



Corso di dottorato di ricerca in:

“Alimenti e Salute Umana”

Ciclo 33°

Titolo della tesi

“La proteina gliofibrillare acida, marker
predittivo del neurosviluppo in bambini con
cardiopatía congenita operata”

Dottorando

Michela Vergine

Supervisore

Prof. Giuseppe Damante

Co-supervisore

Prof.ssa Paola Cogo

Anno 2021

Sommario

Abstract	3
Riassunto	4
Premessa	5
Introduzione	6
Le cardiopatie congenite	6
Definizione.....	6
Epidemiologia.....	6
Trattamento chirurgico delle cardiopatie congenite e circolazione extracorporea	7
L'outcome neurologico nelle cardiopatie congenite.....	8
Il danno neurologico nelle cardiopatie congenite	11
Alterazioni in epoca fetale.....	12
Alterazioni in epoca neonatale preoperatoria	13
Il danno neurologico in corso di intervento cardiocirurgico	15
Monitoraggio del danno neurologico acuto e tecniche di neuroprotezione	16
Gli indicatori di danno neurologico	18
Proteina gliofibrillare acida	19
Altri indicatori di danno neurologico.....	21
Materiali e metodi.....	23
Partecipanti	23
Intervento chirurgico, raccolta dei campioni e analisi di GFAP	24
Valutazione del neurosviluppo.....	25
Analisi statistica	27
Risultati.....	29
Caratteristiche anatomiche, cliniche e chirurgiche	29
Analisi dei livelli di GFAP intraoperatorio e dell'outcome di neurosviluppo	31
Analisi dei sottogruppi.....	33
Analisi di correlazione e regressione	34
Discussione.....	36
Conclusioni	40
Bibliografia	41

Abstract

Background: Brain injury, impaired brain maturation, and long-term neurodevelopmental disorders are common in children with congenital heart diseases (CHD). We sought to identify a reliable biomarker of brain injury, which can predict neurodevelopmental anomalies in infants with CHD undergoing surgical repair.

Methods: We included 38 infants with CHD. They all had an uneventful perinatal course and underwent surgery in good clinical condition. Plasma glial fibrillary acidic protein (GFAP) was collected during multiple stages of cardiopulmonary bypass (CPB). Neurological development was assessed at 4-8 years of age using tests and questionnaires to assess cognitive, neuropsychological, and psychopathological functioning. We identified an impaired global neurodevelopmental index (NDI) when at least two domains were found abnormal at the evaluation. The relationships between NDI and GFAP values, together with clinical and perioperative variables, were analyzed by correlation and logistic regression.

Results: Mean peak GFAP was 1.42 ± 1.69 ng/mL (median 0.95, IQR 0.44-1.57 ng/mL). Intelligence Quotient scores fell within the normal range for most subjects, whereas more than half of them showed an abnormal NDI, with the greatest impairments in the psychopathological area. Peak GFAP >0.44 ng/ml showed a sensitivity of 90.9% and a specificity of 56.3% to detect an abnormal NDI. When patients were divided according to CHD, preoperative cyanosis and aortic arch obstruction were associated with highest values of GFAP. Regression analysis showed that GFAP max >0.44 ng/mL was the only independent predictor of an abnormal NDI (OR: 12.8; 95% CI 2.2-74.5).

Conclusion: GFAP is a reliable marker of acute brain injury during surgical repair of CHD with CPB, and it may be a promising indicator of abnormal neurological development. Grade and duration of hypothermia and rewarming during CPB seem to be significantly related to the increase of plasma GFAP value, which is significantly associated with deranged neuropsychological outcome.

Keywords: Congenital Heart Disease; Cardiopulmonary Bypass; Children; Neuropsychological outcome; Glial Fibrillary Acidic Protein

Riassunto

Introduzione: il danno neurologico, l'alterata maturazione cerebrale e le alterazioni del neurosviluppo a lungo termine sono problematiche che coinvolgono fino alla metà dei bambini con diagnosi di cardiopatia congenita (CHD, "Congenital Heart Disease"). Lo scopo del presente studio è identificare un marker affidabile di danno neurologico che possa prevedere le anomalie del neurosviluppo in bambini con CHD si sottopongono a intervento cardiocirurgico.

Metodi: sono stati inclusi 38 bambini con CHD, ognuno dei quali con perinatalità nella norma e sottoposto a intervento cardiocirurgico in elezione. Campioni ematici per il dosaggio di GFAP (Proteina Glio Fibrillare Acida) sono stati raccolti durante varie fasi della circolazione extracorporea (CEC). La valutazione dello sviluppo neurologico è stata eseguita a 4-8 anni di età con l'ausilio di appropriati test e questionari specifici per le funzioni cognitive, neuropsicologica e psicopatologica. Abbiamo identificato un indice di alterato neurosviluppo globale (NDI, "Neuro Developmental Index") in caso di esito patologico in almeno due dei domini analizzati. La relazione tra i valori di GFAP e NDI, insieme con le variabili cliniche e perioperatorie, è stata valutata attraverso analisi di correlazione e regressione logistica.

Risultati: il valore medio di GFAP picco era 1.42 ± 1.69 ng/mL (mediana 0.95, IQR 0.44-1.57 ng/mL). Il valore di QI (Quoziente di Intelligenza) era nella norma per la maggior parte dei soggetti, mentre più della metà presentava NDI patologico e l'area maggiormente colpita è stata quella psicopatologica. Il valore di GFAP picco >0.44 ng/mL ha una sensibilità di 90.9% e specificità di 56.3% nell'identificare un NDI patologico. L'analisi statistica dei sottogruppi di CHD ha evidenziato che la presenza di cianosi preoperatoria e l'ostruzione dell'arco aortico sono associati a valori maggiori di GFAP. L'analisi di regressione ha mostrato che valori di GFAP picco >0.44 ng/mL sono l'unico predittore indipendente di NDI patologico (OR: 12.8; 95% CI 2.2-74.5).

Conclusioni: GFAP rappresenta un marker affidabile di danno neurologico acuto in corso di intervento chirurgico per CHD con l'utilizzo della CEC e potrebbe dimostrarsi un indicatore promettente di sviluppo neurologico anormale. La profondità e durata delle fasi di ipotermia e riscaldamento sembrano essere associate significativamente all'aumento dei valori di GFAP.

Parole chiave: cardiopatia congenita, circolazione extracorporea, bambini, sviluppo neuropsicologico, proteina glio fibrillare acida.

Premessa

Prima degli anni '80, i bambini con cardiopatia congenita complessa difficilmente raggiungevano l'età adolescenziale e adulta. Successivamente, i progressi avvenuti nel campo della cardiochirurgia correttiva, della diagnostica ecocardiografica e della medicina intensiva, insieme allo sviluppo della cardiologia interventistica, hanno permesso di raggiungere una drastica riduzione della mortalità chirurgica. Di conseguenza, un numero sempre maggiore di bambini con cardiopatia congenita ha iniziato a frequentare la scuola rivelando la presenza, sempre più diffusa, di alterazioni tipiche dell'ambito neurocognitivo e comportamentale con necessità di ricorso sempre maggiore a servizi di riabilitazione e a supporti educativi. Complessivamente, si è osservata una riduzione della qualità di vita di questi pazienti e delle loro famiglie.

In letteratura c'è attualmente un grande interesse rivolto alla comprensione dei meccanismi che portano allo sviluppo del danno neurologico in questa categoria di pazienti e alle possibilità di miglioramento dell'outcome neurocognitivo a distanza. Lo studio attuale si pone in questo ambito scientifico proponendosi di approfondire una possibile correlazione tra gli indicatori di danno neurologico che si verifica nel corso dell'intervento chirurgico e lo sviluppo psicomotorio a distanza.

Introduzione

Le cardiopatie congenite

Definizione

Le cardiopatie congenite (CHD, Congenital Heart Disease) sono le malformazioni più frequenti alla nascita e rappresentano la più frequente causa di morte in età infantile per un difetto congenito¹.

Le CHD consistono in difetti dell'architettura cardiaca che interferiscono con il drenaggio venoso, la formazione dei setti e la sequenzialità dei segmenti cardiaci, e con la regolare funzione degli apparati valvolari e sono dovute ad un alterato sviluppo di una struttura normale o all'arresto dello sviluppo embrionale attorno alle 5-10 settimane gestazionali. Le alterate condizioni emodinamiche imposte da una lesione congenita plasmano progressivamente le strutture anatomiche portando a una condizione di CHD evolutiva, cioè che continua a cambiare anche dopo la nascita².

Epidemiologia

La prevalenza nei nati vivi è di circa 8/1000³, con un ampio range di variabilità (3-10/1000) dovuto alla difficoltà nel condurre studi epidemiologici precisi e alla variabilità dello screening prenatale e delle competenze specialistiche tra i vari centri¹. La percentuale risulta essere maggiore nei nati morti (3%-4%), negli aborti spontanei (10%-25%) e nei nati prematuri (2%, escludendo il dotto arterioso pervio)⁴.

Negli anni, la prevalenza totale alla nascita delle CHD è cresciuta in modo sostanziale, da 0.6 per 1.000 nati vivi tra il 1930 e il 1934 a circa 8-9 per 1.000 nati vivi dopo il 1995. Tale incremento è maggiormente legato al miglioramento delle tecniche diagnostiche e di screening che permette di identificare difetti anche di lieve entità, la cui incidenza è infatti quella maggiormente aumentata negli anni⁵ (figura 1). La letteratura attuale è generalmente concorde nel sostenere che non ci sia stato, quindi, un reale e sostanziale aumento della prevalenza della malattia anche se ci sono elementi a favore di quest'ultima ipotesi: l'aumento della sopravvivenza dei neonati prematuri⁶, l'aumento dell'età materna alla prima gravidanza, che si associa ad una maggiore prevalenza complessiva di anomalie congenite, e il raggiungimento dell'età adulta da parte di un numero sempre maggiore di soggetti con CHD, la cui prole ha un rischio aumentato di sviluppare la stessa patologia rispetto alla popolazione normale.

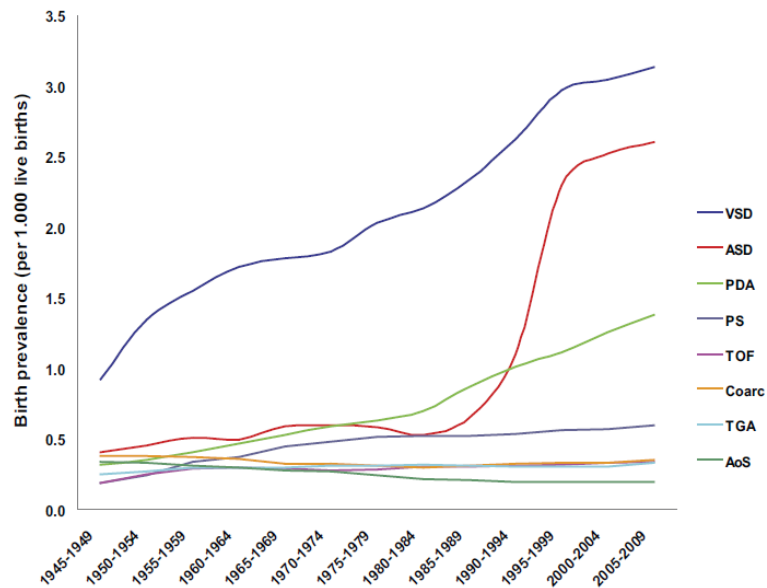


Figura 1. Prevalenza nel tempo dei sottotipi di CHD⁷.

