotermia rispetto ai controlli (number needed to treat –NNT tra 11 e 17) e una riduzione di disabilità maggiori nei sopravvissuti a 18 mesi di vita (NNT tra 6 e 8). I criteri di inclusione al trattamento ipotermico (selettivo o sistemico) vengono applicati esclusivamente ai neonati di età gestazionale 35 settimane e peso neonatale superiore a 1800 gr che abbiano meno di 6 ore di vita. Comprendono il Criterio A di asfissia alla nascita (Indice di Apgar <5 a 10 minuti di vita o necessità di rianimazione cardiopolmonare a 10 minuti o rilevazione all'emogas analisi della nascita di eccesso basi > 12 mmol/L o pH <7); il Criterio B di evidenza di EII di grado moderato o severo secondo la valutazione di Sarnat e Sarnat e infine il criterio C di anomala attività elettrica cerebrale.

- ***Altre strategie neuroprotettive: la melatonina***

Studi dimostrano che i livelli di eritropoietina, cannabinoidi e melatonina endogeni aumentano dopo l'insulto ipossico ischemico a scopo neuroprotettivo.¹² Essendo una sostanza normalmente prodotta dall'organismo e quindi priva di effetti collaterali, nell'ultimo decennio, la melatonina ha iniziato ad essere considerata come un'opzione attraente al fine di minimizzare le sequele neurologiche causate dal danno ipossico-ischemico cerebrale.

Più comunemente conosciuta come l'ormone del sonno con funzione regolatoria del ciclo sonno-veglia, la melatonina possiede proprietà antiossidanti, anti-infiammatorie anti-apoptotiche.^{51,52} Attraversa facilmente la placenta e la barriera emato-encefalica raggiungendo compartimenti subcellulari con una bassa tossicità ed elevata efficacia.^{53,54} Avendo inoltre attività anti apoptotica la società scientifica si è focalizzata sui meccanismi molecolari coinvolti nel danno ipossico ischemico modulati dalla melatonina. Alcuni autori hanno identificato i mitocondri come i siti principali della sintesi della melatonina, questo risulta essere particolarmente interessante poiché tali organelli rappresentano la principale fonte di radicali liberi⁵⁵ e giocano funzioni chiave nelle risposte adattive e disadattive al danno cerebrale⁵⁶. I mitocondri sono fortemente coinvolti nei percorsi di morte cellulare, come l'apoptosi, la necrosi e l'autofagia⁵⁷ che caratterizzano il danno neuronale nell'evento ipossico ischemico perinatale.

I livelli endogeni di melatonina sono maggiori nel nato asfittico rispetto ai controlli sani e, se associata al trattamento ipotermico, si è dimostrata efficace nel potenziarne l'effetto neuroprotettivo; per questi motivi la società scientifica ha rivolto l'attenzione ai meccanismi alla base dell'attività della melatonina. Studi preclinici hanno concluso che nella morte cellulare il ruolo chiave viene

giocato dall'apertura del poro di transizione della permeabilità mitocondriale (mPTP). Questo evento provoca un aumento della permeabilità della membrana mitocondriale interna (IMM) a cui conseguono la depolarizzazione mitocondriale, il rigonfiamento mitocondriale e l'attivazione delle vie apoptotiche e necrotiche⁵⁸; per queste ragioni, l'mPTP è ampiamente considerato come l'evento conclusivo e decisivo per la morte cellulare⁵⁹. La melatonina sembra essere neuroprotettiva per la sua modulazione dell'attività del mPTP, inibendone l'apertura e quindi prevenendo il rigonfiamento del mitocondrio e la depolarizzazione della membrana⁶⁰.

Nel modello animale invece, la melatonina sembra inibire il danno cerebrale, agendo sulla maturazione degli oligodendrociti e quindi della sostanza bianca e promuovendo lo sviluppo neuronale gliale preservando l'integrità mitocondriale. Nel campo clinico neonatale infine, gli studi disponibili in letteratura riportano che l'utilizzo della melatonina apporta un miglioramento nell'outcome neurologico del neonato asfittico essendo anti apoptotica, anti ossidante e anti infiammatoria (con evidente riduzione dei prodotti della perossidazione lipidica sia a 12 che 24 ore dalla somministrazione⁶¹), preservando l'integrità mitocondriale e promuovendo lo sviluppo neuronale e gliale. Per la sua azione di scavenger dei radicali liberi dell'ossigeno, la melatonina sembra essere efficace nella prima fase dell'EII, quella del deficit primario di energia che conduce la cellula a morte per necrosi entro 6 ore dall'evento ipossico. Gli studi di Aly, Fulia e Ahmad sono solo alcuni esempi di come la melatonina, associata all'ipotermia, riduca lo stress ossidativo, la perossidazione lipidica e migliori sia la sopravvivenza che la prognosi⁶²⁻⁶⁹.

AUTOFAGIA e MITOFAGIA

Studi recenti dimostrano che in risposta allo stress, la cellula attiva un meccanismo di sopravvivenza chiamato autofagia con la quale vengono riarrangiate le membrane cellulari per permettere l'esposizione ai lisosomi delle componenti cellulari da degradare o riciclare (citoplasma e organelli) e per sostenere il fabbisogno energetico della cellula. L'autofagia svolge inoltre un ruolo chiave nell'infiammazione influenzando lo sviluppo, l'omeostasi e la sopravvivenza delle cellule infiammatorie e modulando la secrezione citochinica.

È un processo finemente regolato volto alla sopravvivenza della cellula, tuttavia, se attivato in misura eccessiva esita nella morte cellulare, come ad esempio nelle condizioni di danno dovuto ad ipossi ischemia, in cui i livelli di autofagia risultano aumentati. Ad oggi la letteratura riporta più di 40 proteine correlate all'autofagia (ATG)^{70,71} e tra queste, ATG5 svolge un ruolo fondamentale nella formazione delle vescicole e il suo esaurimento riduce significativamente l'attivazione dell'autofagia⁷²⁻⁷⁴

L'autofagia inoltre può essere selettiva di alcune componenti cellulari, e ad esempio, nel caso dei mitocondri, prende il nome di mitofagia. Quest'ultima è responsabile dell'eliminazione dei mitocondri danneggiati e non funzionanti che vengono contrassegnati da due proteine, Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase (Parkin) e PTEN-Induced Kinase 1 (PINK1)^{75,76} permettendone così la degradazione.

Studi recentemente pubblicati hanno dimostrato che ATG5 e Parkin possono essere utilizzati come biomarcatori poiché attraversano facilmente la barriera emato-encefalica e sono rilevabili nei fluidi corporei.^{77,78} Questo permette loro di essere un valido e attendibile strumento diagnostico sia per il monitoraggio

precoce dei pazienti con declino cognitivo sia per descrivere la fase di attività della sclerosi multipla.^{77,78}

RAZIONALE

Questo progetto di ricerca focalizza l'attenzione sulla neuroprotezione del nato a termine affetto da encefalopatia ipossico ischemica. È composto da due studi, entrambi approvati dal comitato etico Area Vasta Emilia Romagna e registrati su clinicaltrials.org

Considerato l'aumento della produzione endogena di melatonina dimostrata nel nato asfittico e le premesse riportate dalla letteratura scientifica sulla sua efficacia e sicurezza, con lo studio **MELPRO** si vogliono determinare sia gli effetti neuroprotettivi della melatonina associata al trattamento ipotermico, sia i suoi effetti sul processo di autofagia e mitofagia. Si tratta di un progetto tutt'ora in fase di reclutamento che prevede una fase di follow up neuroevolutivo di due anni per ogni paziente.

Il secondo progetto invece è rivolto ai neonati con ritardato adattamento alla nascita e/o con encefalopatia ipossico ischemica lieve. Questi pazienti non rientrano attualmente nei criteri di reclutamento per il trattamento ipotermico, ma rappresentano una grande sfida per il neonatologo poiché il 25% è a rischio di esiti neurologici maggiori a breve e lungo termine.

Poiché non è stato intrapreso alcun intervento specifico sull'EII di grado lieve e non vi sono quindi evidenze in letteratura per guidare l'eventuale trattamento in questo gruppo di bambini, con lo studio **AGAIN** si intendono identificare i cambiamenti metabolici cerebrali del nato con acidosi metabolica alla nascita. La maggiore conoscenza del metabolismo cerebrale e l'identificazione di un biomarker precoce, potrebbe portare a identificare nuove strategie

neuroprotettive e personalizzare le cure per questa popolazione di neonati, per la quale attualmente non è previsto trattamento.

STUDIO MELPRO

NCT03806816

STUDIO MELPRO

UTILIZZO DELLA MELATONINA PER LA NEUROPROTEZIONE NEL NATO A TERMINE AFFETTO DA ASFISSIA PERINATALE. STUDIO PROSPETTICO, RANDOMIZZATO, IN CIECO, MULTICENTRICO.

Considerato l'aumento della produzione endogena di melatonina dimostrata nel nato asfittico e le premesse riportate dalla letteratura scientifica sulla sua efficacia e sicurezza, con questo studio si vogliono determinare sia gli effetti neuroprotettivi della melatonina associata al trattamento ipotermico, sia i suoi effetti sul processo di autofagia e mitofagia nel neonato affetto da encefalopatia ipossico ischemica moderato severa.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Area Vasta Romagna, è registrato su clinicaltrials.org come NCT03806816 ed è sottoposto a copertura assicurativa.

SCOPO DELLO STUDIO

Obiettivo primario

L'obiettivo primario consiste nel determinare l'effetto neuroprotettivo della melatonina utilizzata nel neonato affetto da EII moderato-severa in aggiunta al trattamento ipotermico valutato nei confronti dell'outcome neuroevolutivo a 24 mesi di età mediante le scale Bayley III.

Obiettivi secondari

Gli obiettivi secondari consistono nella valutazione dell'impatto della melatonina su outcomes surrogati quali:

- Valutazione delle lesioni alla risonanza magnetica cerebrale, valutata mediante score di Rutherford e delle anomalie rilevate in spettroscopia.
- Tempo di normalizzazione dell'elettroencefalografia ad ampiezza integrata categorizzato in Normal, Moderately Abnormal e Severely Abnormal, secondo la classificazione di al Naqueeb.
- incidenza e durata di fenomeni convulsivi.
- eventuale diminuzione dell'utilizzo di sedativi e analgesici durante il trattamento ipotermico nel gruppo sottoposto a ipotermia PLUS melatonina
- valutazione delle concentrazioni plasmatiche di melatonina a intervalli prefissati nella prima settimana di vita.
- valutazione dei processi di autofagia e mitofagia mediante il dosaggio ematico di Atg5 e Parkin a intervalli prefissati nella prima settimana di vita.
- valutazione dei metaboliti urinari per l'identificazione del quadro metabolomico dei pazienti.

Risultati attesi

Si tratta di uno studio di superiorità: in accordo con la letteratura, con questo studio ci aspettiamo che il gruppo di pazienti sottoposto ad ipotermia PLUS melatonina abbia una ridotta incidenza di crisi convulsive ed una più rapida normalizzazione dell'attività elettrica cerebrale valutata con l'aEEG, una riduzione del danno della sostanza bianca alla risonanza magnetica e soprattutto un migliore outcome neurologico a 2 anni di vita valutato con le scale Bayley III.

Attraverso il dosaggio delle concentrazioni plasmatiche di melatonina, Atg5 e Parkin in neonati sottoposti a trattamento ipotermico, si vogliono comprendere i meccanismi di danno e protezione cellulare e l'azione neuroprotettiva della melatonina nell'asfissia perinatale.

MATERIALI E METODI

Tipo di studio:

Prospettico multicentrico randomizzato non farmacologico, doppio cieco con utilizzo di placebo con somministrazione di integratore alimentare a scopo neuroprotettivo. Lo studio è in cieco per i Neonatologi delle Terapie Intensive Neonatali (TIN) partecipanti allo studio e per gli operatori coinvolti nel follow up neuroevolutivo.

FASE CLINICA

Pazienti

Lo studio randomizzato coinvolge le seguenti TIN di III livello: S. Anna di Ferrara, Infermi di Rimini, Bufalini di Cesena, San Salvatore de L'Aquila, Ospedale di Bolzano, Policlinico Gemelli di Roma, Ospedale Pediatrico Bambin Gesù di Roma. Ogni centro partecipante è addestrato con una riunione dedicata per la presentazione del protocollo.

Previo ottenimento del consenso informato, sono arruolati nello studio in modo prospettico i neonati con asfissia alla nascita ed encefalopatia ipossico ischemica moderata-severa che soddisfino i criteri delle "Raccomandazioni nazionali per l'assistenza al neonato con encefalopatia ipossico ischemica candidato al trattamento ipotermico" redatte dalla Dr.ssa Gina Ancora, Dr.ssa

Giulia Pomeroy e dal Prof. Fabrizio Ferrari e pubblicate nel 2012 dal Gruppo di Studio di Neurologia Neonatale.