La mortalità per CHD è cambiata molto negli anni essendo inizialmente particolarmente elevata. Dal 1980, tuttavia, grazie anche all'aumentato numero di cardiopatie congenite diagnosticate, gli interventi correttivi per i difetti "minori" si sono affinati e hanno raggiunto alti standard di qualità, mentre il trattamento chirurgico dei difetti più complessi è tuttora in continuo sviluppo e miglioramento. Il tasso di sopravvivenza attuale per bambini con CHD complesse è >90%⁸.

Grazie al netto miglioramento della sopravvivenza, negli ultimi anni si è, quindi, assistito ad uno shift demografico e attualmente la numerosità della popolazione adulta affetta da CHD supera quella pediatrica. Questo rappresenta un enorme successo dal punto di vista medico, ma ha fatto emergere le sequele, talora drammatiche, a cui si accompagnano la patologia stessa e i trattamenti medici e chirurgici, in particolare per quanto riguarda l'aspetto neurocognitivo e comportamentale⁸.

Trattamento chirurgico delle cardiopatie congenite e circolazione extracorporea

Circa un terzo delle cardiopatie congenite richiede una correzione anatomica o un intervento chirurgico di tipo palliativo per permettere la sopravvivenza del paziente affetto nel primo anno di vita⁹. In particolare, la cardiocirurgia risulta necessaria nell'80% delle cardiopatie con più alta mortalità perinatale (come la sindrome del cuore sinistro ipoplasico o la trasposizione delle grandi arterie) e solo nel 7% di quelle con più bassa mortalità perinatale (come i difetti settali³).

I due momenti fondamentali, che hanno permesso una rapida e inarrestabile innovazione in campo cardiocirurgico, sono stati l'introduzione dell'ipotermia e della circolazione extra-corporea (CEC) che, fornendo un campo operatorio esangue a livello intracardiaco, permettono al cardiocirurgo di intervenire anche nelle cardiopatie più complesse¹⁰.

Nella maggior parte degli interventi cardiocirurgici è necessario interrompere temporaneamente l'attività cardiaca, e di conseguenza anche quella polmonare, utilizzando la Macchina Cuore-Polmoni, un sistema predisposto a sostituire contemporaneamente entrambe le funzioni: in tal modo è possibile per il chirurgo operare su un cuore fermo ed esangue, aprire le cavità e mobilizzarlo senza rischi, senza rischio di embolia o di danno ischemico a carico degli organi periferici.

La macchina cuore-polmone è un apparecchio molto complesso costituito da vari componenti: ad esempio, una pompa che fornisce la spinta propulsiva al sangue, un ossigenatore per sostituire la funzione respiratoria dei polmoni ed uno scambiatore di calore per il raffreddamento e il riscaldamento del sangue del paziente. Le cannule arteriose e venose, costruite in materiale sintetico, permettono il collegamento del paziente alla Macchina Cuore-Polmoni e vengono inserite a livello centrale (es: aorta e atrio destro o vene cave) o periferico (es: arteria e vena femorale). In corso di intervento cardiocirurgico, la circolazione extracorporea svolge molte funzioni tra cui permettere al sangue venoso desaturato di essere aspirato nel reservoir dell'ossigenatore, monitorare costantemente le variazioni della volemia del paziente, o infondere liquidi in caso di necessità. Dopo essere stato filtrato per eliminare possibili bolle d'aria, microtrombi o corpi estranei, il sangue ossigenato rientra nella circolazione sistemica attraverso la cannula arteriosa.

La circolazione extracorporea prevede numerose alterazioni della normale fisiologia del paziente, tra cui un'emodiluizione, secondaria alla sproporzione tra taglia del paziente pediatrico e dimensioni del circuito, un alto livello di coagulazione e l'utilizzo di gradi variabili di ipotermia¹¹.

L'outcome neurologico nelle cardiopatie congenite

Circa la metà dei bambini affetti da CHD presenta un grado variabile di problemi di natura cognitiva, neuropsicologica o comportamentale che diventano apparenti in età infantile e scolare e possono persistere fino all'adolescenza e l'età adulta. La presenza di alterazioni del

neurosviluppo influisce negativamente sulla realizzazione in campo scolastico, educativo, lavorativo e in generale sulla qualità di vita comportando un aumentato ricorso ai servizi e alle strutture di riabilitazione¹²⁻¹⁴.

La presenza di lesioni cerebrali e alterazioni neurologiche nei pazienti affetti da CHD sono evidenziabili già nel periodo preoperatorio¹⁵, come ad esempio la microcefalia, riscontrabile fino al 50% dei casi, o malformazioni più rare come l'agenesia o disgenesia del corpo calloso, l'oloprosencefalia, la lissencefalia, malformazioni di Dandy-Walker, immaturità del mantello corticale e ritardo nella girazione¹⁶. Fino al 50% dei neonati e fino al 38% dei lattanti con CHD presentano alterazioni neurologiche quali anomalie di tono, asimmetria motoria, letargia e assenza del riflesso di suzione alla nascita con difficoltà nell'alimentazione successiva, convulsioni o attività epilettiforme all'EEG.

La prevalenza e la severità delle alterazioni aumentano con la severità della CHD, come illustrato nella figura 2¹⁷. Ad esempio, i bambini con CHD a fisiologia univentricolare, in particolare HLHS ("Hypoplastic Left Heart Syndrome", sindrome del cuore sinistro ipoplasico), hanno il rischio più elevato di sviluppare alterazioni dello sviluppo per l'instabilità emodinamica dell'epoca perinatale e la necessità di eseguire multipli interventi cardiocirurgici con utilizzo della CEC e dell'arresto circolatorio.

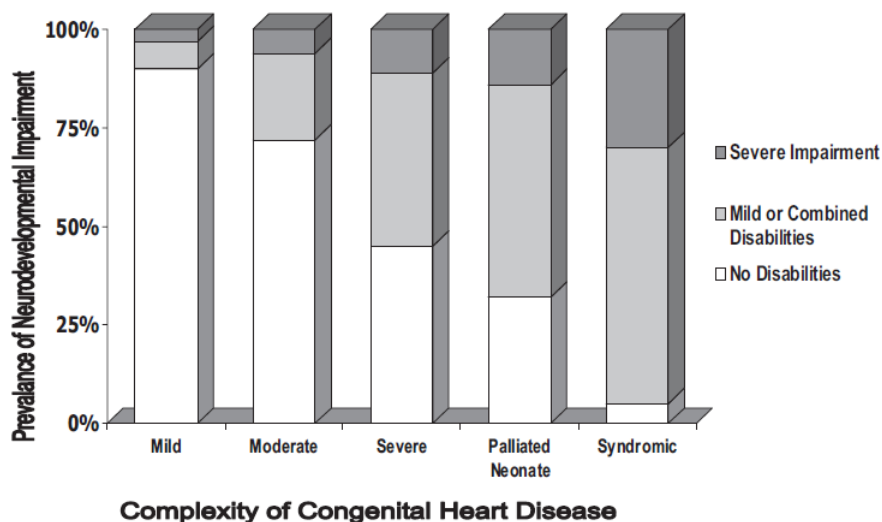


Figura 2. Prevalenza e severità dell'outcome neurocognitivo in bambini con CHD di diversi gradi di complessità.

In letteratura sono presenti numerosi studi sulla valutazione dell'outcome a medio e lungo termine di diverse coorti di pazienti con CHD. La generalizzazione dei risultati risulta tuttavia problematica, data l'eterogeneità dei vari report in termini di tipologia di CHD considerata, trattamento effettuato, epoca storica del trattamento, durata del follow-up e test utilizzati per la valutazione^{15,18}. In ogni caso, vi è comune evidenza che al crescere dell'età vi sia un recupero in alcune funzioni specifiche, come quelle motorie, ed in parallelo la comparsa di nuovi deficit in aree come quelle dell'attenzione, della memoria narrativa e del linguaggio. Non è noto se ciò sia dovuto alla diversa sensibilità dei test forniti a età diverse oppure se l'emergere di funzioni cognitive superiori metta in evidenza una vulnerabilità neurobiologica sottostante¹⁹.

Tra gli studi più rilevanti, condotto in modo prospettico, troviamo il "Boston Circulatory Arrest Study" (BCAS) che è iniziato nel 1988 e ha seguito le vite di 171 neonati con trasposizione delle grandi arterie (TGA) randomizzati in due gruppi di strategia di gestione della CEC (con o senza l'utilizzo dell'arresto cardiocircolatorio in ipotermia profonda, Deep Hypothermic Circulatory Arrest, DHCA) e seguiti con valutazioni seriate dello stato neurologico e dello sviluppo psicomotorio all'età di 1, 4, 8 e 16 anni. Uno dei risultati generali più importanti e significativi di questo studio è che la presenza di deficit neurocognitivo e di alterazioni alla RM encefalo non differisce significativamente nei due gruppi di pazienti, a supporto dell'ipotesi che l'outcome a lungo termine dei pazienti con CHD non dipenda solo o prevalentemente da parametri perioperatori, ma anche da altre tipologie di fattori che vanno indagati^{20,21}.

Le alterazioni dello sviluppo psicomotorio si manifestano con caratteristiche specifiche in base all'età di valutazione. Nei lattanti e nei bambini entro i 3 anni di vita la maggior disabilità si riscontra in ambito motorio²², ma un deficit nelle abilità motorie fini e grossolane si riscontra anche nella popolazione di CHD in età prescolare e scolare, con frequenza variabile dal 25 al 50% dei casi²³. Tali difficoltà non si evidenziano più in adolescenza. Il quoziente intellettivo (QI) dei bambini con CHD sembra rientrare nei limiti di norma nella maggior parte dei casi, nonostante sia spesso ai limiti inferiori^{15,18}. A partire dall'età prescolare e scolare si evidenziano invece spesso deficit neurocognitivi isolati, in particolare nell'area del linguaggio, delle abilità visuospatiali²⁴⁻²⁷ e delle funzioni esecutive, ovvero quell'insieme di abilità neurocognitive di ordine superiore (controllo inibitorio, memoria di lavoro e flessibilità cognitiva) che facilitano la pianificazione di una serie di azioni finalizzate ad un obiettivo^{23,28}. Il loro corretto funzionamento dipende dal grado di maturazione delle strutture prefrontali, dall'interazione con le strutture sottocorticali e, di

conseguenza, dall'integrità strutturale della sostanza bianca, bersaglio tipico del danno neurologico nelle CHD.

Alterazioni del comportamento e problemi di socializzazione sono presenti in circa un quarto dei casi, mentre la diagnosi di ADHD (Attention Deficit Hyperactivity Disorder) viene formulata fino al 40-50% in diverse casistiche. Tutto ciò implica un maggior rischio di scarsa performance scolastica, di difficoltà nell'integrazione con i coetanei e di sviluppo di comportamento antisociale. Le problematiche dell'età scolare potrebbero aumentare il rischio di sviluppare problemi emotivi e disturbi psichiatrici di vario genere in età adolescenziale^{12,29,30}.