I neonati con EII candidati al trattamento ipotermico vengono randomizzati nei due bracci mediante un foglio di lavoro virtuale accessibile a ciascun centro partecipante al progetto. Pertanto, ad ogni paziente viene somministrata, in modo randomizzato, soluzione contenente placebo o melatonina. I contenitori, identificati da un codice alfabetico a conoscenza del solo produttore, sono stati forniti dalla ditta Steve Jones. Lo studio è coperto da assicurazione e prevede il reclutamento di 100 neonati, 50 per braccio.

Criteri di inclusione

Il trattamento ipotermico è rivolto ai neonati di età gestazionale > 35 settimane e/o peso >1800 g che soddisfino i seguenti criteri:

- Indice di Apgar <5 a 10 minuti di vita o necessità di rianimazione cardiopolmonare a 10 minuti o rilevazione all'emoanalisi della nascita di eccesso basi > 12 mmol/L o pH <7
- Evidenza di encefalopatia ipossico ischemica di grado moderato o severo secondo la valutazione di Sarnat&Sarnat
- Monitoraggio elettroencefalografico standard o ad ampiezza integrata anomalo.

Criteri di esclusione

Vengono esclusi dallo studio pazienti con asfissia associata ad errori congeniti del metabolismo accertati o sospetti, e pazienti i cui genitori non acconsentano alla partecipazione allo studio.

Somministrazione della melatonina e del placebo

Sono stati forniti dalla Ditta Steve Jones sia i campioni di placebo che di melatonina in flaconi identici, identificati da codice alfabetico a conoscenza del solo produttore. Il placebo è composto dalla stessa soluzione del campione contenente melatonina con la stessa concentrazione di eccipienti, ma privato di melatonina. Il placebo e il prodotto contenente melatonina vengono somministrati con gli stessi dosaggi, in particolare: la melatonina formulata in gocce orali pari a 0.25 mg/goccia/0.05 ml, è somministrata per os al dosaggio di 10 mg/kg pari a 40 gocce/kg cioè 2 ml/kg, per un totale di 5 giorni consecutivi. Il volume calcolato per os è somministrato attraverso sondino oro gastrico, una volta al giorno prima di eventuali pasti. Nel caso di vomito entro 30 minuti dalla somministrazione si somministra nuovamente il prodotto. Il prodotto utilizzato è il Buona Circadiem della ditta Steve Jones. Come riportato dalla letteratura, l'emivita della melatonina varia tra i 45 e i 60 minuti nell'adulto e oltre 15 ore nel paziente pretermine, per questi motivi è giustificata la singola somministrazione giornaliera nel neonato. La prima dose deve essere somministrata prima dell'inizio del trattamento ipotermico⁷⁸⁻⁸³.

Elettroencefalografia

Come da protocollo e da raccomandazioni SIN 2012 durante le 72 ore di trattamento ipotermico viene eseguito il monitoraggio della funzione cerebrale mediante Cerebral Function Monitor per registrare l'elettroencefalogramma ad ampiezza integrata (aEEG), con l'impiego degli elettrodi ad ago. La classificazione utilizzata è quella di Al Naqueeb³⁵ e i tracciati sono classificati in normal, moderately abnormal e severely abnormal annotando il tempo di normalizzazione del tracciato.

Risonanza magnetica cerebrale e spettroscopia

Come da protocollo e da raccomandazioni SIN 2012 la risonanza magnetica cerebrale e la spettroscopia verranno eseguite a circa 7 ± 3 giorni di vita. Le immagini acquisite nelle sequenze T1 e T2 pesate verranno analizzate utilizzando lo score di Barcovich per l'asfissia perinatale valutando sia la localizzazione sia la severità del danno cerebrale^{Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.}. Per ogni spettroscopia invece verranno misurati e analizzati i picchi di colina, creatina, N acetil aspartato e lattato. L'analisi delle risonanze verrà eseguita durante una riunione dedicata con la partecipazione dei neuroradiologi pediatrici dei centri coinvolti. È stata richiesta, per i casi dubbi, la collaborazione e la supervisione della Dr.ssa Miriam Martinez Biarge (Hammersmith, Londra).

Follow up

Essendo l'obiettivo primario dello studio la valutazione dello sviluppo cognitivo e motorio dei pazienti sottoposti a trattamento ipotermico con o senza l'aggiunta di melatonina, gli operatori (Neonatologo, Neuropsichiatra Infantile e Psicologo) coinvolti in queste valutazioni non saranno a conoscenza del braccio dello studio in cui il neonato è stato posto.

Per i pazienti con encefalopatia ipossico ischemica è previsto un programma di follow up neuroevolutivo fino ai due anni di età corretta. Il team dedicato al follow up neuroevolutivo valuterà lo sviluppo neurologico, motorio e cognitivo dei pazienti tramite la somministrazione delle scale di Bayley III a 12 e 24 mesi, in cieco rispetto al trattamento⁸⁴.

Raccolta dati

I dati sono raccolti in modo anonimo e centro è a conoscenza solo dei dati dei propri pazienti.

Il centro coordinatore raccoglie tutti i dati, registrati su un database excel, derivanti dai centri satellite e provvede alla loro elaborazione.

Il database prevede la raccolta dei seguenti items.

DATI ANAGRAFICI: codice numerico che conduce alla pseudonomizzazione data ora e luogo di nascita, sesso.

DATI OSTETRICI: precedenti concepimenti, procreazione medicalmente assistita, patologie gravidiche e farmaci, gemellarità, anemia fetale, sanguinamenti, corionamionite, rottura prematura delle membrane, febbre peripartum, alterazioni tracciato cardiocotografico, tipo di parto, liquidi amniotico, esame istologico della placenta, funicolo, eventi sentinella.

DATI NEONATALI: età gestazionale, parametri auxologici, indice di Apgar, rianimazione in sala parto, EGA entro la prima ora, temperatura all'ingresso in TIN, valutazione neurologica Sarnat entro 1° ora, valutazione alla 3° e alla 6° ora, tempo di normalizzazione dell'esame obiettivo secondo Sarnat, aEEG all'ingresso, tempo di normalizzazione, convulsioni e trattamento, analgesia, alterazioni renali e farmaci, cardiovascolari e della coagulazione e farmaci, ipertensione polmonare, ipoglicemia, patologia respiratoria, eventi avversi in ipotermia, somministrazione melatonina/placebo, eventi avversi.

OUTCOME NEUROLOGICO: RM encefalo entro 7 gg di vita, decesso durante il ricovero, follow up neurologico Bayley III a 12-24 mesi, epilessia post neonatale, deficit visivi, deficit uditivi. (allegato 1)

Metabolomica

La metabolomica è un approccio moderno basato sullo studio sistematico del set completo di metaboliti di un campione biologico, chiamato “metaboloma”. Il metaboloma dipende dallo stato di sviluppo, fisiologico o patologico della cellula, tessuto, organo e organismo. Studi recenti hanno valutato come variabili fisiologiche o condizioni patologiche possano condizionare profili metabolici di diversi liquidi biologici in popolazioni pediatriche. A tutt’oggi esistono scarse conoscenze sullo stato metabolico generale del neonato a termine e la gestione di neonati critici potrebbe essere personalizzata grazie alla conoscenza dei processi di sviluppo perinatale/neonatale e la loro relazione con lo stato metabolico basale.

Studi effettuati su modelli animali, hanno identificato un pattern metabolico caratteristico della patologia ipossico-ischemica perinatale ed è pertanto necessario confermare tali evidenze anche su popolazioni di neonati affetti da encefalopatia ipossico ischemica⁸⁵⁻⁸⁸. In concomitanza dei prelievi ematici, nel protocollo dello studio, è quindi prevista la raccolta di un campione di urina per l’analisi metabolomica da inviare all’Università di Cagliari (Prof. Fanos) con cui è nata una collaborazione per questo progetto.

FASE PRECLINICA

Valutazione laboratoristica

Al fine di confrontare i livelli di Atg5, Parkin e di melatonina nel paziente in ipotermia con melatonina o con placebo, vengono raccolti campioni ematici di 700 µL e urinari di 1,5mL con tempistica stabilita:

T0: alla nascita o comunque prima dell'inizio del trattamento

T1: 24 ore

T2: 48 ore

T3: 72 ore

T4: 5 giorni di vita

T5: 7 giorni di vita

- Dosaggio melatonina plasmatica

Il dosaggio della melatonina plasmatica viene eseguito nel laboratorio del Prof. Trapella Claudio, (Dipartimento di Chimica e scienze farmaceutiche C/O Cubo, Via fossato di Mortara FE).

L'analisi è effettuata tramite uno strumento UPLC-Massa Acquity-Xevo TQD (Waters) tramite la determinazione di una retta di taratura a 5 punti effettuata tramite rilevazione di due transizioni di massa sulla molecola di interesse (Analytica Chimica Acta, 2012).

Sono necessari 50 microlitri di plasma che vengono abbattuti con egual volume di acetonitrile, filtrati su filtri di cellulosa rigenerata a 0.22micron e caricati in UPLC tramite auto-campionatore.

I risultati delle analisi sono espressi in picogrammi/millilitro (pgr/mL) di melatonina per campione di sangue.

- Valutazione del processo di autofagia mediante il dosaggio del marker Atg5 e di mitofagia mediante il dosaggio di Parkin

La determinazione delle concentrazioni del marker autofagico ATG5 e mitofagico Parkin nel plasma dei pazienti viene effettuata tramite kit ELISA

(saggio immuno-assorbente legato ad un enzima) (MS720953) della ditta My Biosource (San Diego, California, USA) su campioni plasmatici di circa 150 microlitri

I risultati delle analisi sono espressi in nanogrammi/millilitro (ng/mL) di ATG5 e Parkin per campione di plasma.

Il campione plasmatico avanzato è stato conservato per eventuali altre analisi che si dovessero rendere necessarie nel corso dello studio.

- *Analisi Strumentale Metabolomica*

Agli stessi tempi stabiliti per le analisi su sangue, per ogni partecipante allo studio sono raccolti 1,5 ml di urina mediante catetere vescicale o sacchetto che vengono conservate in freezer a -80°C (Prof. Paolo Pinton, Dipartimento di Dipartimento di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale C/O Cubo, Via Fossato di Mortara FE) prima di essere trasferiti presso l'Università di Cagliari (Prof. Fanos). I campioni di urine, aliquotati in provette con sodiazide, verranno scongelati a 4°C prima di essere preparati per l'analisi in GC-MS, ed NMR secondo protocolli standard.

Analisi statistica

Calcolo del campione statistico: considerando che ciascun paziente reclutato raggiunge l'end point primario a 24 mesi lo score motorio medio (DS) ottenuto mediante scala Bayley a 24 mesi, in una popolazione di neonati con encefalopatia ipossico-ischemica moderato-severa trattata mediante ipotermia nel triennio 2015-2018, pari a 7.88 (2.8) e considerando un miglioramento dello score del 20% (valore score motorio medio atteso pari a 9.5), in un test a due code, con un errore alfa del 5% ed un errore beta del 20%, è necessario reclutare 47 neonati per braccio.

L'analisi statistica è stata eseguita con GraphPad Prism e per analizzare le differenze tra i gruppi sperimentali è stato utilizzato il test ANOVA.

Durata dello studio

Sono già stati reclutati 61 neonati provenienti dai diversi centri. Si prevede un'ulteriore durata della fase di reclutamento di circa 1 anno. Lo studio terminerà al completamento del follow up neuroevolutivo a 2 anni di vita di tutti i pazienti.

RISULTATI

Attualmente sono stati raccolti per l'analisi laboratoristica i campioni ematici di 71 neonati sottoposti a trattamento ipotermico, 61 dei quali sono stati reclutati nello studio. Dei rimanenti 10 i genitori hanno accettato di raccogliere i campioni ma hanno rifiutato la partecipazione al progetto.

Del totale, 13 neonati sono stati sottoposti a trattamento ipotermico a Ferrara, 17 all'ospedale Pediatrico Bambin Gesù di Roma (tutti outborn), 7 a Bolzano, 12 all'Ospedale Gemelli di Roma, 16 a Rimini, 1 al Bufalini di Cesena e 5 nella Terapia Intensiva Neonatale de L'Aquila. Lo studio è in cieco per i centri partecipanti allo studio e per gli operatori che eseguiranno il follow up neuroevolutivo.

L'analisi statistica è stata attualmente eseguita su 43 neonati, 19 appartenenti al Braccio A (melatonina) e 24 al B (placebo). Non per tutti i pazienti è stato possibile una completa raccolta dei dati poiché outborn e con informazioni non sempre note della gravidanza e del parto.

Nella tabella 1 vengono riportate le caratteristiche della popolazione.

Ad oggi non sono ancora disponibili i dati di EEG e risonanza magnetica poiché verranno organizzate delle riunioni congiunte per la lettura degli esami strumentali guidati da esperti del settore. Anche il follow up a 2 anni non è disponibile per la giovane età dei pazienti. Dalla tabella di popolazione si nota come l'incidenza di crisi sia diversa nei due gruppi, nonostante 5 neonati del gruppo A (melatonina) abbiano sviluppato una EII severa, solo 3 dell'intero gruppo ha avuto crisi convulsive, contro i 5 del gruppo B (placebo) con un solo neonato con EII di grado 3. Anche questo dato sarà da confermare con l'analisi statistica.