Il danno neurologico nelle cardiopatie congenite

Le cause responsabili dell'aumentata frequenza di disordini del neurosviluppo nella popolazione con CHD sono multifattoriali, cumulative e sinergiche⁹, come illustrato nella figura 3.

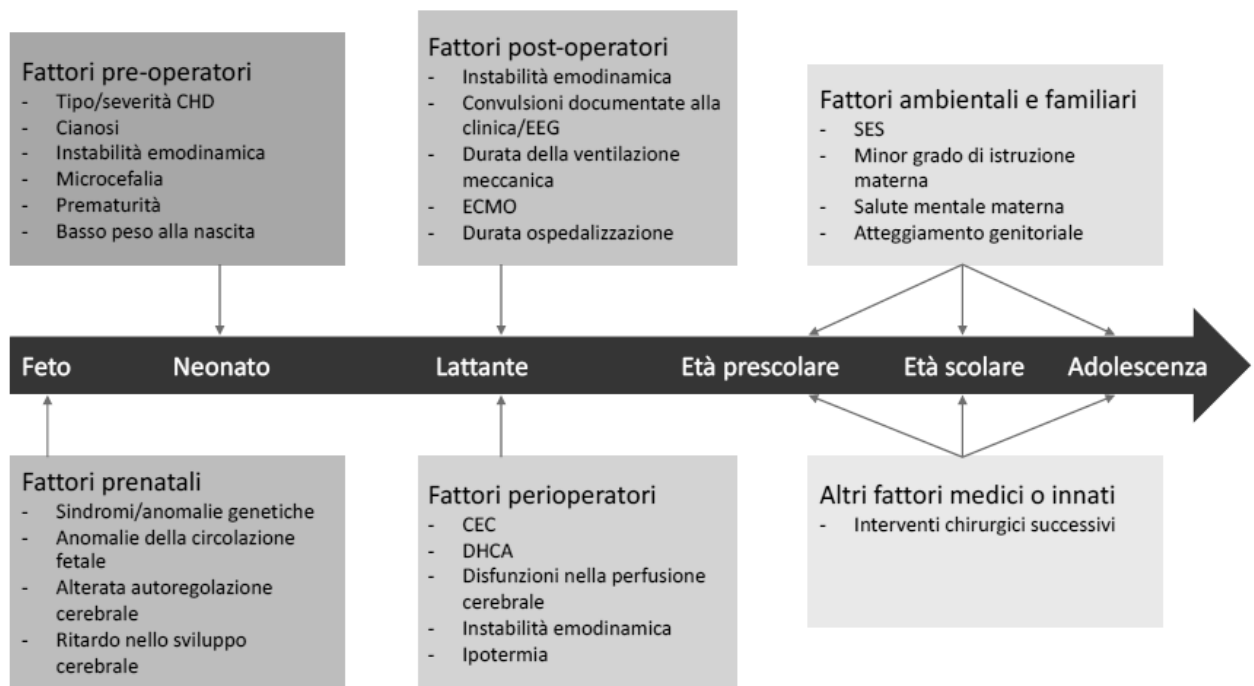


Figura 3. Eziologia danno neurologico in CHD.

In circa un terzo dei casi è identificabile un'alterazione genetica che può associarsi ad un alterato sviluppo psicomotorio indipendentemente dalla presenza della cardiopatia. Ad esempio, adulti con microdelezione del cromosoma 22q11, associata a difetti del conotruncato e causa della

Sindrome di DiGeorge e simili, possono presentare deficit specifici delle abilità visuospatiali, di alcune funzioni esecutive, del pensiero astratto e dell'attività. Le cromosomopatie comportano spesso diversi gradi di ritardo mentale o di deficit specifici dello sviluppo, come la sindrome di Down, che nel 40% dei casi si associa a CHD (più tipicamente forme di canale atrioventricolare), o la sindrome di Turner, in cui si ritrovano più spesso stenosi e/o coartazione aortica. Altre alterazioni riscontrabili sono le mutazioni di singoli geni, come nella sindrome di Noonan, o i polimorfismi genetici (es ApoE) che possono influenzare la risposta dell'organismo, e in particolare del tessuto cerebrale, agli stress a cui andrà incontro un bambino con CHD. Infine, studi più recenti basati sull'uso dell'esoma hanno mostrato che i pazienti con CHD e disabilità neuropsicologiche presentano spesso mutazioni a carico di geni che sono espressi sia a livello cardiaco che cerebrale suggerendo una possibile causa genetica comune che possa contribuire allo sviluppo di anomalie neuropsicologiche in questa categoria di pazienti⁹. Tuttavia, fattori di rischio riconosciuti, come i disordini genetici, riescono a spiegare solo circa il 30% della variabilità osservata nell'outcome neuropsicologico a lungo termine dopo interventi cardiocirurgici in età infantile⁸.

Alterazioni in epoca fetale

È ormai stabilita l'associazione tra presenza di CHD complessa e ritardo di crescita intrauterino (IUGR, IntraUterine Growth Retardation) con pattern specifici a seconda del tipo di cardiopatia sottostante, secondari all'alterata circolazione fetale. Ad esempio, i neonati con diagnosi di TGA presentano peso nella norma e circonferenza cranica ridotta, mentre i neonati con HLHS hanno parametri auxologici in genere inferiori rispetto al normale e circonferenza cranica ulteriormente inferiore rispetto all'atteso³¹.

In caso di compromissione dell'ossigenazione fetale, si verifica una redistribuzione del flusso ematico al fine di mantenere una perfusione cerebrale adeguata, denominata fenomeno di "brain sparing". Questo meccanismo di compenso può non risultare sufficiente per un normale sviluppo cerebrale, in particolare in situazioni di stress intrauterino prolungato: nei feti con CHD è stata dimostrato l'esistenza di tale fenomeno associato, tuttavia, ad una persistente e significativa riduzione della circonferenza cranica e quindi del volume cerebrale. Anche l'inversione del flusso diastolico a livello dell'istmo aortico si associa ad alterato outcome neurologico in feti ad alto rischio, in quanto è indice di un alterato rapporto tra resistenze vascolari placentari e cerebrali^{18,32}.

Il normale sviluppo cerebrale durante la vita fetale richiede che il sangue maggiormente ossigenato e ricco di nutrienti proveniente dalla placenta venga convogliato nella circolazione

cerebrale: nel feto sano, questo è permesso dalla presenza di alcuni shunt intra- ed extra-cardiaci. Nel feto con forme diverse di CHD, questo percorso è alterato per cui il tessuto cerebrale in maturazione riceve sangue con variabili gradi di deossigenazione³² (figura 4).

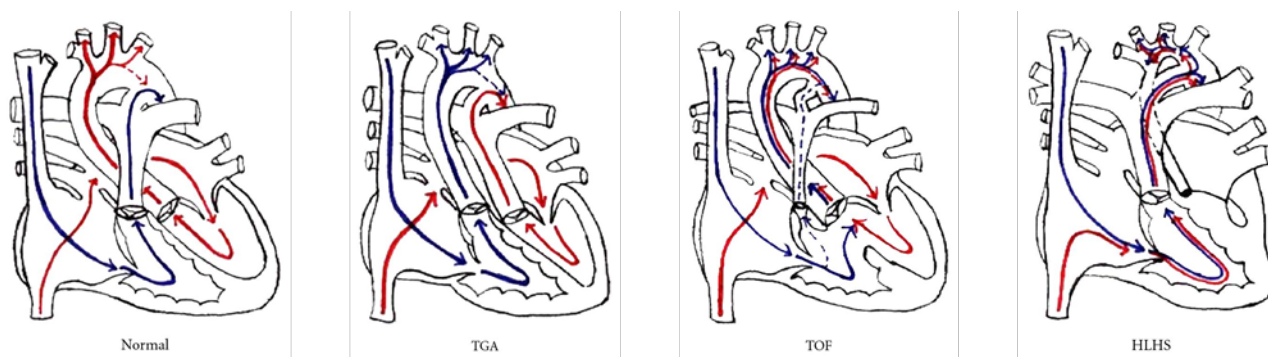


Figura 4. Distribuzione del flusso ematico nel feto normale, con TGA, con tetralogia di Fallot (TOF) e HLHS.

Negli ultimi anni l'introduzione di metodiche più sofisticate ha permesso di approfondire ulteriormente questo campo acquisendo importanti informazioni sull'evoluzione dello sviluppo cerebrale nel feto con CHD. È stata dimostrata una condizione di ipossiemia cerebrale nel feto CHD rispetto al controllo sano caratterizzata da una riduzione media del 10% della SaO₂ in aorta ascendente, del 15% dell'apporto di O₂ e del 32% del consumo di O₂ a livello cerebrale: questi parametri sono risultati essere direttamente correlati ad una riduzione media del 13% del volume cerebrale fetale³³, in accordo con dati precedenti della letteratura. Questi studi sottolineano quindi l'incapacità dell'anomalo sistema cardiovascolare fetale di rispondere alle aumentate richieste metaboliche per la crescita e la maturazione cerebrale nel corso del terzo trimestre di gravidanza³⁴.

Alterazioni in epoca neonatale preoperatoria

Il neonato, a differenza di quanto si riteneva inizialmente, presenta delle alterazioni cerebrali evidenti già alla nascita che possono essere classificabili in due categorie: anomalie della maturazione cerebrale e lesioni acquisite.

Nel cervello del feto con CHD, studiato con diverse metodiche di risonanza magnetica (RM), si evidenziano caratteristiche di immaturità tipiche del pretermine sia dal punto di vista funzionale che anatomico, che permettono di stimare un ritardo di sviluppo di circa un mese rispetto a quanto attesa in base all'età gestazionale³⁵. Nel corso del terzo trimestre di gravidanza, inoltre, il volume cerebrale presenta una crescita non adeguata rispetto al feto sano³⁴.

Le lesioni cerebrali acquisite più frequenti sono quelle a carico della sostanza bianca (WMI, white matter injury) e, secondariamente, lesioni focali come gli infarti, sia corticali che a carico dei nuclei della base, e le microemorragie, intraventricolari o parenchimali^{36,37}. Il danno della sostanza bianca secondario a insulto ipossico-ischemico è tipico del neonato pretermine: questo dato, in linea con il ritardo di maturazione cerebrale illustrato precedentemente, suggerisce una maggiore vulnerabilità delle cellule della sostanza bianca (oligodendrociti) nel nato a termine con CHD rispetto al neonato sano¹⁸.

Questi due fenomeni risultano essere strettamente correlati in quanto maggiore è il ritardo di maturazione, più severe saranno le WMI evidenziate nel preoperatorio. Inoltre, è dimostrato che i feti con CHD durante il terzo trimestre di gravidanza non presentano ancora le WMI, ma già dei segni di alterato sviluppo che quindi potrebbe rendere il tessuto cerebrale più predisposto a sviluppare questo tipo di danno nella vita post-natale^{36,37}.

Numerosi studi hanno dimostrato lo sviluppo di WMI in seguito all'intervento chirurgico. Beca et al³⁶ hanno studiato prospetticamente il tipo e l'evoluzione del danno neurologico in neonati con CHD sottoposti ad intervento cardiocirurgico con e senza l'utilizzo della CEC e hanno dimostrato che nuove lesioni cerebrali si sviluppano nel 44% dei neonati sottoposti a intervento chirurgico e che le WMI sono le lesioni più frequenti sia nel periodo pre- che post-operatorio (20% e 42% del totale dei casi rispettivamente). La severità delle nuove WMI è risultata maggiormente correlata al tipo di CHD (minore in caso di fisiologia biventricolare senza ostruzione dell'arco aortico) e all'entità del danno cerebrale evidenziato alla nascita, sia in termini di sviluppo che di WMI. L'utilizzo della CEC di per sé non è risultato essere un fattore di rischio significativo per lo sviluppo di nuove WMI, anche se nel sottogruppo di pazienti sottoposti a interventi con CEC gli autori hanno dimostrato che una maggiore durata si associava allo sviluppo di lesioni più severe. Infine, il grado di sviluppo psicomotorio valutato a due anni di età con la scala Bayley (III edizione) è risultato alterato, come già evidenziato in studi precedenti, e correlato significativamente solo al grado di immaturità cerebrale e non alla presenza di WMI pre- o post-operatorie.

In conclusione, i dati di letteratura suggeriscono che l'alterato outcome neuropsicologico osservato a distanza di anni dall'intervento cardiocirurgico sia correlato più ai fattori di rischio propri del paziente, in particolare l'immaturità cerebrale, rispetto ai fattori intraoperatori o la comparsa di WMI⁹.

Il danno neurologico in corso di intervento cardiocirurgico

La maggioranza delle complicanze neurologiche correlate alla cardiocirurgia sono secondarie all'impiego della CEC che agisce negativamente a livello cerebrale con diversi meccanismi³⁸:

- Embolia;
- Risposta infiammatoria sistemica;
- Alterazioni del metabolismo neuronale conseguenti all'ipossiemia o all'edema citotossico o vasogenico;
- Ipoperfusione e riperfusione cerebrale.

Gli emboli si differenziano in base alle loro dimensioni e possono essere costituiti da aria, lipidi, aggregati cellulari o materiale esogeno. I microemboli possono favorire la dilatazione arteriolare e capillare e l'insorgenza di danno ischemico e/o disfunzione neuronale.

L'attivazione di una risposta infiammatoria sistemica è comune dopo pochi minuti dall'avvio del bypass e consegue al contatto del sangue con superfici non endoteliali, che porta all'attivazione del sistema leucocitario e del complemento, all'aggregazione e degranolazione piastrinica, alla denaturazione proteica, a fenomeni di emolisi e di danneggiamento della membrana eritrocitaria. L'esposizione a prodotti sanguigni allogenicici e la sproporzione del circuito extracorporeo rispetto alla taglia neonatale, nonostante la miniaturizzazione della strumentazione, amplificano la risposta infiammatoria. Tutti questi meccanismi portano ad un'alterazione significativa dell'integrità della barriera emato-encefalica (BEE) e ad un significativo aumento della sua permeabilità, portando all'edema cerebrale ed esponendo il parenchima ai prodotti dannosi dell'infiammazione.

In corso di CEC l'utilizzo dell'ipotermia permette di ridurre le richieste metaboliche e il consumo di ossigeno del cuore, del cervello e degli altri organi³⁹ (calo del 6-7% per ogni °C in meno sotto i 37°C), di mantenere la perfusione con valori più bassi di ematocrito e flusso e di incrementare la durata dell'arresto di circolo in condizioni di rischio ridotto. A livello cerebrale l'ipotermia porta ad una riduzione della sofferenza ischemica neuronale e della permeabilità delle arteriole diminuendo l'entità della disfunzione della BEE, ma può anche essere dannosa in quanto incrementa la pressione idrostatica cerebrale, determina lo spostamento della curva di dissociazione dell'emoglobina verso sinistra con conseguente riduzione della cessione di ossigeno ai tessuti e aumenta le resistenze vascolari sistemiche innalzando il rischio di ipertermia cerebrale nella fase di riscaldamento. Diversi studi sono stati condotti per definire il migliore approccio

all'utilizzo dell'ipotermia in corso di CEC per la prevenzione del danno neurologico, ma non ci sono dati conclusivi a favore di una strategia specifica.

Fisiologicamente la perfusione cerebrale viene mantenuta attraverso un meccanismo di autoregolazione, che rimane stabile o solo modestamente alterato in condizioni di ipotermia lieve o moderata, mentre in condizioni di ipotermia profonda questo meccanismo viene sostanzialmente perso. In corso di CEC, quindi, la perfusione cerebrale diventa direttamente dipendente dal flusso ematico cerebrale con necessità di monitoraggio continuo di parametri clinici ed ematici per mantenerlo adeguato.

Con il ripristino della perfusione cerebrale e con l'inizio del riscaldamento, il letto capillare risulta occluso da cristalli cellulari, fibrina e detriti infiammatori e l'endotelio così danneggiato presenta una maggiore tendenza alla vasocostrizione. Nonostante l'utilizzo di filtri leucocitari, corticosteroidi e altre metodiche, questi fenomeni portano alla perdita dell'autoregolazione cerebrale che, nella fase di svezzamento dalla CEC, ha una rilevanza clinica fondamentale in quanto il flusso ematico cerebrale varierà in parallelo con episodi di basso output cardiaco, possibili nell'immediato post-operatorio. Il ripristino dell'apporto di ossigeno, inoltre, induce un burst ossidativo con formazione di radicali idrossilici che a loro volta comportano perossidazione lipidica e disintegrazione delle membrane cellulari. Il periodo di riscaldamento si associa infine al rischio di microemboli gassosi da gas dissolti che possono contribuire allo sviluppo di danno neurologico.

Monitoraggio del danno neurologico acuto e tecniche di neuroprotezione

La NIRS (Near-Infrared Spectroscopy) è una metodica non invasiva che fornisce una stima continua e in tempo reale del grado di ossigenazione della corteccia cerebrale prima, durante e dopo l'intervento chirurgico, attraverso il calcolo della concentrazione di ossiemoglobina e desossiemoglobina espresse come saturazione cerebrale di ossigeno (rSO_2i)⁴⁰. La NIRS è meglio impiegata come indicatore dell'andamento dell'ossigenazione cerebrale, in quanto ogni paziente è usato come controllo di sé stesso, e un abbassamento del 20% dal livello base misurato pre-incisione chirurgica può rappresentare un cambiamento clinicamente significativo. I livelli di rSO_2i basali preoperatori variano in base alla lesione cardiaca presente. Diminuzioni significative dei livelli di rSO_2i si verificano durante i periodi di instabilità emodinamica e di desaturazione arteriosa, mentre l'innalzamento dei valori si osserva con miglioramenti della gittata cardiaca e del rilascio di O_2 . Riduzioni prolungate della rSO_2i in corso di CEC si associano nel 70% dei casi ad un

aumentato rischio di disfunzione neurologica nel post-operatorio⁴¹. Un limite della NIRS è rappresentato dal fatto che questa metodica misura la rSO₂i solo in una piccola porzione di volume cerebrale della corteccia frontale, mentre altre aree della corteccia o strutture più profonde dell'encefalo non sono monitorate.

Altri metodi strumentali di monitoraggio della funzione cerebrale e dell'eventuale danno neurologico in corso di CEC, sono:

- L'elettroencefalogramma, metodica che permette di registrare l'attività elettrica cerebrale e che in corso di intervento chirurgico può essere utilizzato per ottenere informazioni sulla profondità dell'anestesia, per evidenziare cambiamenti dell'attività cerebrale secondari a condizioni ipossico-ischemiche, per identificare eventuali crisi convulsive anche subcliniche¹⁵ e infine, a seconda della complessità del monitoraggio utilizzato, per localizzare l'area cerebrale maggiormente danneggiata⁴¹.
- L'ecodoppler trans-cranico, metodo di monitoraggio sensibile e in tempo reale della velocità del flusso ematico cerebrale che può, ad esempio, permettere di riconoscere variazioni acute, consentendo aggiustamenti delle cannule impiegate nel bypass e prevenendo la comparsa di importanti danni neurologici, o di evidenziare la presenza di emboli⁴².

Le tecniche di neuroprotezione sono utilizzate prevalentemente negli interventi sull'arco aortico durante i quali viene interrotta la perfusione dei vasi brachiocefalici e quindi del circolo cerebrale. L'obiettivo principale è minimizzare il danno neurologico potenziale conseguente all'insulto ischemico, che rappresenta la causa principale del danno cerebrale in corso di CEC. I meccanismi fondamentali della neuroprotezione si basano sulla riduzione della richiesta metabolica attraverso l'ipotermia e sulla riduzione della durata del periodo ischemico.

L'ipotermia rimane il punto cruciale di qualsiasi strategia di protezione della funzione cerebrale. Il tasso metabolico a livello cellulare e le richieste di ossigeno dipendono direttamente dalla temperatura tissutale, che nella maggior parte dei casi è analoga a quella corporea. Il cervello è in grado di ridurre le sue richieste metaboliche a un livello tale che la perfusione ematica può essere completamente interrotta senza sequele neurologiche. Per molti anni è stata utilizzata come unica tecnica e attualmente viene usata come metodica isolata in caso di tempi di ischemia inferiori ai 30 minuti o in condizioni cliniche di emergenza. L'ipotermia si divide in 3 gradi a seconda della temperatura minima raggiunta: profonda (TC 15.1-25°C), moderata (TC 25.1-30°C) o lieve (TC

minima 30.1°C). Recentemente si sta diffondendo sempre di più, l'utilizzo di gradi meno profondi di ipotermia rispetto a quanto fatto in precedenza, considerata la presenza in letteratura di dati con buon profilo di sicurezza e outcome neurologici equivalenti³⁹.

Altre tecniche di neuroprotezione sono rappresentate da varie metodiche di perfusione cerebrale che permettono di ridurre o eliminare il fenomeno di ischemia cerebrale, come ad esempio:

- La perfusione cerebrale retrograda, resa possibile dall'assenza di valvole nel sistema vascolare tra la vena cava superiore e il circolo cerebrale, che permette, attraverso la cannulazione del sistema venoso, la perfusione del parenchima cerebrale per via retrograda. In questo modo è possibile indurre e/o mantenere l'ipotermia a livello dell'encefalo e rimuovere i metaboliti ischemici, ma non fornire un significativo apporto di ossigeno e nutrienti per cui questa modalità di perfusione viene generalmente combinata all'utilizzo dell'ipotermia. Un ulteriore vantaggio è rappresentato dalla cannulazione che avviene a livello venoso, evitando potenziali danni a livello dei tronchi arteriosi brachiocefalici.
- La perfusione cerebrale anterograda, che preserva il pattern fisiologico del flusso ematico cerebrale e può essere completa o selettiva (perfusione unilaterale con distribuzione a entrambi gli emisferi attraverso i circoli collaterali).

Una review sistematica pubblicata nel 2012⁴³ ha analizzato i dati di letteratura dei 20 anni precedenti riguardo le tecniche di neuromonitoraggio e di neuroprotezione in corso di circolazione extracorporea in lattanti di età < 1 anno. Dall'analisi dei risultati si evince che la maggior parte delle evidenze utilizzate come fondamento della pratica clinica derivano da "case series" con numerosità limitata, studi osservazionali o trial clinici non randomizzati per cui non risulta possibile determinare in modo definitivo se una particolare strategia è efficace o superiore ad un'altra.