VARIABILI	FLACONE A N=19	FLACONE B N=24
Caratteristiche materne		
Iperensione arteriosa	1 (5.2%)	0 (0%)
Diabete mellito gestazionale	1 (5.2%)	3(12.5%)
Febbre	1(5.2%)	0 (0%)
Streptococco Agalactiae	2(10.5%)	0 o sconosciuto (0%)
Prom >18ore	5(26.3%), 1 senza profilassi antibiotica	3 (12.5%) 2 senza profilassi antibiotica
Alterazione cardiotocografiche <i>n</i> (%)	6(31.5%)	9 (37.5%)
Eventi sentinella <i>n</i> (%)	3 (15.7%)	8(33.3%)
Liquido tinto di meconio, <i>n</i> (%)	8 (42.1%)	7 (29.1%)
Parto vaginale <i>n</i> (%)	6 (31.5%)	9 (37.5%)
Parto vaginale operativo <i>n</i> (%)	0 o non noto	4 (16.6%)
Taglio Cesareo elettivo <i>n</i> (%)	3 (15.7%)	2 (8.3%)
Taglio cesareo emergente <i>n</i> (%)	8 (42.1%)	6 (25%)
Caratteristiche neonatali		
Età gestazionale (wks) (<i>media ± sd</i>)	39.4±2,0	38.4±2
Peso alla nascita gr. (<i>media ± sd</i>)	3172).9±446	3130.2±675
Maschi, <i>n</i> (%)	9 (47%)	16(66%)
Femmine, <i>n</i> (%)	10 (53%)	8 (33%)
Rianimazione alla nascita		
CPAP	3 (15%)	1(4.1%)
PPV	6(31%)	7 (29.1%)
Intubazione	3(15%)	3 (12.5%)
Massaggio cardiaco	1(5%)	3(12.5%)
Adrenalina	1(5%)	
Indice di Apgar ≤5 a 1' <i>n</i> (%)	16 (84%)	14 (58%)
Indice di Apgar ≤5 a 5' <i>n</i> (%)	4 (21%)	7 (29.1%)
Emoganalisi		
pH arterioso (<i>media ± sd</i>)	7.00±0.15	7.05±0.11
Eccesso basi (mmol/L <i>media ± sd</i>)	-17±4	-15.6±5.2
Lattati (mmol/L <i>media ± sd</i>)	12.6±5.9	11.9±4.1
pCO2 (mmHg)	66.6±34	56.6±34.2
Sarnat		
EII grado 0, <i>n</i>	0	1
EII grado 1, <i>n</i>	1	4
EII grado 2, <i>n</i>	10	16
EII grado 3, <i>n</i>	5	1
Crisi convulsive	3	5

Tabella 1: analisi della popolazione studiata

Nelle figure 1A e 1B viene rappresentato l'andamento di Atg5 e di Parkin nel tempo. Non sono dati al momento significativi dal punto di vista statistico, probabilmente per la scarsità del campione, ma si nota come Parkin abbia un andamento diverso nelle due popolazioni a partire dal 5° giorno fino al settimo, rimanendo a livelli maggiori nel gruppo ipotermia/melatonina rispetto al placebo.

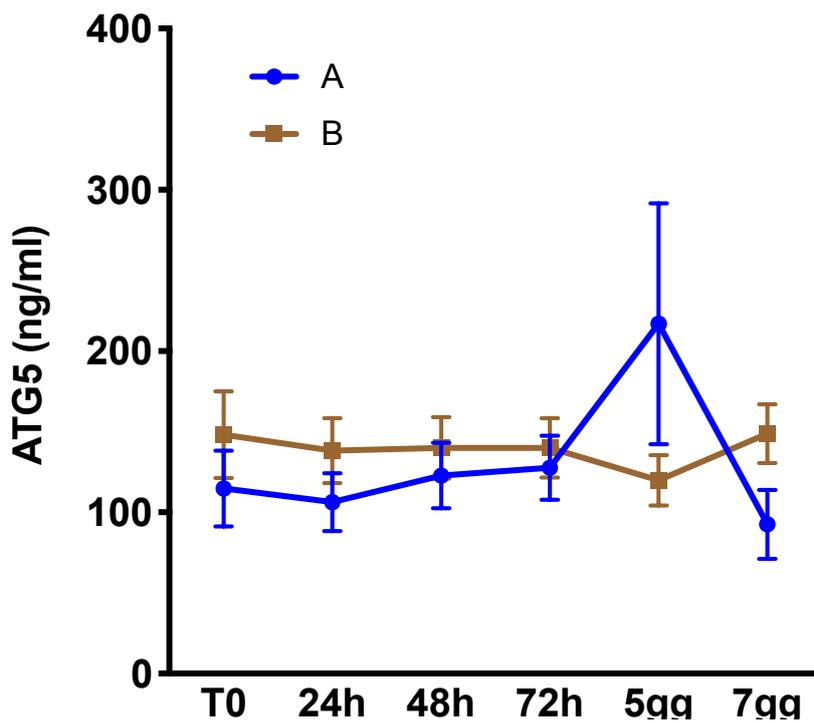


Figura 1A: andamento di ATG5 nel tempo per i due bracci di pazienti

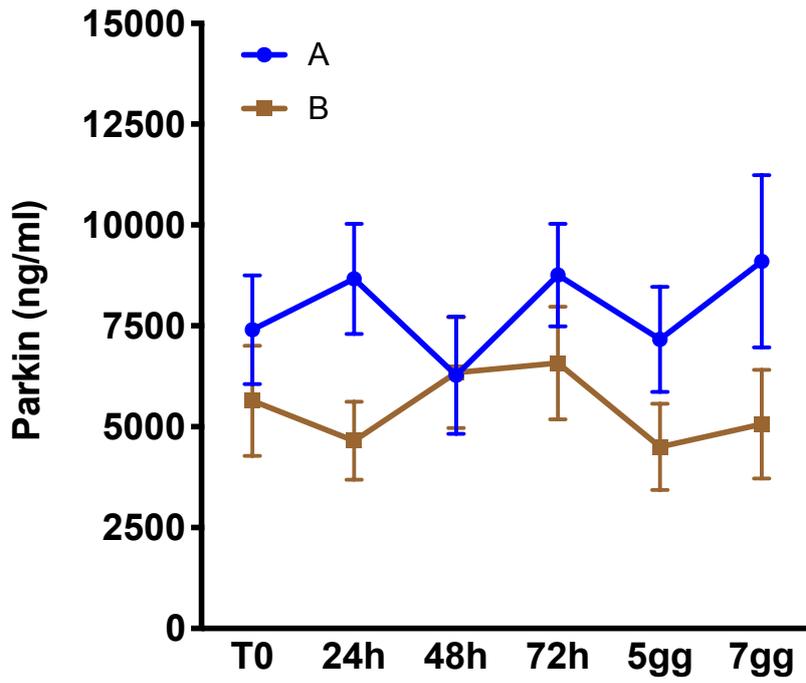


Figura 1B andamento di Parkin nel tempo per i due bracci di pazienti

STUDIO AGAIN

NCT03897101

STUDIO AGAIN

VALUTAZIONE DEI LIVELLI PLASMATICI DI MELATONINA E DEI PROCESSI DI AUTOFAGIA E MITOFAGIA NEL NATO A TERMINE CON ACIDOSI METABOLICA ALLA NASCITA. STUDIO PROSPETTICO MULTICENTRICO.

Grazie a numerosi trial clinici l'ipoteremia terapeutica è riconosciuta come il gold standard per la neuroprotezione del nato a termine con EII di grado moderato-severo. Tuttavia, più della metà dei neonati con ipossia alla nascita sviluppa un EII di grado lieve che non soddisfa i criteri attuali per il trattamento ipotermico. Questi neonati sono considerati a basso rischio di esito neurologico e quindi non sono coinvolti né in programmi terapeutici di neuroprotezione né in specifici programmi di follow-up. Studi recenti hanno tuttavia riportato un aumento del rischio di lesioni cerebrali in questa popolazione con un'alta incidenza di anomalie cerebrali alla risonanza magnetica e diverse possibili disabilità dello sviluppo neurologico, tra cui difficoltà di apprendimento, epilessia, difetti visivi e neurosensoriali. Una recente revisione della letteratura eseguita su un totale di 341 neonati con EII lieve ha riportato che circa il 25% di questi ha sviluppato esiti neurologici maggiori evidenziati nella prima infanzia⁸.

SCOPO DELLO STUDIO

Obiettivo primario:

L'obiettivo primario del presente studio consiste nel determinare i dosaggi plasmatici dei processi di autofagia e mitofagia mediante Atg5 e Parkin nei neonati con acidosi metabolica alla nascita e/o Encefalopatia ipossico

ischemica di grado lieve che NON vengono sottoposti a trattamento ipotermico. Si vogliono correlare i valori con la gravità dell'insulto ipossico ischemico confrontandoli con EII severe e volontari sani.

Obiettivi secondari:

Gli obiettivi secondari di questo studio consistono nello stratificare la popolazione in classi di rischio per poter personalizzare e migliorare le cure perinatali. Questo permetterebbe di aiutare il Neonatologo nell'identificazione di quadri lievi-moderati che potrebbero giovare di una valutazione, monitoraggio, ed eventualmente terapia più intensivi rispetto alla semplice osservazione impostando un eventuale follow up a distanza.

Inoltre, per comprendere i meccanismi adattivi all'insulto si vogliono confrontare le EII lievi sia con quelle severe sottoposte al trattamento ipotermico sia con i nati sani con regolare adattamento alla nascita. L'obiettivo è implementare la comprensione dei meccanismi di protezione dell'ipotermia terapeutica nei confronti del danno cellulare biochimico e molecolare.

MATERIALI E METODI

Tipo di studio:

Studio osservazionale, multicentrico, con valutazioni aggiuntive rispetto alla pratica clinica.

FASE CLINICA

Pazienti

Lo studio è stato svolto coinvolgendo le TIN dell'Ospedale S. Anna di Ferrara e dell'Ospedale Pediatrico Buzzi di Milano.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Area Vasta Romagna e il consenso alla partecipazione è stato ottenuto per ogni neonato. Il primo campione ematico raccolto in concomitanza all'esecuzione dell'emogasanalisi arteriosa da funicolo o da neonato (eseguita se maladattamento perinatale) non è stato conservato e analizzato nel caso in cui i genitori non abbiano acconsentito allo studio.

○ gruppo di pazienti con acidosi metabolica alla nascita

Sono stati arruolati nello studio in modo prospettico e consecutivo i neonati con acidosi metabolica alla nascita che NON sottoposti a trattamento ipotermico perché non soddisfavano il criterio B e/o C (quindi con esame obiettivo neurologico e/o attività elettroencefalografica normali) delle raccomandazioni nazionali redatte dalla Dr.ssa Gina Ancora, Dr.ssa Giulia Pomero e dal Prof. Fabrizio Ferrari e pubblicate nel 2012 dal Gruppo di Studio di Neurologia Neonatale.

È stato conservato e analizzato parte del campione ematico avanzato dall'analisi emogasanalitica effettuata in sala parto o raccolta da arteria ombelicale eseguita durante l'assistenza alla nascita dei neonati con adattamento cardiorespiratorio non fisiologico, con maladattamento perinatale e sospetta asfissia. In alcuni casi l'acidosi metabolica alla nascita è stato un riscontro casuale all'esame emogasanalitico eseguito dal personale ostetrico da arteria ombelicale.

Un secondo campione ematico, raccolto per valutare l'andamento dei processi metabolici cerebrali, è stato ottenuto da prelievo da tallone tra le 48 e le 72 ore di vita in concomitanza dell'esecuzione del test metabolico di Guthrie obbligatorio per legge.

I pazienti che hanno aderito allo studio sono tornati a 7 giorni di vita per una visita ambulatoriale in concomitanza della quale è stato raccolto un terzo campione ematico.

Criteri di inclusione

Sono stati reclutati i neonati di età gestazionale ≥ 35 settimane di età gestazionale e/o peso ≥ 1800 g con acidosi metabolica alla nascita, identificata da emogasanalisi arteriosa con eccesso basi ≥ 12 mmol/L o pH ≤ 7

I neonati reclutati devono avere evidenza di encefalopatia ipossico ischemica di grado LIEVE oppure esame obiettivo neurologico secondo Sarnat & Sarnat NORMALE e/o monitoraggio elettroencefalografico standard o ad ampiezza integrata NORMALE.

Criteri di esclusione

Sono stati esclusi dallo studio neonati pretermine con età gestazionale < 35 settimane e peso < 1800 g o i cui genitori non hanno dato il consenso alla partecipazione allo studio.