Gli indicatori di danno neurologico

I marker biologici di lesione del tessuto cerebrale rappresentano uno strumento promettente per l'identificazione dei danni neurologici che si verificano nel corso di interventi di correzione di cardiopatie congenite, e potrebbero in tal senso costituire un presidio importante per prevenire l'insorgenza di ulteriori insulti cerebrali.

Il danno cerebrale, diagnosticato clinicamente o anche solo tramite RM, si verifica nel periodo perioperatorio nel 25-50% dei bambini sottoposti a CEC per interventi correttivi di CHD³⁶ e l'ischemia ne rappresenta probabilmente il meccanismo primario⁴⁴. I metodi utilizzati correntemente nella pratica clinica per diagnosticare il danno cerebrale includono l'esame neurologico, il neuroimaging e i test neurocognitivi che però presentano delle importanti limitazioni pratiche. L'esame neurologico fornisce informazioni limitate nel periodo postoperatorio precoce in cui i bambini sono sedati e le metodiche di neuroimaging, in particolare la RM, necessitano di una certa stabilità clinica per il trasporto del paziente e dell'assenza di dispositivi come il pacemaker che rendono impossibile l'esecuzione dell'esame. Nei neonati e nei lattanti in cui la fontanella anteriore è ancora aperta, è possibile utilizzare l'ecografia transfontanellare che fornisce però anch'essa informazioni limitate. Infine, i test neurocognitivi possono essere eseguiti solo a distanza di mesi dalla chirurgia correttiva e documentano esclusivamente l'estensione e il significato clinico del danno neurologico.

Una diagnosi accurata e tempestiva di ischemia e conseguente danno cerebrale è essenziale per attuare un intervento terapeutico precoce, perciò un prelievo ematico che permetta, mediante il dosaggio di accurati indicatori di danno neurologico, di diagnosticare una condizione di ischemia cerebrale, può essere particolarmente utile.

Proteina gliofibrillare acida

La proteina gliofibrillare acida (GFAP) è la principale proteina dei filamenti intermedi del citoscheletro, specifica degli astrociti maturi. GFAP viene rilasciata nella circolazione ematica in seguito a necrosi cellulare con un'emivita inferiore alle 24 ore⁴⁵.

L'utilizzo di GFAP come marker di danno neurologico acuto presenta molti vantaggi: alta specificità per il tessuto cerebrale, facilità di ottenere campioni per dosaggio a partire da volumi di sangue ridotti, processazione rapida, precisione della quantificazione, costo basso e facilità di dosaggio⁴⁶. GFAP, inoltre, risulta essere maggiormente espressa negli astrociti della sostanza bianca rispetto a quelli della sostanza grigia⁴⁵.

In letteratura ci sono numerose evidenze che GFAP sia predittiva di danno neurologico acuto in diversi contesti clinici (tabella 1).

Tabella 1. GFAP come indicatore di danno neurologico acuto.

Studio	Popolazione studiata	Outcome primario
Nylen et al, 2006⁴⁷	Adulti con trauma cranico severo (n=59)	Disabilità neurologica severa, stato vegetativo o morte
Honda et al, 2010⁴⁸	Adulti con trauma severo (n=34)	Danno cerebrale traumatico
Kaneko et al, 2009⁴⁹	Adulti con arresto cardiaco e ripresa spontanea del circolo (n=44)	Disabilità neurologica severa, stato vegetativo o morte
Bembea et al, 2011⁴⁶	Pazienti pediatrici in ECMO (n=22)	Danno cerebrale (emorragia, edema o morte)
Ennen et al, 2011⁵⁰	Neonati con encefalopatia ipossico-ischemica (n=23) vs controlli (n=25)	Encefalopatia ipossico-ischemica
Papa et al, 2015⁵¹	Pazienti pediatrici con trauma cranico (n=197) e controlli (n=60)	Lesioni cerebrali
McKenney et al, 2016⁵²	Neonati con CHD (n=56) e controlli (sani, n=23, e con encefalopatia ipossico-ischemica, n=23)	Encefalopatia ipossico-ischemica (EII)
Fink et al, 2016⁵³	Pazienti pediatrici con arresto cardiaco (n=19) e controlli (n=43)	Outcome neurologico a 6 mesi

In età pediatrica, il significato di GFAP come marker di danno neurologico acuto è stato valutato in diverse condizioni cliniche, ad esempio nei neonati con encefalopatia ipossico-ischemica⁵⁰ e nei bambini in assistenza ECMO (ExtraCorporeal Membrane Oxygenation)⁴⁶, risultando correlata ad alcuni indicatori di alterato outcome neurologico. Allo stato attuale, invece, pochi studi hanno investigato il ruolo di GFAP e la sua correlazione con l'outcome neurologico nei bambini affetti da CHD.

La CEC è una condizione particolare per il dosaggio di marker biologici, considerato il potenziale effetto di diluizione, ma i livelli di GFAP non risultano influenzati da questi fattori, a differenza di quanto accade per altri marcatori di danno neurologico che hanno una massa inferiore e quindi maggiore probabilità di passaggio attraverso l'emofiltro⁵⁴. Un altro possibile fattore confondente i livelli ematici di GFAP è rappresentato dall'anestesia e dal suo effetto sul sistema nervoso centrale,

ma è stato dimostrato che solo una piccola quota di bambini sottoposti cateterismo diagnostico o terapeutico in anestesia generale presentava un aumento dei valori⁵⁵.

Brunetti et al hanno studiato l'andamento dei valori di GFAP in corso di CEC per intervento cardiocirurgico in bambini con cardiopatia congenita. Gli autori hanno osservato un rapido e significativo incremento dei livelli sierici di GFAP nel corso di tutte le fasi della CEC rispetto al livello basale e il picco massimo alla fine del riscaldamento nella maggior parte dei pazienti. Livelli aumentati di GFAP sono risultati correlati significativamente con diversi parametri operatori tra cui il nadir della temperatura corporea, la maggiore durata del tempo di CEC e di clampaggio aortico quando eseguito. Una correlazione significativa è stata evidenziata anche con la minore età del bambino, forse correlabile alla maggiore vulnerabilità della sostanza bianca in via di maturazione tipica dell'età infantile⁵⁴.

Infine, le misurazioni di GFAP nei primi giorni di vita in neonati sani e neonati con CHD, per valutare l'insorgenza di danno neurologico in epoca perinatale, non sono risultate significativamente diverse anche se si evidenziano valori tendenzialmente più elevati nei neonati affetti da CHD con ostruzione all'efflusso sistemico⁵², dato in linea con studi precedenti in cui si dimostrava che la microcefalia è più comune nei neonati HLHS⁵⁶.

Altri indicatori di danno neurologico

La enolasi neurono-specifica (NSE, Neuron Specific Enolase) è un enzima citoplasmatico coinvolto nella via della glicolisi. Inizialmente si pensava fosse specifica dei neuroni, ma studi successivi hanno dimostrato la sua presenza anche nelle piastrine e nei globuli rossi. Viene rilasciata in circolo solo in caso di massiva necrosi cellulare con un'emivita di circa 24 ore⁵⁷. Diversi studi hanno valutato il significato clinico e prognostico di questo marker in caso di danno cerebrale secondario a trauma cranico o danno ischemico, riportando risultati significativi per quanto riguarda la relazione tra concentrazioni ematiche di NSE, entità dello stroke e outcome neurologico. I tentativi di utilizzare la NSE come biomarker di danno neurologico in bambini sottoposti a intervento cardiocirurgico si sono dimostrati invece infruttuosi, in quando i livelli di NSE non sono risultati correlati allo sviluppo neuropsicologico a distanza⁵⁴.

La S-100b è una proteina legante il calcio che si trova nel tessuto cerebrale a livello intra- ed extra-cellulare, coinvolta in multiple funzioni cellulari, e che viene rilasciata in circolo in caso di danno

cerebrale e/o alterazione dell'integrità della BEE. Viene escreta a livello renale con un'emivita di circa 1-2 ore. S100b è stata riscontrata anche nel tessuto adiposo, muscolare, nel midollo e nel timo oltre che nel tessuto nervoso, rendendo quindi difficile l'interpretazione dell'aumento dei suoi valori in corso di intervento cardiocirurgico a causa del trauma che occorre a tutte queste categorie di tessuti⁵⁷. Sebbene i livelli di S100b siano stati correlati al danno neurologico in corso di intervento cardiocirurgico in età adulta, gli studi condotti in età pediatrica hanno portato a risultati non concludenti⁵⁴.

Materiali e metodi

Partecipanti

Questo è uno studio prospettico osservazionale monocentrico coinvolgente bambini con diagnosi di CHD sottoposti ad intervento cardiocirurgico in elezione tra il 2010 e il 2017 presso il Centro Cardiopatie Congenite e Pediatriche "V. Gallucci" dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera di Padova (protocollo n° 3142/AO/14).

I criteri di inclusione della coorte di partenza erano: durata della CEC superiore ai 60 minuti, utilizzo dell'ipotermia, tempo di clampaggio aortico, quando eseguito, superiore ai 20 minuti, condizioni emodinamiche preoperatorie stabili (definite come presenza di respiro spontaneo prima dell'intervento e pressione sistolica all'interno del 95% del limite di confidenza, con supporto inotropo e volumetrico costanti, almeno fino a 3 ore prima del reclutamento nello studio), acquisizione di consenso informato scritto. I criteri di esclusione comprendevano bambini di età superiore ai 5 anni, presenza di insufficienza epatica e/o renale severa (definite come presenza di valori di Fattore V di Leiden < 20% prima dell'intervento e/o di anuria o clearance della creatinina < 30% prima dell'intervento), anomalie cromosomiche e/o genetiche tipicamente associate a ritardo dello sviluppo psicomotorio o anomalie neurologiche.

Sono stati raccolti prospetticamente numerosi dati demografici, clinici e legati all'intervento chirurgico: peso neonatale, età gestazionale, sesso, peso ed età al momento dell'intervento chirurgico, presenza di cianosi pre-operatoria (definita come $\text{SaO}_2 < 90\%$), durata dell'intervento chirurgico, del periodo di CEC e delle varie fasi dell'intervento, temperatura corporea in corso di CEC (registrazioni ogni 5 minuti), saturazione cerebrale di ossigeno (rSO_2i) in corso di CEC attraverso la metodica NIRS, durata della degenza in terapia intensiva e ospedaliera totale, sopravvivenza.

Tutti i bambini sono stati classificati in base all'anatomia della CHD (classificazione secondo Clancy⁵⁸), alla fisiopatologia della CHD (classificazione secondo Rigby⁵⁹) ed alla categoria STAT^{60,61}, che rappresenta la complessità e il rischio di mortalità legati all'intervento chirurgico.

Al momento della dimissione ospedaliera, tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazione neurologica comprensiva di esame clinico, registrazione elettroencefalografica e risonanza

magnetica encefalica, se clinicamente indicato, per escludere la comparsa di eventuali complicanze neurologiche nel periodo perioperatorio.

Dopo la dimissione, ogni paziente è stato periodicamente valutato dal punto di vista clinico generale e cardiologico.

Tra il 2018 e il 2019, a tutti i bambini, appartenenti alla coorte iniziale, di età compresa tra i 4 e gli 8 anni è stata offerta la possibilità di eseguire una valutazione cognitiva, neuropsicologica e psicopatologica completa. Sono stati esclusi bambini residenti più di 150 km rispetto all'Ospedale di Padova, in quanto la valutazione richiedeva un minimo di due appuntamenti separati, bambini che non parlavano italiano, in quanto lingua di riferimento per la somministrazione dei test, e bambini con comorbidità neurologiche acquisite successivamente all'intervento chirurgico.

Intervento chirurgico, raccolta dei campioni e analisi di GFAP

Dopo l'induzione dell'anestesia, si è proceduto all'intubazione e al posizionamento di un catetere venoso centrale (CVC) il cui apice si collocava in vena cava superiore o atrio destro. Gli interventi chirurgici sono stati condotti in anestesia generale. Previa cannulazione arteriosa e venosa e somministrazione di eparina, veniva avviata la circolazione extracorporea. Un *prime* ematico è stato utilizzato al fine di mantenere un valore di ematocrito tra 25-30% ed evitare una eccessiva diluizione, che rappresenta una potenziale causa di danno neurologico. La temperatura è stata monitorata attraverso una sonda nasofaringea e una rettale. A seconda del tipo di intervento cardiocirurgico, i bambini sono stati sottoposti a vari gradi di ipotermia: lieve (temperatura corporea compresa tra i 35-30.1°C), moderata (30-25.1°C) o profonda (25-15.1°C). In base all'indicazione, si poteva ricorrere all'utilizzo di una cardioplegia ematica, del clampaggio aortico e/o dell'arresto circolatorio in ipotermia profonda. I flussi di sangue da mantenere durante il periodo di CEC sono stati calcolati in base ai valori di superficie corporea, indice cardiaco e temperatura corporea minima raggiunta. Al termine dell'intervento ogni paziente è stato riscaldato e riportato ad una temperatura corporea di 36°C misurata a livello rettale.

Il monitoraggio della saturazione cerebrale di ossigeno (rSO_{2i}) è stato effettuato mediante una sonda posizionata sulla fronte dei pazienti in modo da includere entrambi gli emisferi e il dispositivo INVOS (Somanetics®, Troy, MI) che, utilizzando la tecnologia NIRS, permette la lettura e la registrazione dei valori di saturazione cerebrale. I valori di rSO_{2i} sono stati registrati ogni minuto.

Infine, per il monitoraggio degli altri parametri emogasanalitici e metabolici sono stati effettuati prelievi di sangue arterioso ad intervalli di 20-30 minuti.

I campioni di sangue per il dosaggio di GFAP sono stati raccolti in contenitori da 1.5 mL con EDTA in diverse fasi dell'intervento: dopo l'induzione dell'anestesia (pre-CEC), all'inizio della CEC, alla fine della fase di ipotermia, alla fine della fase di riscaldamento, ed alla fine della CEC prima dell'esecuzione dell'ultrafiltrazione modificata. È stato sistematicamente utilizzato il CVC posto in vena cava superiore per il prelievo dei campioni in modo da analizzare il sangue refluo della circolazione cerebrale.

I campioni di sangue sono stati centrifugati a una velocità di 1400 x g per 10 minuti al fine di separare la componente plasmatica, che è stata suddivisa in aliquote da 150 µL e congelata a una temperatura di -80°C fino al momento dell'analisi. I livelli sierici di GFAP sono stati analizzati mediante metodo ELISA con un kit commerciale, RD192072200R (BioVendor, Brno, Czech Republic). Le misurazioni sono state eseguite in doppio per una maggiore accuratezza⁶².

Valutazione del neurosviluppo

La valutazione del neurosviluppo è stata effettuata da uno Psicologo Infantile, nel corso di due incontri a distanza di alcuni giorni, per una durata complessiva di circa tre ore. L'ambiente in cui sono state eseguite le valutazioni era adeguato e sono state eseguite delle pause ogni volta fosse ritenuto necessario.

I singoli test per la valutazione degli aspetti cognitivi, neuropsicologici e psicopatologici (vedi tabella 2) sono stati scelti in base alle aree di sviluppo che sono risultate essere maggiormente deficitarie nei bambini con CHD di età prescolare e scolare in letteratura^{12,23}. Ogni test deriva da una batteria più ampia standardizzata a livello internazionale e validata su campione italiano. Tutti i test citati sono stati somministrati rispettando i criteri di somministrazione riportati nel manuale di ciascun test.

Per la valutazione delle funzioni cognitive generali sono stati utilizzate la *Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence III* (WPPSI-III)⁶³, per i bambini fino a 6 anni non ancora frequentanti la scuola primaria, o la *Wechsler Intelligence Scale for Children IV* (WISC-IV)⁶⁴, per i bambini che avessero compiuto i 6 anni e avessero iniziato a frequentare la scuola. I risultati di questi test includono una valutazione generale del QI e dei quozienti specifici per la performance verbale, non verbale e per la velocità di processamento.

Per indagare le funzioni neuropsicologiche sono stati somministrati specifici test appartenenti alla batteria NEPSY-II⁶⁵: nello specifico, prove di attenzione visiva e uditiva per l'attenzione, fluency grafica per le funzioni esecutive, memoria di disegni per le funzioni mnesiche, teoria della mente e riconoscimento di emozioni per la percezione sociale. Per valutare il linguaggio del bambino si è deciso di ricorrere ad una batteria dedicata all'esclusivo studio di questa funzione, ovvero la Batteria per la Valutazione del Linguaggio in bambini di età compresa tra i 4 e i 12 anni (BVL 4-12)⁶⁶. Sono stati selezionati i test di comprensione delle espressioni idiomatiche e comprensione della prosodia emotiva per valutare la comprensione linguistica; per valutare la produzione espressiva è stato somministrato il test di fluency semantica. A completamento, la prova di denominazione su presentazione visiva è stata ricavata dalla Batteria per la valutazione neuropsicologica in età evolutiva (BVN 5-11)⁶⁷.

Il profilo psicopatologico di ciascun bambino è stato indagato attraverso un'intervista approfondita con i genitori, comprendente la raccolta di informazioni anamnestiche generali, risultati scolastici e sviluppo psicomotorio, oltre alla compilazione di due questionari. Il questionario CBCL⁶⁸ (*Child Behaviour Checklist*, nelle versioni 1 ½ -5 o 6-18, per i bambini in età prescolare o scolare rispettivamente) si basa su un approccio multi-assiale su base empirica per la valutazione delle competenze sociali e dei problemi di natura emotiva e comportamentale nei bambini e negli adolescenti. La versione per i genitori utilizzata nel presente studio comprende 113 affermazioni la cui risposta chiusa viene scelta tra tre opzioni (non vero, qualche volta vero, spesso vero), che al termine forniscono un quadro generale delle problematiche del bambino, inquadrandole nell'ambito dei disturbi internalizzanti o esternalizzanti e in diversi quadri sindromici, specifici in base all'età. Il questionario CPRS-R:L⁶⁹ consta invece di 80 affermazioni riguardanti problematiche in sette aree psicopatologiche (comportamenti oppositivi, disattenzione, iperattività, ansia-timidezza, perfezionismo, problematiche sociali e disturbi psicosomatici), a cui è possibile rispondere scegliendo una fra quattro opzioni (non vero, in parte vero, abbastanza vero, molto vero). Esso è stato pensato per valutare la presenza di comportamenti che tipicamente si riscontrano in individui in cui è stata formulata la diagnosi di ADHD e/o disturbi del comportamento che si trovano in frequente comorbidità con ADHD.

Tabella 2. Test utilizzati per la valutazione del neurosviluppo.

Aspetto valutato	Batteria	Test selezionati
Valutazione cognitiva e QI		

Età <6 anni	WPPSI-III	Tutti i subtest
Età >6 anni	WISC-IV	
Valutazione neuropsicologica		
Attenzione	NEPSY-II	Attenzione visiva Attenzione uditiva
Funzioni esecutive	NEPSY-II	Fluenza grafica
Percezione sociale	NEPSY-II	Teoria della mente Riconoscimento di emozioni
Linguaggio		
Comprensione linguistica	BVL 4-12	Comprensione di espressioni idiomatiche Comprensione della prosodia emotiva
Produzione espressiva	BVL 4-12 BVN 5-11	Fluenza semantica Denominazione su presentazione visiva
Questionari ai genitori		
Problemi emotivi, comportamentali e sociali	CBCL	Tutti i subtest
ADHD e valutazione dei disordini del comportamento	CPRS-RL	Tutti i subtest

Analisi statistica

I dati riguardanti le caratteristiche dei pazienti e i livelli intraoperatori di GFAP sono stati espressi come media e deviazione standard (DS) o come mediana e range interquartile (RIQ) a seconda della distribuzione delle variabili. I risultati grezzi dei test e questionari neuropsicologici sono stati corretti in base all'età e convertiti in quozienti (test cognitivi), z score o punteggi scalari (test neuropsicologici) o T score (questionari psicopatologici), in base alle indicazioni dei singoli manuali. Gli esiti delle valutazioni delle diverse funzioni sono stati sintetizzati in un indice finale, chiamato indice di neurosviluppo (NDI), che è stato considerato alterato in caso di: QI <85, punteggio <2 DS in almeno due ambiti neuropsicologici e/o punteggio patologico (> 65 T score) ai questionari psicopatologici.

È stato utilizzato un intervallo di confidenza al 95% e la significatività statistica è stata posta con valori di $p < 0.05$. L'analisi di regressione logistica multipla è stata applicata per identificare possibili fattori di rischio indipendenti di un indice di neurosviluppo alterato. Le variabili considerate per il modello di regressione sono state l'età all'intervento, la categoria Clancy, Rigby o STAT, la durata

della CEC, la minima temperatura corporea raggiunta in corso di CEC, la durata dell'ipotermia, e la presenza di un valore plasmatico di GFAP >0.44 ng/mL. Le variabili sono state testate utilizzando tre variabili per ogni singolo modello di regressione.

Il software utilizzato per le analisi statistiche è stato SPSS 25.0 (IBM Corp, Armonk, NY).

Risultati

Caratteristiche anatomiche, cliniche e chirurgiche

Sono stati arruolati 38 pazienti nel periodo da maggio 2018 a dicembre 2019 e ognuno presentava alla nascita parametri antropometrici (peso, lunghezza e circonferenza cranica) adeguati all'età gestazionale, senza eventi di rilievo in epoca perinatale.

Prima dell'intervento cardiocirurgico, 5 (13%) pazienti con diagnosi di TGA sono stati sottoposti alla procedura di atriosettostomia secondo Rashkind e 10 pazienti (26%) hanno ricevuto infusione endovenosa di prostaglandine per il mantenimento del dotto arterioso di Botallo (4 con HLHS; 3 con fisiologia a ventricolo singolo, SV; 3 con TGA).