○ gruppo di controllo

Sono stati arruolati come controlli sani tutti quei neonati ≥ 35 settimane di età gestazionale e/o peso ≥ 1800 g con emogasanalisi funicolare normale o che abbiano necessitato di un'emogasanalisi alla nascita SENZA riscontro di acidosi metabolica, quindi con pH > 7 e eccesso basi < 12 mmol/L.

Un secondo campione ematico della stessa quantità è stato ottenuto da prelievo da tallone tra le 48 e le 72 ore di vita in concomitanza dell'esecuzione del test metabolico di Guthrie obbligatorio per legge. Anche per questi pazienti il foglio informativo è stato consegnato e spiegato ai genitori dopo l'esecuzione

della prima emogasanalisi e solo dopo accettazione è stato eseguito il secondo prelievo, in caso contrario il primo campione di sangue è stato gettato.

- Gruppo di neonati con encefalopatia ipossico ischemica moderato-severa sottoposta a trattamento ipotermico

Sono stati utilizzati i campioni ematici di neonati sottoposti a trattamento ipotermico i cui genitori abbiano acconsentito all'esecuzione della raccolta del campione ma non alla partecipazione allo studio MELPRO.

Raccolta dati

I dati sono stati raccolti in modo codificato e anonimo su file Excel. Ogni centro è a conoscenza solo dei dati dei propri pazienti e il centro coordinatore ha raccolto tutti i dati per provvedere alla loro elaborazione.

DATI ANAGRAFICI: codice numerico, data ora e luogo di nascita, sesso.

DATI OSTETRICI: precedenti concepimenti, procreazione medicalmente assistita, patologie gravidiche e farmaci, gemellarità, anemia fetale, sanguinamenti, corionamionite, rottura prematura delle membrane, febbre peripartum, alterazioni tracciato cardiocografico, tipo di parto, liquidi amniotico, esame istologico della placenta, funicolo, eventi sentinella

DATI NEONATALI: età gestazionale, parametri auxologici, indice di Apgar, rianimazione in sala parto, EGA entro la prima ora, valutazione neurologica Sarnat entro 1° ora, valutazione alla 3° e alla 6° ora, tempo di normalizzazione dell'esame obiettivo secondo Sarnat, aEEG/EEG, eventuale ricovero, eventuali altre patologie.

OUTCOME NEUROLOGICO: se eseguito follow up.

FASE PRECLINICA

Valutazione laboratoristica

Dai 3 campioni ematici di circa 700 µL eseguiti rispettivamente alla nascita, in seconda e in settima giornata di vita sono state condotte le seguenti analisi:

- Dosaggio melatonina plasmatica

Il dosaggio della melatonina plasmatica viene eseguito nel laboratorio del Prof. Trapella Claudio, (Dipartimento di Chimica e scienze farmaceutiche C/O Cubo, Via fossato di Mortara FE).

L'analisi è effettuata tramite uno strumento UPLC-Massa Acquity-Xevo TQD (Waters) tramite la determinazione di una retta di taratura a 5 punti effettuata tramite rilevazione di due transizioni di massa sulla molecola di interesse (Analytica Chimica Acta, 2012)

Sono utilizzati 50 microlitri di plasma che vengono abbattuti con egual volume di acetonitrile, filtrati su filtri di cellulosa rigenerata a 0.22micron e caricati in UPLC tramite auto-campionatore.

I risultati delle analisi sono espressi in picogrammi millilitro (pgr/mL) di melatonina per campione di sangue.

- Valutazione del processo di autofagia mediante il dosaggio del marker Atg5 e di mitofagia mediante il dosaggio di Parkin.

La determinazione delle concentrazioni del marker autofagico ATG5 e mitofagico Parkin nel plasma dei pazienti viene effettuata tramite kit ELISA (saggio immuno-assorbente legato ad un enzima) (MS720953) della ditta My

Biosource (San Diego, California, USA) su campioni plasmatici di circa 150 microlitri

I risultati delle analisi sono espressi in nanogrammi millilitro (ng/mL) di ATG5 e Parkin per campione di plasma.

Il campione plasmatico avanzato è stato conservato per eventuali altre analisi che si dovessero rendere necessarie nel corso dello studio.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita con GraphPad Prism e per analizzare le differenze tra i gruppi sperimentali è stato utilizzato il test ANOVA.

RISULTATI

Sono stati raccolti i campioni ematici di 223 neonati nati presso la Terapia Intensiva Neonatale di Ferrara e dell'Ospedale Pediatrico Buzzi di Milano. Di questi, 83 neonati avevano un'acidosi metabolica alla nascita, 103 erano controlli sani e 37 hanno sviluppato un'encefalopatia ipossico ischemica severa e sono stati trattati con l'ipotermia terapeutica.

I prelievi ematici sono stati raccolti per tutti alla nascita (T0) e in concomitanza del test metabolico di Guthrie tra le 48 e le 72 ore di vita (T1); solamente per le EII gravi e le acidosi metaboliche alla nascita è stato prelevato un terzo campione di sangue a T2, cioè in 7° giornata di vita.

Le caratteristiche cliniche dei pazienti sono rappresentate in Tabella 2

VARIABILI	EII severa	EII moderata	Sani
Caratteristiche materne	N=37	N=83	N=103
Iperensione gestazionale	2 (5.4%)	6 (7.23%)	4 (3.88%)
Diabete gestazionale	4 (10.8%)	17 (20.48%)	12 (11.65%)
Pre-eclampsia			
Febbre	3 (8.1%)	6 (7.23%)	2 (1.94%)
Streptococco Agalactiae	3 (8.1%)	16 (19.28%)	16 (15.53%)
Prom >18 ore	4 (10.8%)	9 (10.84%)	9 (8.74%)
Profilassi antibiotica intraparto	5 (13.5%)	15 (18.07%)	12 (11.65%)
	Incompleta	Incompleta	Incompleta
	0 (0%)	1 (1.2%)	4 (3.88%)
	Completa	Completa	Completa
Anomalie cardiocografiche <i>n (%)</i>	14 (37.8%)	23 (27.71%)	3 (2.91%)
Eventi sentinella <i>n (%)</i>	11 (29.3%)	25 (30.12%)	0 (%)
Liquido tinto di meconio, <i>n (%)</i>	11 (29.73%)	27 (32.53%)	25 (24.27%)
Parto spontaneo	13 (35.4%)	36 (43.37%)	40 (38.83%)
Parto spontaneo operativo	9 (24.3%)	11 (13.25%)	3 (2.91%)
Taglio Cesareo elettivo	1 (2.7%)	6 (7.23%)	20 (19.42%)
Taglio cesareo emergente, <i>n (%)</i>	10 (27%)	12 (14.46%)	12 (11.65%)
Caratteristiche neonatali			
Età gestazionale (<i>media ± sd</i>)	39.3±1.86	39.76±1.34	39.61±1.32
Peso gr. (<i>media ± sd</i>)	3244.2±616	3320.43±483.29	3367.23±427.39
Maschi, <i>n (%)</i>	19 (51.3%)	46(55.42%)	59 (57.28%)
Femmine, <i>n (%)</i>	13 (35.1%)	37 (44.58%)	44 (42.72%)
Rianimazione alla nascita, <i>n (%)</i>	25 (67.57%)	57 (68.67%)	8 (7.77%)
CPAP	3 (8.11%)	31 (37.35%)	4 (3.88%)
PPV	9 (24.32%)	25 (30.12%)	4 (3.88%)
Massaggio cardiaco	5 (13.51%)	1 (1.2%)	0
Indice di Apgar ≤5 a 1' <i>n (%)</i>	22 (59.46%)	34 (40.96%)	5 (4.85%)
Indice di Apgar ≤5 a 5' <i>n (%)</i>	13 (35.14%)	3 (3.61%)	0
Emogasanalisi			
pH arterioso (<i>media ± sd</i>)	7.05±0.14	7.16±0.14	7.27±0.08
Eccesso basi (<i>mmHg/L media ± sd</i>)	-16.42±5.34	-13.27±5.62	-7.02±3.62
Lattati (<i>mmol/L media± sd</i>)	11.94±4.21	8.96±3.46	5.42±2.9
pCO2 (<i>mmHg media± sd</i>)	56.4±32.7	45.0±14.5	42.8±12.3
pH Arteria ombelicale (<i>media ± sd</i>)	7.11±0.16	7.07±0.10	7.24±0.07
Eccesso basi arteria ombelicale (<i>mmHg/L media ± sd</i>)	-13.48±6.5	-13.63±6.02	-4.3±3
Lattati arteria ombelicale (<i>mmol/L media± sd</i>)		9.7±2.67	4.5±1.86
pCO2 arteria ombelicale (<i>mmHg media± sd</i>)		64.8±12.5	59.9±14.1
Sarnat			
HIE grade 0, <i>n</i>	0	35	99
HIE grade 1, <i>n</i>	4	48	4
HIE grade 2, <i>n</i>	24	0	0
HIE grade 3, <i>n</i>	4	0	0

Tabella 2: analisi della popolazione studiata

○ Correlazione con Parkin

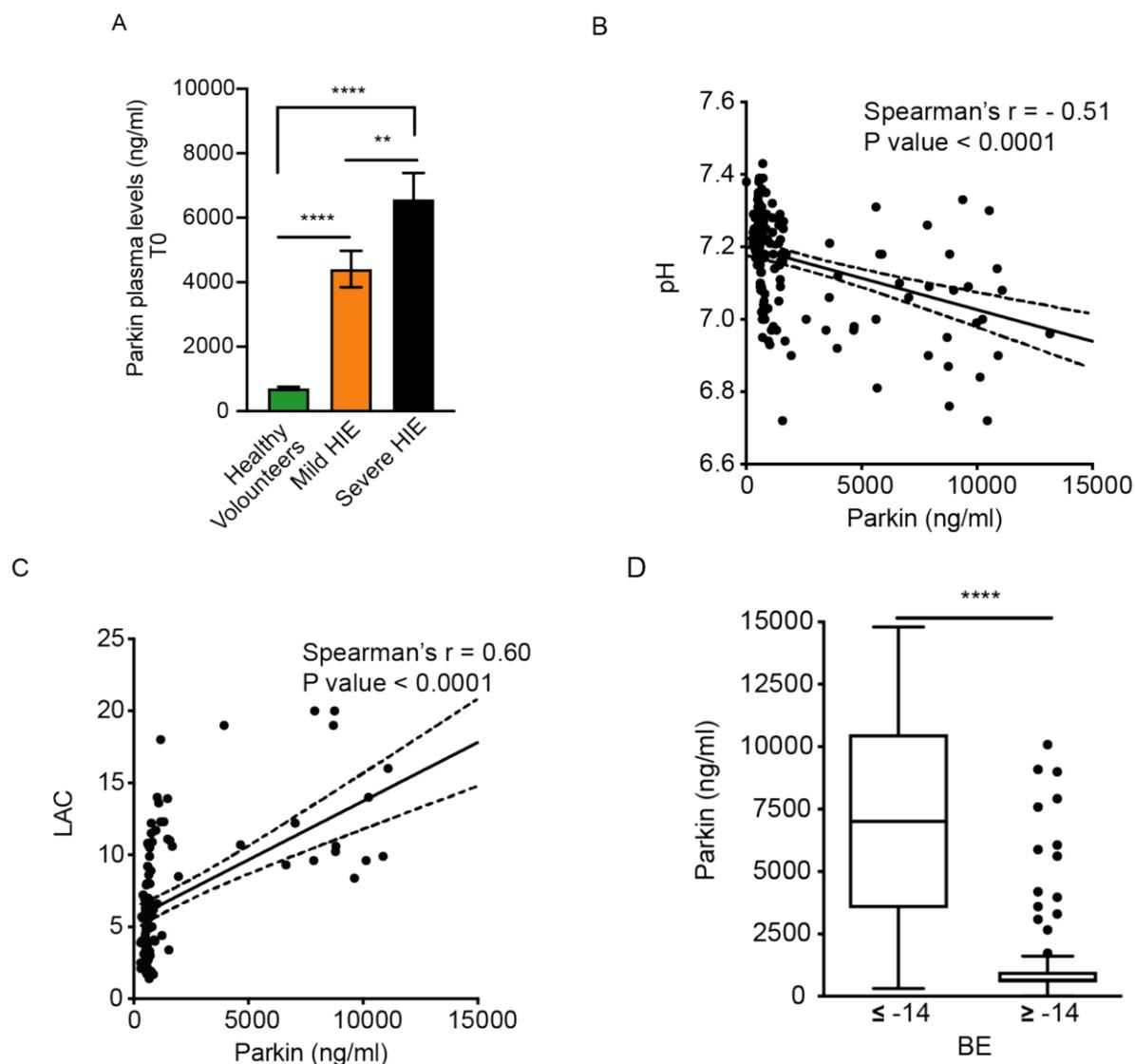


Figura2: correlazione di Parkin con le diverse classi di neonati.

La differenza di concentrazione plasmatica di Parkin è risultata statisticamente significativa tra le diverse classi di pazienti (p value= 0.008). Alla nascita (T0), è stato dosato un livello medio di biomarker mitofagico pari a 4517 ± 867.9 ng/ml nel gruppo con acidosi metabolica alla nascita, 10009 ± 1263 ng/ml nelle asfissie severe e 1022 ± 1051 pg/ml nei controlli sani (Figura 1a). I neonati con EII severa risultano avere un livello di Parkin significativamente maggiore rispetto ai

controlli sani (p value= 0.01) e al gruppo con acidosi metabolica (p value = 0.04).

Dal punto di vista clinico, al T0, la mitofagia risulta essere significativamente ed inversamente correlata con il pH arterioso (p value<0.0001) e con l'eccesso basi (Figure 1B-D) e direttamente proporzionale alla lattacidemia (p value<0.0001) (Figura 1C). Elevati livelli di Parkin plasmatico si vendono nello scenario clinico peggiore come dimostra la figura 3, in cui si evidenzia la correlazione con l'indice di Apgar a 5 minuti inferiore a 5 e la necessità di ventilazione a pressione positiva o manovre rianimatorie maggiori alla nascita.

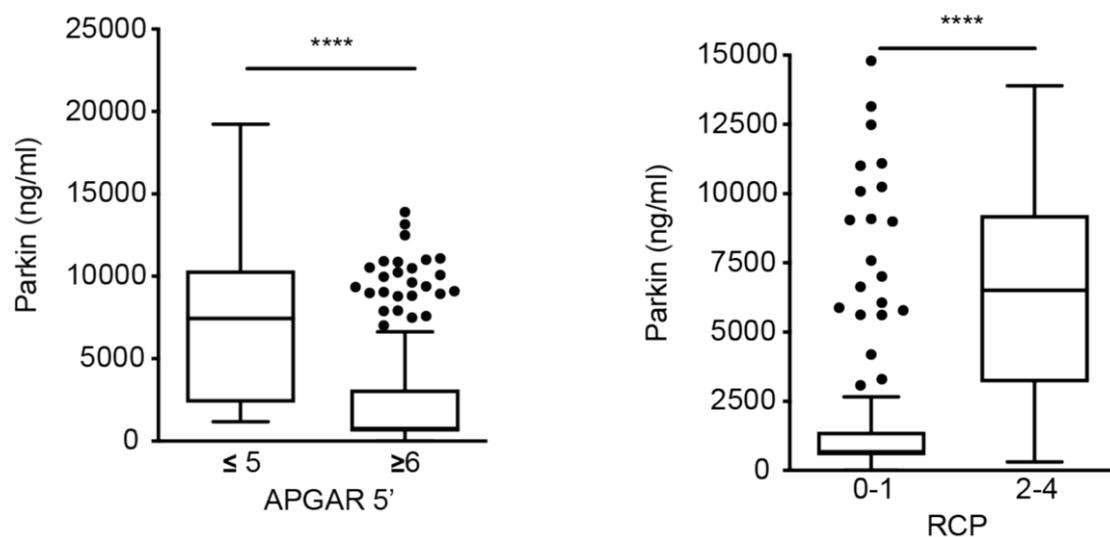


Figura 3: correlazione di Parkin con indice di Apgar e rianimazione cardio polmonare alla nascita (RCP): 0=non rianimazione 1=cpap; 2= ventilazione a pressione positiva, 3=intubazione, 4=massaggio cardiaco

- Correlazione con Atg5

La figura 4 riporta i risultati dell'analisi dei livelli di autofagia mediante il marker Atg5 che è risultato significativamente differente nelle tre classi di pazienti ($p < 0.0001$). Al tempo 0 sono stati rilevati i seguenti livelli di ATG5: 47.69 ± 3.17 ng/ml nei neonati sani, 60.44 ± 3.21 ng/ml nelle acidosi metaboliche alla nascita e 80.99 ± 9.84 ng/ml negli asfittici severi (Figura 2A); la differenza risulta essere significativa dal punto di vista statistico per le EII severe sia nei confronti delle EII lievi (P value < 0.05) sia dei nati sani (P value = 0.001). La stessa significatività non è stata riscontrata tra la classe mild confrontata con i nati sani.

Non è nemmeno risultata la significatività statistica con il grado di acidosi, quindi con il pH, i lattati e l'eccesso basi. Anche la correlazione con l'indice di Apgar a 5 minuti e la rianimazione cardio polmonare è risultata debole.

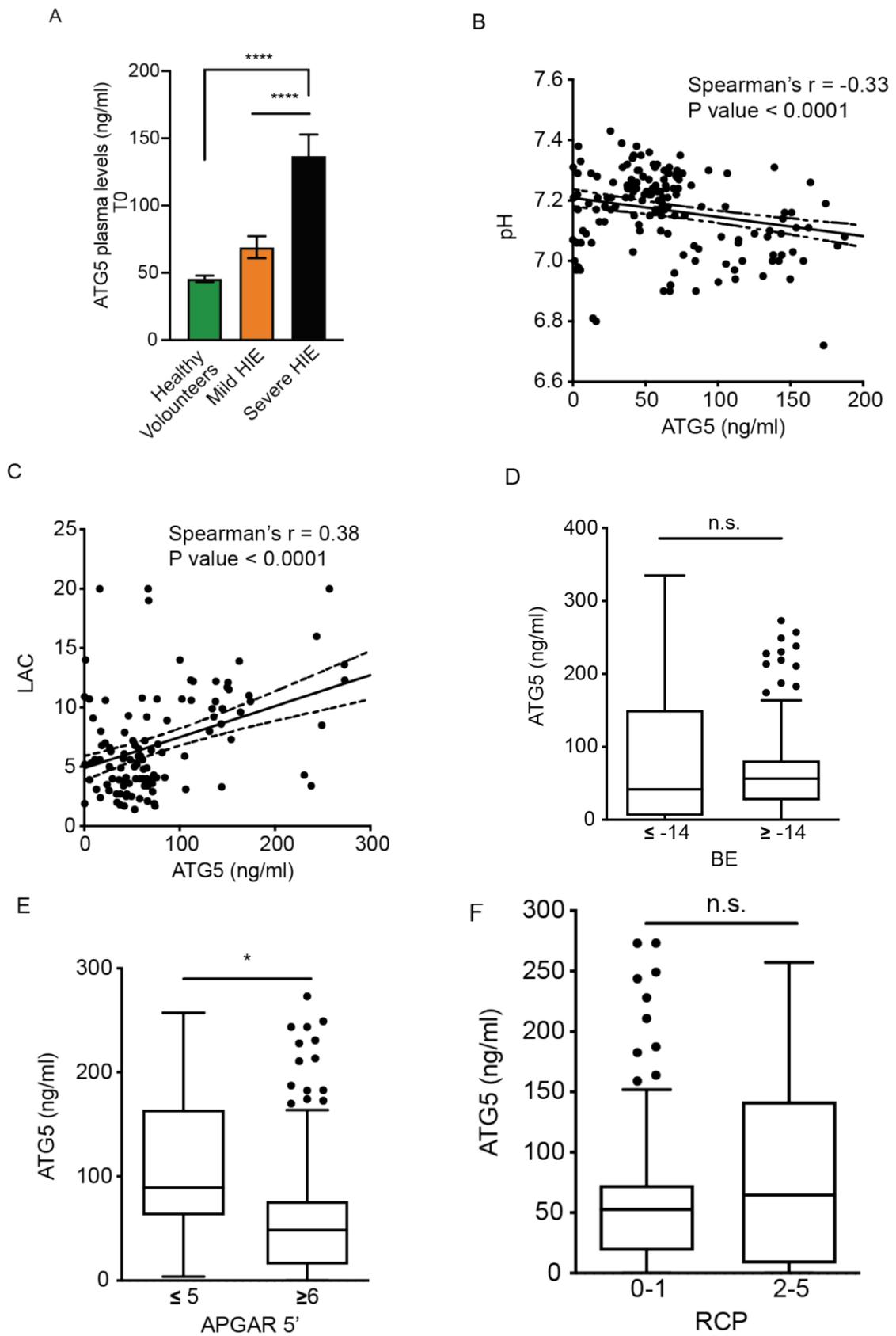


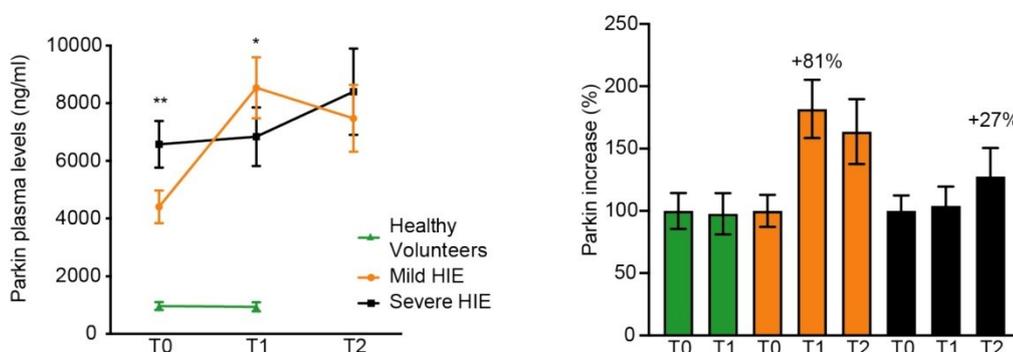
Figura 4: correlazione di Atg5 con le diverse classi di neonati.

○ Andamento di Parkin e Atg5 nel tempo

Le figure 5a e 5b rappresentano l'andamento di Parkin e Atg5 nel tempo. Per quanto riguarda la mitofagia, dall'analisi statistica è risultato un significativo e costante incremento di Parkin nel gruppo delle acidosi metaboliche alla nascita che raggiunge valori simili a quelli delle EII severe a 7 giorni (Figura 5A, p value <0.05). Anche l'autofagia aumenta nel tempo nello stesso gruppo raggiungendo a 7 giorni di vita gli stessi livelli di Atg5 delle encefalopatie severe.

Inoltre, nel gruppo non trattato con ipotermia terapeutica, l'aumento dei livelli di Parkin circolanti è dell'87%, mentre significativamente inferiore, del 27%, nel gruppo sottoposto a trattamento ipotermico. Anche per Atg5 nel gruppo "mild" si riscontra un incremento del 40% dei valori di autofagia al 7 giorno di vita, valore non confermato nei neonati in trattamento ipotermico.

A



B

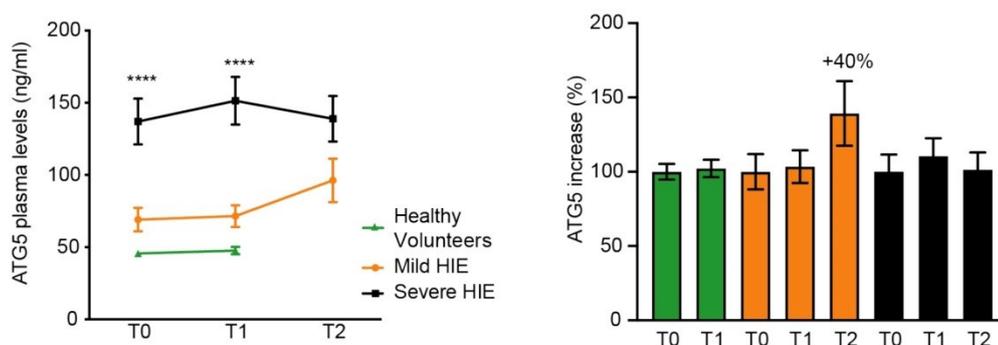


Figura 5: andamento di Parkin e Atg5 nel tempo

DISCUSSIONE

È universalmente accettato che l'ipotermia terapeutica, per la sua capacità di ridurre mortalità e morbilità, sia l'attuale standard di trattamento e cura per i neonati con encefalopatia ipossico ischemica di grado moderato-severo alla nascita. Non sono più attivi trials clinici che ne dimostrino l'efficacia e sono disponibili chiare linee guida che permettano di identificare i neonati candidati al trattamento ipotermico.⁸⁹ Tuttavia, ad oggi, non sono fruibili ulteriori strategie universalmente riconosciute che permettano di potenziare l'effetto neuroprotettivo dell'ipotermia. Nonostante i progressi della medicina nel campo neonatale, la valutazione del rischio di sviluppare lesioni cerebrali, soprattutto nell'EII lieve, può essere particolarmente complicata. La diagnosi e la prognosi dell'encefalopatia si basano su esami perinatali, manifestazioni cliniche, neuroimaging ed esami elettrofisiologici; questi strumenti possono tuttavia avere alcune limitazioni a causa della soggettività nell'interpretazione dei risultati e soprattutto della progressione naturale dell'ipossi-ischemia. Ne consegue che l'individuazione dell'evento ipossico, la classificazione dell'EII e la previsione del danno rappresentano una delle maggiori sfide per il Neonatologo.

Recentemente Chalak e coautori hanno dimostrato che una categorizzazione più oggettiva del punteggio di Sarnat potrebbe essere in grado di identificare meglio i neonati con alto rischio di disabilità causata dall'EII⁹⁰. Goswami in un recentissimo studio di coorte canadese, ha riportato che la percentuale di neonati con EII lieve sottoposti a ipotermia terapeutica è aumentata costantemente negli anni e che i pazienti con bassi punteggi di Apgar a 5 minuti

di vita o con necessità di rianimazione alla nascita hanno maggiori probabilità di essere sottoposti a trattamento ipotermico⁹¹.