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad intervento cardiocirurgico in elezione con l'utilizzo della CEC tra il 2010 e il 2017 e nessuno di questi ha necessitato di ventilazione a pressione positiva o supporto inotropo preoperatori. Nel 63% dei casi è stato eseguito un unico intervento cardiocirurgico e in 11 casi di CHD con fisiologia a ventricolo singolo sono state eseguite procedure palliative (3 interventi di Norwood, 4 interventi di shunt cavopolmonare bidirezionale e 4 procedure di Fontan).

Circa un terzo dei pazienti (n=12) ha presentato almeno una complicanza significativa nell'immediato periodo postoperatorio, come ad esempio versamento pleurico e/o pericardico, aritmie, eventi trombotici (trombosi di vasi arteriosi polmonari o femorali che hanno richiesto un intervento chirurgico), o necessità di re-intervento in due casi.

Le CHD riscontrate più frequentemente sono state la TGA (n=7) e la fisiologia a ventricolo singolo (SV; n=7), seguite da TOF (n=6), HLHS (n=5), dal difetto del setto interventricolare (VSD; n=5) e dal canale atrioventricolare parziale (pAVSD; n=4). I rimanenti erano 1 caso di cor triatriatum, 1 di interruzione dell'arco aortico, 1 di tronco arterioso e 1 di tunnel tra ventricolo sinistro e aorta.

Maggiori dettagli riguardanti le caratteristiche cliniche e relative all'intervento cardiocirurgico sono presenti nella tabella 3.

Tabella 3. Caratteristiche cliniche e chirurgiche della popolazione.

Caratteristica	Numero	Media \pm DS	Mediana (RIQ)
Sesso (F/M)	16/22		
Età Gestazionale (sett)		37.9 \pm 3.2	38.0 (38.0-40.0)
Termine/Pretermine (EG <37 sett)	31/6 (1 NA)		
Peso neonatale (gr)		3058 \pm 648	3228 (2798-3468)
Circonferenza cranica (cm)		33.7 \pm 1.7	34.0 (34.0-34.5)
Percentile (%)		47 \pm 25	43 (34-61)
Apgar 1 minuto		8.4 \pm 0.7	9.0 (8.0-9.0)
Apgar 5 minuti		9.2 \pm 0.7	9.0 (9.0-10.0)
SaO2 (%)		89.2 \pm 8.6	88.5 (85.0-98.0)
Età all'intervento (mesi)		14.9 \pm 20.2	4.0 (0.0-23.8)
<1 mese (n, %)	12 (31.6%)		
1-12 mesi (n, %)	14 (36.8%)		
>12 mesi (n, %)	12 (31.6%)		
Peso all'intervento (kg)		7.6 \pm 4.9	5.8 (3.5-11.9)
Durata (minuti)			
Intervento		249 \pm 71	248 (196-281)
CEC		123 \pm 49	120 (87-152)
Clampaggio aortico (n=30)		62 \pm 26	63 (41-79)
Arresto cardiocircolatorio (n=4)		26 \pm 27	24 (3-46)
Tempo di ipotermia		75 \pm 34	70 (50-90)
Tempo di riscaldamento		33 \pm 21	30 (20-40)
Minima temperatura corporea (°C)		30.2 \pm 3.9	32.0 (28.0-32.7)
rSO ₂ i in corso di CEC (%)		55.9 \pm 10.4	56 (48-60)

rSO ₂ i <45% in corso di CEC (%)	19.6 ± 27.5	10 (0-20)
Intubazione (ore)	13 ± 267	50 (26-90)
Durata del ricovero (giorni)		
Terapia intensiva	7 ± 13	4 (2-5)
Totale	15 ± 18	12 (7-14)

Le varie tipologie di CHD sono state classificate dal punto di vista anatomico in base alla presenza di uno o due ventricoli e alla presenza o meno di ostruzione dell'arco aortico (classificazione secondo Clancy⁵⁸), dal punto di vista fisiopatologico in base all'aumento o riduzione del flusso ematico polmonare e delle pressione venosa polmonare (classificazione secondo Rigby⁵⁹), e infine in base alla difficoltà e al rischio di mortalità legati alla procedura chirurgica di correzione o palliazione (classificazione STAT^{60,61}). La suddivisione nelle varie categorie è presentata nella tabella 4.

Tabella 4. Classificazione dei soggetti. Rigby: 1 iperafflusso polmonare, 2 ipoafflusso polmonare, 3 aumento pressione vene polmonari.

Classificazione	N (%)	Classificazione	N (%)	Classificazione	N (%)
Clancy		Rigby		STAT	
1	25 (66%)	1	19 (50%)	1	5 (13%)
2	2 (5%)	2	8 (21%)	2	15 (40%)
3	4 (11%)	3	11 (29%)	3	7 (18%)
4	7 (18%)			4	8 (21%)
				5	3 (8%)

Analisi dei livelli di GFAP intraoperatorio e dell'outcome di neurosviluppo

Per ogni paziente è stato considerato il valore maggiore di GFAP registrato nelle diverse fasi dell'intervento e denominato valore picco di GFAP.

Il valore medio di GFAP picco è stato 1.42 ± 1.69 ng/mL, con valore mediano di 0.95 ng/mL (0.44-1.57). La maggior parte dei pazienti (n=27, 70%) ha mostrato valori di GFAP picco superiori a 0.44 ng/mL, valore considerato patologico in base a precedenti lavori in letteratura⁷⁰. L'andamento dei

valori di GFAP nelle diverse fasi dell'intervento è presentato nella figura 5. Il valore picco è stato raggiunto al termine dell'ipotermia in 8 pazienti (21%), alla fine del riscaldamento in 10 pazienti (26%) e nella maggior parte dei casi al termine dell'intervento (n=18, 47%). Nella fase preoperatoria, GFAP è risultato inferiore al limite minimo rilevabile nel 79% dei pazienti; nei casi restanti, 4 pazienti avevano valori di GFAP <0.1 ng/mL e 4 pazienti, tutti con CHD a fisiologia a ventricolo unico, presentavano valori nell'intervallo 0.1-0.2 ng/mL.

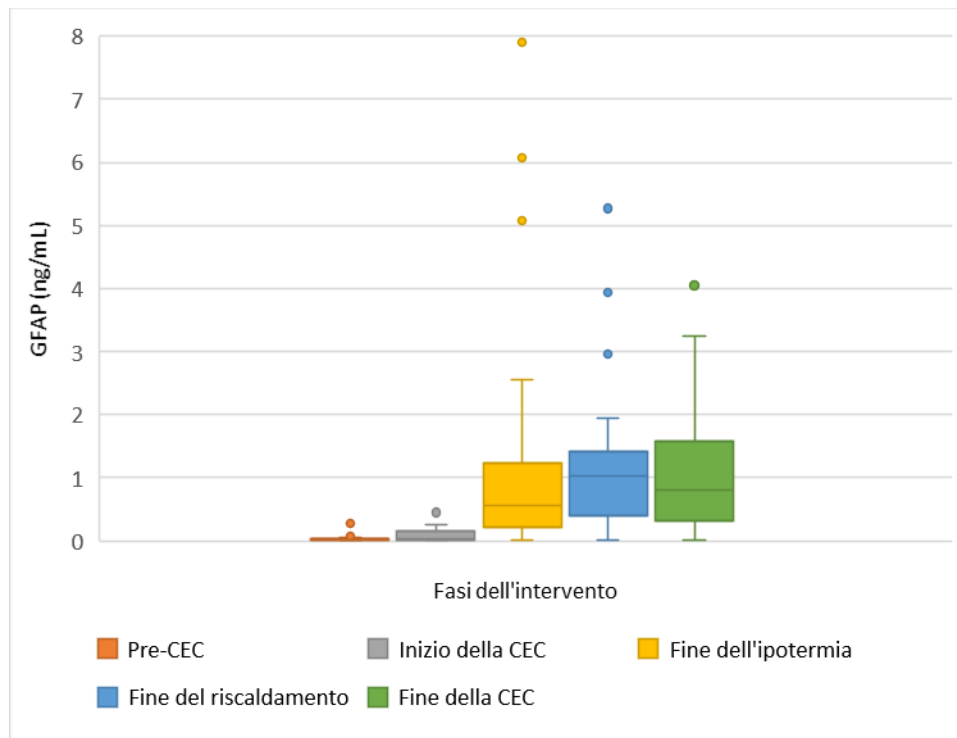


Figura 5. Andamento dei valori di GFAP picco in corso di intervento.

La valutazione complessiva del neurosviluppo è stata eseguita ad un'età media di 6.5 ± 2.0 anni ad una distanza media di 5.7 ± 2.2 anni dall'intervento cardiocirurgico. Il 31% dei pazienti è stato valutato in età prescolare.

La valutazione cognitiva ha evidenziato un QI totale nella media (99.7 ± 16.7), con il 13% dei bambini che ha presentato valori clinicamente borderline, compresi tra 70 e 84, e riscontro in un solo caso di deficit intellettivo (QI <70). L'analisi dei pazienti che ha presentato valori al di sotto della media nelle singole sottocategorie è presentata nella tabella 5: l'area maggiormente colpita è risultata essere quella relativa ai disturbi psicopatologici.

Nel complesso, l'analisi dei risultati delle singole aree ha mostrato che 22 pazienti (57.9%) hanno presentato un indice di neurosviluppo alterato, secondo i criteri illustrati nella sezione dei metodi.

Tabella 5. Valutazione del neurosviluppo.

Valutazione del neurosviluppo	
NDI alterato: n (%)	22 (57.9%)
QI totale: m ± DS	99.7 ± 16.7
Casi patologici: n (%)	
QI	6 (15.8%)
Linguaggio	1 (2.6%)
Attenzione	14 (36.8%)
Funzioni esecutive	2 (5.3%)
Abilità sociali	13 (34.2%)
Ambito psicopatologico	17 (44.7%)

Il valore medio di picco di GFAP è risultato essere significativamente più elevato nei pazienti con NDI alterato al follow-up rispetto ai pazienti con NDI nella norma (1.94 ± 2.02 ng/mL vs. 0.71 ± 0.62 ng/mL, $p=0.01$; t-test per variabili indipendenti). Il valore di picco di GFAP patologico (i.e. >0.44 ng/mL) ha mostrato una sensibilità del 90.9% e una specificità del 56.3% nell'identificare un NDI alterato, con valore predittivo positivo e negativo rispettivamente di 74.1% e 81.8%.

Analisi dei sottogruppi

Sono stati eseguiti confronti di numerose variabili cliniche, chirurgiche e dei valori di GFAP intraoperatorio tra i pazienti raggruppati secondo diverse modalità al fine di identificare possibili fattori di rischio per anomalie del neurosviluppo (tabella 4).

I pazienti appartenenti al Gruppo 1 della classificazione secondo Clancy⁵⁸ presentano CHD caratterizzate dal punto di vista anatomico da due ventricoli in assenza di ostruzione aortica e nel nostro campione sono risultati essere i più numerosi ($n=25$). In tutti i pazienti appartenenti a questo sottogruppo e con cianosi preoperatoria (SaO_2 $87.6\% \pm 6.5$) il valore di picco di GFAP è risultato patologico, mentre tale valore è stato evidenziato solo nel 55% dei pazienti del Gruppo 1 senza cianosi preoperatoria (SaO_2 $95.7\% \pm 7.1$) ($p=0.009$). Un NDI alterato è stato evidenziato nel 64% e 83% dei pazienti con GFAP patologico appartenenti ai due sottogruppi, rispettivamente ($p=0.44$). Di conseguenza, il valore di picco di GFAP patologico si è dimostrato essere un forte

indicatore di NDI alterato nel sottogruppo di pazienti senza cianosi preoperatoria appartenenti a questa classe anatomica. Negli altri tre gruppi della classificazione secondo Clancy, meno rappresentati nel nostro campione, un valore di picco di GFAP patologico è stato riscontrato solo in concomitanza con ostruzione dell'arco aortico (gruppo 2 e 4).