Anche uno studio inglese oltre a confermare la stessa tendenza negli anni, ha concluso che il 19% delle TIN del Regno Unito considera la possibilità di iniziare l'ipotermia oltre le 6 ore di vita e che il 36% l'avrebbe interrotta prima delle 72 ore⁹².

Nonostante siano disponibili linee guida precise per identificare i neonati qualificati per il raffreddamento, la fisiopatologia complessa, il timing del danno incerto, i diversi gradi di severità e le manifestazioni cliniche più o meno sfumate possono rendere difficile la decisione di sottoporre il neonato a ipotermia per 72 ore. Sebbene la maggior parte dei protocolli adottati rigidi criteri per l'arruolamento al trattamento, una meta-analisi di 13 studi osservazionali, ha riportato che il 22% dei 2783 neonati sottoposti a ipotermia presentava una EII lieve⁹³ e quasi il 40% dei neonati arruolati nel registro del Vermont Oxford Network non presenta né encefalopatia moderato-severa né convulsioni prima dell'inizio del trattamento ipotermico⁹⁴.

Questi dati riflettono la difficoltà decisionale a cui si va incontro quando un neonato richiede assistenza alla nascita o non soddisfa completamente i criteri per l'arruolamento, portando in questo modo a una estrema variabilità nella pratica clinica. Anche per la prognosi il neonatologo ha a disposizione diversi strumenti che, tuttavia, a causa della soggettività dell'interpretazione e di esecuzione, possono avere dei limiti e sottostimare gli esiti a medio-lungo termine.

Nonostante l'ottimo valore prognostico della risonanza magnetica sugli esiti maggiori, alcuni studi, come quello di Rollins del 2014, dimostrano che un neuroimaging normale non equivale costantemente a un normale sviluppo neurocognitivo a 24 mesi di età⁹⁵.

Inoltre, non è ancora definito il timing ottimale per l'identificazione delle lesioni e la determinazione della prognosi⁹⁵⁻¹⁰⁰.

Sia l'elettroencefalografia convenzionale che quella ad ampiezza integrata sono predittive nei confronti dell'outcome con valore simile a quello della risonanza magnetica precoce. L'aEEG offre un metodo semplice e agevole per il monitoraggio continuo elettrofisiologico ed è in grado di rilevare i cambiamenti precoci associati al danno cerebrale, tuttavia come riporta Thoresen et al¹⁰², l'ipotermia può interferire con la registrazione della traccia riducendone la predittività¹⁰²⁻¹⁰³.

Mentre negli anni son stati prodotti molti lavori sull'esito neurologico delle asfissie moderato-severe, solo recentemente la società scientifica si sta concentrando sull'outcome delle EII lievi poiché, i dati disponibili, riportano che anche questa popolazione è a rischio di disabilità⁴⁻⁸. Diversi lavori, tra cui quello di Conway, hanno dimostrato che i neonati affetti da EII lieve hanno un rischio del 25% di esito neurologico maggiore tra cui morte, paralisi cerebrale infantile, ritardo dello sviluppo psicomotorio a 18 mesi di età⁸. Chalak nel report dello studio PRIME riporta che nella coorte di neonati con EII mild, selezionati con rigidi criteri, la disabilità a 18-22 mesi viene riscontrata nel 16% dei casi.⁹⁰ Un altro studio prospettico multicentrico di coorte (MARBLE), che ha reclutato neonati con EII lieve sottoposti a ipotermia, ha riportato che su 37 neonati, nonostante il trattamento, un bambino ha sviluppato paralisi cerebrale, e in 20 pazienti sono state riscontrate lesioni moderate della sostanza bianca cerebrale¹⁰¹. È di Goswami lo studio che conclude che nonostante un prolungamento del ricovero, la maggiore durata di supporto respiratorio, e l'alta intensività delle cure, sottoporre i neonati con EII lieve a ipotermia terapeutica, riduce la probabilità di lesioni cerebrali al neuroimaging.⁹¹

La società scientifica si sta quindi muovendo in una direzione: trovare la chiave terapeutica nei confronti della popolazione con EII mild e implementare la neuroprotezione nelle asfissie severe aggiungendo all'ipotermia molecole neuroprotettive come la melatonina⁸.

La letteratura riporta infatti che i livelli sierici di melatonina endogena aumentano dopo l'insulto ipossico ischemico come risposta neuroprotettiva alla lesione cerebrale¹². La melatonina sembra essere quindi un buon candidato per la neuroprotezione del neonato per il suo profilo di sicurezza, la sua efficacia nello scavenging dei radicali liberi, per l'inibizione della cascata eccitotossica e per la modulazione delle vie neuroinfiammatorie¹⁰⁵. Inoltre, in accordo con la letteratura, se la melatonina viene utilizzata in combinazione con l'ipotermia, gli effetti neuroprotettivi sono maggiori^{2,106-110}.

Nel 2015, Aly e colleghi hanno pubblicato uno studio randomizzato in cui, nonostante la piccola coorte di pazienti, il gruppo melatonina plus ipotermia, a 5 giorni di vita, ha sviluppato meno crisi epilettiche e meno anomalie della sostanza bianca alla risonanza magnetica¹¹². Gli autori concludono che rispetto ai neonati sani, il gruppo degli asfittici ha una concentrazione endogena di melatonina, superossido dismutasi (SOD) e ossido nitrico (NO) maggiori, e la combinazione di melatonina con ipotermia terapeutica migliora l'esito dello sviluppo neurologico a 6 mesi di età con effetti efficaci nel ridurre lo stress ossidativo in termini di NO e riduzione dei livelli sierici di SOD. Un altro esempio viene dagli studi di Fulia F. che dimostra che la melatonina esercita un'azione protettiva riducendo i livelli di malondialdeide e nitriti/nitrati nel sangue dei neonati, migliorandone così la sopravvivenza¹¹². Più recentemente, Ahmad et al. hanno pubblicato uno studio randomizzato controllato per paragonare l'ipotermia con l'ipotermia associata alla melatonina in 80 bambini con EII, ed è stato dimostrato che il gruppo con melatonina ha avuto un tasso di

sopravvivenza migliore¹¹⁴. Sulla base di clinicaltrials.gov sono al momento attivi due studi volti ad identificare la dose massima tollerata di melatonina enterale NCT02621944 e il suo effetto in associazione al raffreddamento sul danno cerebrale in seguito ad asfissia perinatale NCT0207116

Le limitazioni di questi trials sono tuttavia il piccolo numero di pazienti e la mancanza di identificazione del meccanismo cellulare di azione della melatonina.

Lo studio MELPRO prevede il reclutamento di un ampio campione e la ricerca del meccanismo di funzionamento, ancora sconosciuto, della melatonina sul mitocondrio e sulla cellula attraverso i biomarcatori Parkin e Atg5. Nonostante il piccolo numero di pazienti su cui attualmente è stata effettuata l'analisi, l'andamento di Parkin risulta essere differente tra il gruppo A (ipotermia con melatonina) e il gruppo B (ipotermia e placebo). Dai primi risultati sembra che la mitofagia sia il processo più coinvolto e, considerato il suo andamento nel tempo, si potrebbe ipotizzare che l'utilizzo della melatonina prolunghi il meccanismo di azione dell'ipotermia, mantenendo costante nel tempo il fenomeno di mitofagia. Questi dati sono ovviamente da confermare oltre che con il reclutamento di altri pazienti, con esperimenti sul modello animale, per il quale è stata recentemente ottenuta l'autorizzazione Ministeriale (Autorizzazione n° 728/2019-PR prot.CBCC2.22). Alcuni autori hanno identificato i mitocondri come i principali siti di produzione della melatonina⁵⁵, ed è verosimile anche che la melatonina moduli l'attività mitocondriale, essendo una molecola in grado di modulare l'apertura poro di transizione di permeabilità mitocondriale (mPTP)⁶⁰. I mitocondri sono organelli essenziali per la vita cellulare e sono altamente suscettibili agli insulti esterni come gli eventi ipossici, d'altro canto la mitofagia è uno dei meccanismi di controllo della qualità che una cellula utilizza per mantenere il benessere mitocondriale. Il

diverso andamento di Parkin della figura 1B tra i due bracci si può spiegare con l'azione inibente della melatonina sull'apertura di mPTP; questo fa sì che la cellula non muoia per apoptosi o necrosi (come invece succede nel braccio B), ma attivi il processo di mitofagia per ripulire la cellula dal mitocondrio danneggiato ripristinandone l'omeostasi (braccio A). Comprendere esattamente quali processi siano coinvolti, quali vie di segnalazione e quali proteine intervengano nel processo ipossico può aiutare a fornirci maggiori conoscenze e disegnare nuovi approcci terapeutici più efficaci per il trattamento dell'encefalopatia ipossica-ischemica di ogni grado. I promettenti risultati preliminari, ci hanno spinto ad approfondire la sperimentazione con l'utilizzo della melatonina come agente neuroprotettivo e inibitore del mPTP al fine di potenziarne l'uso terapeutico nel trattamento dell'encefalopatia neonatale. Per questi motivi, per questo studio, è stato scelto Parkin come biomarker per monitorare la mitofagia e il metabolismo mitocondriale.

L'utilizzo di un biomarker significativo al T0 potrebbe aiutare il neonatologo a discriminare quei casi limite, che pur non soddisfacendo appieno i criteri per il trattamento ipotermico potrebbero comunque giovarne.

Sulla base di queste premesse è stato disegnato lo studio AGAIN, completo per la fase di reclutamento e analisi dei primi dati, ma in attesa di sottoporre i neonati reclutati al follow up neuroevolutivo. Al momento, il dato significativo, oltre al grande campione di popolazione, è la variazione dei livelli di mitofagia alla nascita, significativa nelle tre classi di rischio. I controlli sani hanno livelli di Parkin significativamente inferiori ai nati con acidosi metabolica alla nascita e alle EII severe che a loro volta hanno livelli superiori alla classe intermedia. I dati ad oggi a nostra disposizione ci suggeriscono che alcuni neonati con acidosi metabolica alla nascita sviluppano, nel tempo, un comportamento mitocondriale simile ai neonati con encefalopatia severa. Parkin è infatti

significativamente maggiore in neonati con pH minore, maggiore lattacidemia e che alla nascita richiedono una rianimazione cardiopolmonare. Essendo un gruppo molto eterogeneo che comprende sia neonati con reperto casuale di equilibrio acido-base patologico sia neonati con EII lieve sia pazienti che hanno ricevuto un supporto respiratorio alla nascita serve un campione più ampio per stratificare questa popolazione in classi di rischio.

Lo studio AGAIN è comunque il primo in letteratura ad aver identificato un biomarker significativo al tempo 0. Negli ultimi anni sono stati studiati numerosi biomarcatori per la valutazione dell'encefalopatia neonatale. Poiché vengono rilasciati nel sangue e la loro espressione riflette uno specifico stato fisiologico o patologico di tessuti e organi, l'utilizzo dei biomarker per la valutazione del danno cerebrale e il monitoraggio degli effetti neuroprotettivi potrebbe essere utile per aiutare la diagnosi di EII neonatale, per guidare gli interventi e il trattamento al fine di migliorare la sopravvivenza e l'outcome neuroevolutivo. Negli ultimi decenni sono stati studiati numerosi possibili marcatori come l'S100B, l'adrenomedullina (AM), l'eritropoietina (EPO), l'attivina A, l'enolasi neurone-specifica (NSE), i marcatori dello stress ossidativo (OS), proteina acida fibrillare gliale (G-FAP) e creatina chinasi BB (CK-BB)¹¹⁵. Biomarkers di danno neurologico, stress ossidativo, infiammazione possono potenzialmente aiutare nella diagnosi precoce e nella categorizzazione dell'EII, tuttavia, la sensibilità e la specificità deve ancora essere convalidata in grandi coorti e non è ancora stato identificato un biomarker significativo sia alla nascita che nel tempo. Ad esempio, i livelli della proteina acida fibrillare gliale (GFAP) sono correlati con i danni rilevati alla risonanza magnetica, ma la loro variazione nel siero rispetto ai controlli non è statisticamente rilevante durante le prime sei ore di vita pertanto non può essere utilizzata per guidare le decisioni terapeutiche che devono essere prese in questa finestra

temporale^{103,116}. Altri marcatori come l'enolasi neurone specifica (NSE), la proteina basica della mielina (MBP), la proteina S100B e la proteina Tau aumentano in seguito a danni cerebrali, ma negli studi disponibili o non sono stati studiati a T0 oppure i loro livelli iniziano ad essere significativamente alti solo dopo alcune ore dalla nascita¹¹⁷. Anche l'acido lattico è stato valutato come possibile marker precoce, ma sono necessarie ulteriori indagini per convalidare la sua correlazione con il rischio di sviluppare encefalopatia. L'UCHL-1 (Ubiquitin C-Terminal Hydrolase-L1) è correlata alla severità dell'EII neonatale ma diminuisce rapidamente nel sangue e rende impraticabile la valutazione del danno nel tempo¹¹⁸.

Nello studio AGAIN la presenza del marcatore autofagico Atg5 e mitofagico Parkin è stata studiata nei diversi gradi di severità dell'EII, confrontata con i controlli sani ed ha dimostrato, oltre alla correlazione significativa con il grado di asfissia, un andamento nel tempo.

In particolare, i risultati indicano che, nonostante l'EII severa, l'incremento di Parkin nel tempo è del 27% per i trattati con ipotermia, contro l'81% del gruppo con acidosi metabolica alla nascita, come se il trattamento ipotermico attenuasse l'incremento del processo. Ad oggi non è del tutto chiarito se l'alto livello di mitofagia negli asfittici al T0 e il suo aumento nel tempo nella classe mild sia un meccanismo di protezione o rispecchi un avanzamento del danno cellulare. Per avere maggiori informazioni su questi risultati sarà necessaria un'attenta analisi dei dati ottenuti con il progetto sul modello murino di asfissia severa trattata e **non** trattata con ipotermia terapeutica. Lo studio permetterà di capire se il processo mitofagico viene mantenuto costante dall'ipotermia o se naturalmente aumenterebbe nel tempo come succede nel gruppo mild non sottoposto a trattamento (figura 5).

Stratificare la popolazione con acidosi metabolica alla nascita per classi di rischio e l'identificazione di un biomarker valido con un buon valore predittivo, permetterebbero di identificare i neonati più a rischio di outcome sfavorevole rendendo maggiore la personalizzazione delle cure. Identificare il preciso meccanismo di funzionamento della melatonina permetterebbe inoltre di avere un'opzione terapeutica per quei neonati che attualmente non rientrano nei criteri per il trattamento ipotermico, ma che, non avendo avuto un adattamento alla nascita fisiologico, potrebbero giovare dall'azione di un trattamento neuroprotettivo alternativo. Un biomarker valido inoltre potrebbe giocare un ruolo fondamentale nel monitoraggio del danno in tutti quei pazienti che, a causa delle gravi e instabili condizioni cliniche non possono essere sottoposti nei tempi corretti alla risonanza magnetica.

Al fine di ottenere tutti questi risultati sono necessari ulteriori trials clinici con ampio campione di popolazione.

CONCLUSIONI

AGAIN e MELPRO sono due studi differenti ma complementari che potrebbero aiutare il Neonatologo nell'identificazione dei neonati più a rischio di esiti neurologici a seguito di un evento ipossico ischemico neonatale. Capire l'azione della melatonina e i cambiamenti nel metabolismo cellulare in corso di asfissia potrebbero essere utili sia per adottare e implementare le strategie terapeutiche rivolte ai neonati che attualmente non sono candidati al trattamento ipotermico, sia per incrementare la neuroprotezione nei quadri di asfissie severe. L'utilizzo di un biomarker, in associazione al neuroimaging e alla neurofisiologia, potrebbe essere uno strumento valido di aiuto per la diagnosi di EII, per formulare una prognosi e per aiutare il neonatologo nelle scelte terapeutiche, di follow up e di riabilitazione.

I dati presentati, pur essendo ancora preliminari, sono estremamente promettenti; vanno tuttavia interpretati con cautela fino al completamento delle fasi di arruolamento e di follow up.

ALLEGATI

Scheda di raccolta dati appartenente alla TIN partecipante al progetto e non visibile agli altri centri

Numero paziente(centro VON/numero)	
DATI ANAGRAFICI	
Nome	Cognome
Data di nascita	Ora
Luogo	
Sesso	
DATI OSTETRICI	
Precedenti concepimenti:	nati vivi a termine: nati vivi pretermine: Aborti: IVG: Mef:
Procreazione medicalmente assistita	Tipo:
Patologie materne in gravidanza	Quali:
Farmaci in gravidanza	Quali:
Gemellarità	
Anemia fetale/isoimmunizzazione	
Sanguinamenti 2°/3° trimestre	
Corionamionite	Diagnosi clinica Diagnosi istologica
pProm	
Febbre peripartum	T° max
Alterazioni cardiocografiche	
Ridotti movimenti fetali	
Tipo di parto	Analgesia se PS Anestesia generale se TC
Liquido amniotico	Poli/oligoidramnios Chiaro/tinto
Esame istologico placenta	Distacco/ematoma Infarto Placenta previa/accreta
Funicolo	Inserzione anomala Arteria ombelicale unica Nodo vero Prolasso/procidenza
Evento sentinella	Distacco placentare Nodo vero funicolo Giri di funicolo al collo Rottura d'utero altro
DATI NEONATALI	
Età gestazionale	
Peso	percentile
Lunghezza	Percentile
Circonferenza cranica	percentile
Rianimazione in Sala Parto	CPAP PPV TET Massaggio Farmaci

Apgar al 1° min	Apgar al 5° min			
EGA arterioso da cordone < 60 min	pH	BE	pCO2	pO2
1° EGA arterioso neonato	pH	BE	pCO2	pO2 Lac
Temperatura all'ingresso				
EON < 60 min Secondo Sarnat & Sarnat	Livello coscienza Riflessi primitivi Tono assiale Motilità Postura Disfunzione autonimica pupillare			
Grado di encefalopatia				
EON alla 3° ora	Livello coscienza Riflessi primitivi Tono assiale Motilità Postura Disfunzione autonimica pupillare			
Grado di encefalopatia				
EON alla 6° ora	Livello coscienza Riflessi primitivi Tono assiale Motilità Postura Disfunzione autonimica pupillare			
Grado di encefalopatia				
Tempo di normalizzazione EON				
aEEG all'ingresso	Normale/anomali lievi Moderatamente anormale Severamente anormale Convulsioni			
Convulsioni	Elettriche Cliniche Elettro-cliniche Timing di esordio (h di vita)			
Terapia anticonvulsivante	1° farmaco Altri farmaci			
Tempo di normalizzazione aEEG				
Analgesia	Dose max			
Alterazioni renali	Trattamento			
Alterazioni coagulazione	Trattamento			
Alterazioni cardiovascolari	Trattamento			
Ipertensione polmonare	Trattamento			
Ipoglicemia				
Patologia respiratoria	Supporto ventilatorio			
Eventi avversi farmaci				
Eventi avversi ipotermia				
Dosaggio sierico Melatonina	Tempo 0 24 h 48h 72h 5gg 7gg			
Codice identificativo confezione melatonina				
DATI DI FOLLOW UP				
RM encefalo 7 giorni	Alterazioni sost. Grigia profonda Alterazioni PLIC Alterazioni sost. Bianca Alterazioni corteccia Alterazioni tronco			
Decesso durante il ricovero				
Bayley a 12 mesi	Cognitivo Linguaggio espressivo Linguaggio recettivo Motorio fine Motorio grossolano Socio emozionale			

	Adattivo
Bayley a 24 mesi	Cognitivo Linguaggio espressivo Linguaggio recettivo Motorio fine Motorio grossolano Socio emozionale Adattivo
Epilessia post neonatale	
Deficit Visivi	
Deficit uditivi	

BIBLIOGRAFIA

1. Gunn AJ, Thoresen M, Neonatal encephalopathy and hypoxic-ischemic encephalopathy. *Handb Clin Neurol*, 2019;162:217-237.
2. Martinello K, Hart AR et al. Management and investigation of neonatal encephalopathy: 2017 update. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2017, 102(4): F346-F358.
3. Executive summary: Neonatal encephalopathy and neurologic outcome, second edition. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Neonatal Encephalopathy. *Obstet Gynaecol* 2014;123:896–901.
4. Kurinczuk JJ, White-Koning M et al. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev* 2010; 86:329.
5. Robertson CM, Finer NN et al School performance of survivors of neonatal encephalopathy associated with birth asphyxia at term. *J Pediatr* 1989, 114: 753–760.
6. Gluckman PD, Wyatt JS et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* 2005, 365: 663–670.
7. Odd DE, Gunnell D et al. Long-term impact of poor birth condition on social and economic outcomes in early adulthood. *Pediatrics* 2011, 127: e1498–e1504.
8. Conway JM, Walsh BH et al Mild hypoxic ischaemic encephalopathy and long term neurodevelopmental outcome - A systematic review, *Early Hum Dev*.2018, 120: 80-87.
9. Sarnat HB, Sarnat MS, Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol*. 1976, 33: 696-705.

10. Chalak LF, Nguyen KA et al Prospective research in infants with mild encephalopathy identified in the first six hours of life: neurodevelopmental outcomes at 18-22 months, *Pediatr Res.*2018, 84: 861-868.
11. DuPont TL, Chalak LF et al, Short-term outcomes of newborns with perinatal acidemia who are not eligible for systemic hypothermia therapy, *J Pediatr.* 2013, 162:35-41.
12. Hassell KJ, Ezzati M et al New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2015, 100(6): F541-552.
13. Wang, Q, Lv, H et al. Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: emerging therapeutic strategies based on pathophysiologic phases of the injury. *J. Matern Fetal Neonatal Med.*2018, 1-8.
14. Yildiz EP, Ekici B et al. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an update on disease pathogenesis and treatment. *Expert Rev Neurother* 2017, 17(5): 449-459
15. Szydlowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium.* 2010;47:122–9
16. Jensen EC, Bennet L, et al. Post-hypoxic hypoperfusion is associated with suppression of cerebral metabolism and increased tissue oxygenation in near-term fetal sheep. *J Physiol* 2006;572(Pt 1):131–9.
17. Iwata O, Iwata S, Thornton JS, et al. “Therapeutic time window” duration decreases with increasing severity of cerebral hypoxia-ischaemia under normothermia and delayed hypothermia in newborn piglets. *Brain Res* 2007;1154:173–80.
18. Lorek A, Takei Y et al. Delayed (“secondary”) cerebral energy failure after acute hypoxia-ischemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res* 1994;36:699–706.

19. Azzopardi D, Wyatt JS, et al. Prognosis of newborn infants with hypoxic-ischemic brain injury assessed by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res* 1989;25:445–51.
20. Martin E, Buchli R, et al. Diagnostic and prognostic value of cerebral 31P magnetic resonance spectroscopy in neonates with perinatal asphyxia. *Pediatr Res* 1996;40:749–58.
21. Robertson NJ, Cox IJ, Cowan FM, et al. Cerebral intracellular lactic alkalosis persisting months after neonatal encephalopathy measured by magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res* 1999;46:287–96.
22. Robertson NJ, Cowan FM et al. Brain alkaline intracellular pH after neonatal encephalopathy. *Ann Neurol* 2002;52:732–42
23. Dixon, B. J., Reis, C., et al Neuroprotective Strategies after Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16: 22368-2240.
24. Perlman, J. M. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clin. Ther.* 2006,28: 1353-1365 (2006).
25. McAdams, R. M. & Juul, S. E. Neonatal Encephalopathy: Update on Therapeutic Hypothermia and Other Novel Therapeutics. *Clin. Perinatol.* 2016,43: 485-500.
26. Low JA. Determining the contribution of asphyxia to brain damage in the neonate. *J.Obstet Gynaecol Res.*2004 Aug;30(4):276-86.
27. Blair E et al. Epidemiology of cerebral palsy. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006. Apr; 11(2):117.
28. Perlman JM. Summary proceedings from the neurology group on hypoxic ischemic encephalopathy. *Pediatrics.*2006 Mar;117(3Pt2):S28-33.
29. Scher M. Perinatal asphyxia: timing and mechanisms of injury in neonatal encephalopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep.*2001 Mar;1(2):175-84.
30. McGuire W. Perinatal asphyxia. *BMJ Clin Evid.* 2007, 7:2007:0320

31. Ancora, Pomero, Ferrari. Raccomandazioni per l'assistenza al neonato con encefalopatia ipossico ischemica candidato al trattamento ipotermico. II edizione Ottobre 2012
32. Allemand F et al. Encefalopatia ipossico-ischemica neonatale di grado medio: follow-up a due anni. Riv Ital Ped 1983;9:227
33. Hathi M, Sherman DL, Quantitative EEG in babies at risk for hypoxic ischemic encephalopathy after perinatal asphyxia. J Perinatol. 2010 Feb;30(2):122-6
34. Hellström-Westas L. Amplitude-integrated electroencephalography for seizure detection in newborn infants. Semin Fetal Neonatal Med. 2018 Jun;23(3):175-182.
35. Al Naqeeb N; Edwards AD et al. Assessment of neonatal encephalopathy by amplitude-integrated electroencephalography. Pediatrics.1999 Jun;103(6 Pt 1):1263-71.
36. Groenendaal F, de Vries LS. Fifty years of brain imaging in neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia. Pediatr Res. 2017 Jan;81(1-2):150-155
37. Salas J, Tekes A et al. Head Ultrasound in Neonatal Hypoxic-Ischemic Injury and Its Mimickers for Clinicians: A Review of the Patterns of Injury and the Evolution of Findings Over Time. Neonatology. 2018;114(3):185-197.
38. Shen W, Pan JH et al Comparison of transcranial ultrasound and cranial MRI in evaluations of braininjuries from neonatal asphyxia.Int J Clin Exp Med. 2015;15;8(10):18319-26
39. Swarte R, Lequin M et al. Imaging patterns of brain injury in term-birth asphyxia. Acta Paediatr. 2009;98(3):586-92.
40. Weeke LC, Groenendaal Fet al. A Novel Magnetic Resonance Imaging Score Predicts Neurodevelopmental Outcome After Perinatal Asphyxia and Therapeutic Hypothermia. J Pediatr. 2018;192:33-40.e2.

41. Rutherford M, Pennock J et al. Hypoxic-ischemic encephalopathy: early and late magnetic resonance imaging findings in relation to outcome. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1996;75:F145–F151
42. Martinez-Biarge M, Diez-Sebastian J, et al. Predicting motor outcome and death in term hypoxic-ischemic encephalopathy. *Neurology*. 2011 Jun 14;76(24):2055-61.
43. Huppi PS, Lazeyras F. Proton Magnetic Resonance Spectroscopy (1H-MRS) in neonatal brain injury. *Pediatr Res* 2001;49:317-20.
44. Alderliesten T, de Vries LS. et al MRI and spectroscopy in (near) term neonates with perinatal asphyxia and therapeutic hypothermia..*Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2017;102(2):F147-F152
45. Jacobs SE, Morley CJ, et al. Term and nearterm newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy: a randomized controlled trial. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2011;165(8):692-700.
46. Simbruner G, Mittal RA, et al. Systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: outcomes of the nEUROnetwork RCT. *Pediatrics*. 2010 Oct;126(4):e7718
47. Jacobs S, Hunt R, et al. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Oct 17;(4):CD003311. Review
48. Jacobs SE, Tarnow Mordt WO. Therapeutic hypothermia for newborn infants with hypoxic ischaemic encephalopathy. *J Paediatr Child Health*. 2010 Oct;46(10):568-76.
49. Shah PS. Hypothermia: a systematic review and metaanalysis of clinical trials. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2010 Oct;15(5):238-46. Review
50. Edwards AD, Brocklehurst P, et al. Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and metaanalysis of trial data. *BMJ*. 2010 Feb 9;340:c363

51. Mauriz JL, Collado PS A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res*, 2013 Jan;54(1):1-14.
52. Tan DX, Manchester LC. Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. *Molecules*. 2015, 16;20(10):18886-906.
53. Cheung RTF, Tipoe GL. Preclinical evaluation of pharmacokinetics and safety of melatonin in propylene glycol for intravenous administration. *J Pineal Res*. 2006;41(4):337-43.
54. Motta-Teixeira LC, Machado-Nils AV. The absence of maternal pineal melatonin rhythm during pregnancy and lactation impairs offspring physical growth, neurodevelopment, and behavior. *Horm Behav*. 2018;105:146-156.
55. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J*. 2006, 273(13):2813-38.
56. Raefsky SM, Mattson MP. Adaptive responses of neuronal mitochondria to bioenergetic challenges: Roles in neuroplasticity and disease resistance *Free Radic Biol Med*. 2017;102:203-216.
57. Galluzzi L, Vitale I. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018;25(3):486-541.
58. Morciano G, Bonora M. Mechanistic Role of mPTP in Ischemia-Reperfusion Injury. *Adv Exp Med Biol*. 2017;982:169-189.
59. Morciano G, Giorgi C. Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;78:142-53
60. Waseem M, Tabassum H. Melatonin modulates permeability transition pore and 5-hydroxydecanoate induced K ATP channel inhibition in isolated brain mitochondria. *Mitochondrion* 2016;31:1-8.

61. Fulia, F. et al. Increased levels of malondialdehyde and nitrite/nitrate in the blood of asphyxiated newborns: reduction by melatonin. *J. Pineal Res.* 2001,31: 343-349.
62. Aly et al. Melatonin use for neuroprotection in perinatal asphyxia: a randomized controlled pilot study. *J Perinatol.* 2015;35(3):186-91.
63. Merchant et al. Pharmacokinetics of melatonin in preterm infants. *Clin Pharmacol* 2013;76(5):725-733.
64. Jahnke G et al. Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 1999;50:271–9.
65. Aversa et al. Potential utility of melatonin as an antioxidant during pregnancy and in the perinatal period. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012,25(3):207-21.
66. Robertson et al. Melatonin augments hypothermic neuroprotection in a perinatal asphyxia model. *Brain.* 2013;136(Pt 1):90-105
67. Biran et al. Is melatonin ready to be used in preterm infants as a neuroprotectant? *Dev Med Child Neurol.* 2014;56(8):717-23.
68. Kaur et al. Melatonin protects periventricular white matter from damage due to hypoxia. *J Pineal Res* 2010;48:185-193.
69. Olivier et al. Melatonin promotes oligodendroglial maturation of injured white matter in neonatal rats. *PLoS One* 2009, e7128.
70. Klionsky DJ, Cregg JM et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell.* 2003,5: 539-545.
71. Yang Y, Klionsky DJ et al. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2010. 22: 124-131.
72. Rogov V, Dotsch V et al Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell.*2014, 53:167-178.

73. Ye X, Zhou XJ et al. Exploring the Role of Autophagy-Related Gene 5 (ATG5) Yields Important Insights Into Autophagy in Autoimmune/Autoinflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2018,9: 2334.
74. Yang W, Jiang C et al. Blocking autophagy flux promotes interferon-alpha-mediated apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2019, 451:34-47.
75. Jin SM, Lazarou M et al. Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol,* 2010,191:933-942.
76. Morciano G, Patergnani S et al. Mitophagy in Cardiovascular Diseases. *J Clin Med.* 2020, 24;9(3):892.
77. Castellazzi M, Patergnani S et al. Autophagy and mitophagy biomarkers are reduced in sera of patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Sci Rep.* 2019, 9: 20009.
78. Patergnani S, Castellazzi M et al. Autophagy and mitophagy elements are increased in body fluids of multiple sclerosis-affected individuals. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2018, 89: 439-441.
79. Barkovich AJ, Hajnal BL et al. Prediction of neuromotor outcome in perinatal asphyxia: evaluation of MR scoring systems. *Am J Neuroradiol.* 1998;19(1):143-9.
80. Gitto E, Reiter RJ et al. Oxidative and inflammatory parameters in respiratory distress syndrome of preterm newborns: beneficial effects of melatonin. *Am J Perinatol* 2004; 21 (4): 209–216.
81. Gitto E, Romeo C et al. Melatonin reduces oxidative stress in surgical neonates. *J Pediatr Surg*2004; 39 (2): 184–189
82. Fourtillan JB, Brisson AM et al. Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280 (1): E11–E22.
83. Merchant NM, Azzopardi DV et al. Pharmacokinetics of melatonin in preterm infants. *Br J Clin Pharmacol* 2013; 76 (5): 725–733.

84. Bayley N. Bayley Scales of Infant and Toddler Development, Third Edition Bayley-III. 2006
85. Griffin JL. The Cinderella story of metabolic profiling: does metabolomics get to go to the functional genomics ball? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 147-61.;
86. Ellis DI et al. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics* 2007, 8: 1243-66.).
87. A Noto, V Fanos et al. Metabolomics in newborns *Advances in clinical chemistry* 2016
88. Atzori L et al. Metabolomics: a new tool for the neonatologist. *J Mat Fetal Neonatal Med* 2009;22(S3):50-53
89. D'angelo G. Cannavò L et al. Melatonin Administration from 2000 to 2020 to Human Newborns with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Am J Perinatol.* 2020; 31.
90. Chalak LF, Adams-Huet B et al. A total Sarnat score in mild hypoxic-ischemic encephalopathy can detect infants at higher risk of disability. *J Pediatr.* 2019. 214:217-221.
91. Goswami IR, Whyte H, Canadian Neonatal Network Investigators et al. Characteristics and short-term outcomes of neonates with mild hypoxic-ischemic encephalopathy treated with hypothermia. *J Perinatol.* 2020 Feb;40(2):275-283.
92. Oliveira V, Singhvi DP et al. Therapeutic hypothermia in mild neonatal encephalopathy: a national survey of practice in the UK. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2018;103:F388–90.
93. Saw CL, Rakshasbhuvankar A et al. Current practice of therapeutic hypothermia for mild hypoxic ischemic encephalopathy. *J Child Neurol.* 2019;34:402–9.
94. Soll RF. Cooling for newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. *Neonatology.* 2013;104:260–2

95. Rollins N, Booth T et al. Predictive value of neonatal MRI showing no or minor degrees of brain injury after hypothermia. *Pediatr Neurol.* 2014 May;50(5):447-51.
96. Bonifacio SL, Glass HC, Vanderpluym J, Agrawal AT, Xu D, Barkovich AJ, et al. Perinatal events and early magnetic resonance imaging in therapeutic hypothermia. *J Pediatr.* 2011 Mar;158(3):360–365.
97. Rutherford M, Pennock J, Schwieso J, et al. Hypoxic-ischemic encephalopathy: early and late magnetic resonance imaging findings in relation to outcome. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1996;75:F145–F151
98. Wintermark P, Hansen A et al. Early versus late MRI in asphyxiated newborns treated with hypothermia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2011;96(1):F36–F44
99. Rutherford M, Counsell S et al. Diffusion weighted magnetic resonance imaging in term perinatal brain injury: a comparison with site of lesion and time from birth. *Pediatrics.* 2004;114(4):1004–1014.
100. Okerefor A, Allsop J et al. Patterns of brain injury in neonates exposed to perinatal sentinel events. *Pediatrics.* 2008;121(5):906–914.
101. Lally PJ, Montaldo P, Oliveira V, Soe A, Swamy R, Bassett P, et al. Magnetic resonance spectroscopy assessment of brain injury after moderate hypothermia in neonatal encephalopathy: a prospective multicentre cohort study. *Lancet Neurol.* 2019;18:35–45
102. Thoresen M, Hellström-Westas L et al. Effect of hypothermia on amplitude-integrated electroencephalogram in infants with asphyxia. *Pediatrics*, 126 (2010), pp. e131-e139
103. Hongyan Lv, Qiuli Wang. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy-related biomarkers in serum and cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta.* 2015. 23;450:282-97.
104. De Wispelaere LA, Ouwehand S. Electroencephalography and brain magnetic resonance imaging in asphyxia comparing cooled and non-cooled infants. *Eur J Paediatr Neurol.* 2019;23(1):181-190.

105. Ramos, E. et al. Ischemic brain injury: New insights on the protective role of melatonin. *Free Radic. Biol. Med.* 104, 32-53 (2017).
106. Balduini, W. et al. The use of melatonin in hypoxic-ischemic brain damage: an experimental study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 25 Suppl 1, 119-124 (2012)
107. Cilio, M. R. & Ferriero, D. M. Synergistic neuroprotective therapies with hypothermia. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 15, 293-298 (2010).
108. Fan, X. & van Bel, F. Pharmacological neuroprotection after perinatal asphyxia. *J. Matern Fetal Neonatal Med.* 23 Suppl 3, 17-19 (2010).
109. Parikh, P. & Juul, S. E. Neuroprotective Strategies in Neonatal Brain Injury. *J. Pediatr.* 192, 22-32 (2018).
110. Shea, K. L. & Palanisamy, A. What can you do to protect the newborn brain? *Curr. Opin. Anaesthesiol.* 28, 261-266 (2015).
111. Alonso-Alconada, D., Alvarez, A., Arteaga, O., Martinez-Ibarguen, A. & Hilario, E. Neuroprotective effect of melatonin: a novel therapy against perinatal hypoxia-ischemia. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 9379-9395 (2013).
112. Aly, H. et al. Melatonin use for neuroprotection in perinatal asphyxia: a randomized controlled pilot study. *J. Perinatol.* 35, 186-191 (2015).
113. Fulia, F. et al. Increased levels of malondialdehyde and nitrite/nitrate in the blood of asphyxiated newborns: reduction by melatonin. *J. Pineal Res.* 31, 343-349 (2001).
114. Ahmad, Q. M., Chishti, et al Role of melatonin in management of hypoxic ischaemic encephalopathy in newborns: A randomized control trial. *J. Pak. Med. Assoc.* 68, 1233-1237 (2018).
115. Bersani I, Auriti C. et al. Use of early biomarkers in neonatal brain damage and sepsis: state of the art and future perspectives. *Biomed Res Int.* 2015;2015:253520.

116. Ennen C, Huisman T. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy treated with whole-body cooling. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 Sep;205(3):251.e1-7.
117. Murray MD. Biomarkers in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy- Review of the literature to date and future directions for research. *Handb Clin Neurol*. 2019;162:281-293
118. Chalak LF, Sánchez PJ. Biomarkers for severity of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and outcomes in newborns receiving hypothermia therapy. *J Pediatr*. 2014;164(3):468-74.e1.