La distribuzione dei pazienti con valore di picco patologico di GFAP e con NDI alterato è risultata omogenea nella suddivisione in base alla classificazione secondo Rigby⁵⁹, come evidenziato in tabella 6.

Tabella 6. Distribuzione GFAP patologico e NDI alterato nei soggetti classificati su base emodinamica.

Gruppo Rigby	N° di pazienti (%)	GFAP >0.44 ng/mL: n (%)	NDI alterato (%)
1	19 (50%)	14 (73.7%)	11 (57.9%)
2	8 (21%)	6 (75%)	5 (62.5%)
3	11 (29%)	7 (63.6%)	6 (54.5%)

La suddivisione dei pazienti secondo la classificazione STAT^{60,61} in base al tasso di mortalità associato (</> 2%) ha permesso di evidenziare che il 55% dei pazienti appartenenti alla categoria 1-2 ha avuto valori patologici di picco di GFAP, a differenza dell'89% dei pazienti appartenenti alle categorie 3-4-5 (p=0.03). La percentuale di pazienti con NDI alterato e GFAP patologico non si è dimostrata significativamente diversa nei due sottogruppi (73% vs 75% rispettivamente) (p=1.00).

Analisi di correlazione e regressione

Il valore di picco di GFAP è risultato essere correlato inversamente in modo significativo al grado di ipotermia utilizzato in corso di intervento ($R_s = -0.56$, $p < 0.001$) ed al valore di rO₂ registrato tra il termine della CEC e il termine dell'intervento ($R_s = -0.43$, $p = 0.01$). Inoltre, è stata evidenziata una correlazione diretta significativa tra il valore di picco di GFAP e la durata delle fasi di ipotermia e di riscaldamento ($R_s = 0.41$, $p = 0.02$ e $R_s = 0.41$, $p = 0.02$ rispettivamente).

L'analisi di regressione logistica multipla ha dimostrato che il valore patologico di picco di GFAP è, nel nostro campione, l'unico predittore indipendente di NDI alterato (B=2.5; OI 12.5; CI 1.1-74.5; p=0.04). Tra le diverse variabili testate, le altre due che hanno mostrato una tendenza alla significatività sono risultate essere il grado di ipotermia (B=-0.54; OI=0.59; CI=0.34-1.02; p=0.06) e la durata dell'ipotermia (B=0.97; OI=0.97; CI=0.93-1.01; p=0.09).

Discussione

In questo studio prospettico osservazionale, i dati raccolti confermano che il rilascio di GFAP nel torrente ematico è aumentato nei bambini con CHD sottoposti a intervento cardiocirurgico con l'utilizzo della CEC e dimostrano che i valori di GFAP sono significativamente più elevati nei bambini che mostreranno alterato neurosviluppo a distanza. Nello specifico, livelli circolanti di GFAP >0.44 ng/mL⁷⁰ in corso di intervento si sono dimostrati essere un marker significativo di danno neurologico acuto, in quanto associati con un indice di alterato outcome di neurosviluppo in bambini di età 4-8 anni, anche in presenza di normali livelli di QI.

GFAP è una proteina intracellulare dei filamenti intermedi degli astrociti, altamente specifica, assente in circolo in condizioni di normalità e benessere⁴⁵, ed è stata recentemente riconosciuta da parte della FDA ("Food and Drug Administration", ente governativo statunitense per la regolamentazione dei farmaci) come test ematico utilizzabile per la diagnosi di danno cerebrale acuto nei pazienti adulti con trauma cranico minore⁷¹. L'aumentato livello ematico di GFAP è secondario alla morte cellulare, ma può riflettere anche un danno della BEE, in quanto i processi periferici degli astrociti ne costituiscono lo strato interno sub-endoteliale.

Abbiamo precedentemente dimostrato che in corso di intervento cardiocirurgico GFAP non è rilevabile al momento dell'induzione dell'anestesia nella maggior parte dei bambini, ma che i suoi livelli plasmatici aumentano subito dopo l'avvio della CEC per raggiungere i valori massimi o al termine della fase di riscaldamento o allo svezzamento dalla CEC^{72,73}, come ulteriormente confermato dai risultati attuali.

L'aumento dei valori plasmatici di GFAP è stato associato a diversi gradi di disabilità neurologica o outcome neuropsicologico anormale in vari contesti clinici in età pediatrica. Ad esempio, Bembea et al⁴⁶ hanno valutato 22 bambini posti per varie indicazioni in assistenza ECMO e hanno evidenziato che i valori di GFAP aumentano significativamente nei pazienti con diagnosi di danno neurologico acuto in corso di ECMO (ad esempio emorragia intracranica, edema cerebrale severo e morte cerebrale), nei pazienti con scarso outcome neurologico a distanza e nei deceduti e che il rischio di presentare uno di questi outcome negativi aumenta esponenzialmente con valori di GFAP > 0.44 ng/mL. Risultati analoghi sono stati ottenuti da Papa et al⁵¹ in un gruppo di bambini con trauma cranico, in cui i valori di GFAP correlavano direttamente con la presenza e la severità

del danno neurologico evidenziato anche alla TC cerebrale. Infine, il ruolo di GFAP come indicatore di danno neurologico è stato studiato anche nei neonati con encefalopatia ipossico-ischemica⁵⁰, la cui fisiopatologia presenta alcuni punti in comune con le cardiopatie congenite: GFAP aumenta significativamente nei neonati affetti rispetto ai controlli sani e valori ancora più elevati si rilevano nel sottogruppo di neonati affetti con lesioni in RM rispetto a quelli con imaging normale. Uno degli aspetti più interessanti di tale studio è che il 17,4% dei pazienti presentava bruschi aumenti di GFAP il giorno successivo l'inizio del riscaldamento, in analogia con quanto descritto nella popolazione CHD.

Nei bambini con CHD, aumentati livelli di GFAP in corso di intervento cardiocirurgico hanno dimostrato di essere predittori significativi di disabilità neurologica in diverse fasce di età. In uno studio precedente⁷³, abbiamo dimostrato come un maggiore valore picco di GFAP sia un fattore di rischio per la riduzione delle capacità comunicative in età prescolare, valutate attraverso la scala "Vineland Adaptive Behavior Scale". Più recentemente, valori aumentati di GFAP in corso di intervento cardiocirurgico in epoca neonatale sono risultati associati ad un alterato outcome delle funzioni motorie a 12 mesi di età⁷⁴. Lo studio attuale, invece, analizza in modo più profondo e completo il neurosviluppo comprendendo aspetti cognitivi, comportamentali e neuropsicologici oltre che la valutazione dell'ambito comunicativo e motorio, e si concentra su una fascia di età in cui la prevalenza di disabilità è generalmente maggiore⁹.

I dati raccolti hanno evidenziato, come già noto in letteratura, che i livelli plasmatici di GFAP sono assenti o inferiori alla soglia di patologia all'inizio dell'intervento, aumentano in modo significativo al termine dell'ipotermia in corso di CEC per poi diminuire o rimanere stabili fino al termine dell'intervento suggerendo che il rilascio di GFAP possa essere associato alle fasi acute di modifica della temperatura cerebrale. Questa ipotesi è supportata da altri studi in cui l'utilizzo di diversi gradi di ipotermia è stato associato ad aumentati livelli di GFAP e citotossicità neuronale: in particolare, la fase di riscaldamento, in cui si registrano i cambi di temperatura corporea più rapidi, risulta essere quella maggiormente a rischio per un aumentato rilascio in circolo di GFAP, come segno di danno neurologico acuto^{54,62,75}. Modelli animali hanno, poi, dimostrato come gradi più lievi di ipotermia siano protettivi a livello cerebrale rispetto a gradi più profondi, in quanto la differenza termica risulta inferiore⁷⁶. Lo studio attuale conferma questi aspetti se si considerano le associazioni significative evidenziate con il valore picco di GFAP: in particolare, la correlazione

inversa con il grado di ipotermia e diretta con la durata delle fasi di ipotermia e riscaldamento, a dimostrare come il raggiungimento di valori inferiori di temperatura corporea, e quindi cerebrale, comporti un aumentato rischio di danno neuronale.

La prevalenza e la severità delle alterazioni del neurosviluppo aumentano con la complessità della CHD sottostante^{8,9,12,77}. Diversi e numerosi fattori possono contribuire al neurosviluppo in bambini con CHD nelle diverse fasce di età, e solo una parte di essi sono modificabili. Tra i più rilevanti segnaliamo le caratteristiche intrinseche della CHD come il grado di cianosi e la presenza o meno di ostruzione dell'arco aortico, fattori propri dell'individuo come l'eventuale presenza di sindromi genetiche o cromosomiche e di comorbidità che si associano indipendentemente ad alterato outcome neurologico, il grado di maturità cerebrale, la possibilità di andare incontro a eventi ipossico-ischemici nel periodo peri-natale o perioperatorio, fino a fattori ambientali, familiari e socioeconomici. Per ridurre al minimo l'influenza di possibili bias, abbiamo selezionato accuratamente i partecipanti allo studio in modo da includere solo bambini senza complicanze nel periodo preoperatorio, sottoposti a interventi in elezione e non in urgenza e senza segni di scompenso emodinamico. In questo modo, abbiamo cercato di focalizzare l'attenzione sulle fasi intraoperatorie più critiche che potrebbero contribuire ad un alterato outcome di neurosviluppo in età infantile. La maggior parte dei bambini (84%), inoltre, è stata arruolata nel corso del primo intervento, e solamente 8 di loro sono stati sottoposti ad interventi successivi.

Per spiegare il contributo di specifici fattori di rischio, abbiamo condotto analisi successive suddividendo l'intera coorte in base allo stato emodinamico della CHD di base, all'anatomia cardiaca e al tipo di intervento chirurgico, al fine di confrontare la distribuzione nei diversi sottogruppi dei valori di GFAP in relazione all'outcome neurologico (NDI normale /alterato). Lo stato emodinamico della CHD non ha un'influenza significativa sull'outcome neurologico. La presenza di ostruzione dell'arco aortico, che caratterizza i gruppi II e IV secondo Clancy⁵⁸ ed è un segno di maggiore severità della CHD di base, ha un impatto rilevante sui valori di GFAP e di NDI, dato che potrebbe suggerire come l'alterato flusso ematico cerebrale in corso di vita fetale possa influenzare lo sviluppo cerebrale^{33,78}. Nella nostra coorte, GFAP si è dimostrato essere un buon indicatore di alterato NDI anche nelle forme più lievi di CHD, come le forme senza cianosi preoperatoria del gruppo I secondo Clancy (ad esempio, difetto interventricolare e canale

atrioventricolare parziale) o le tipologie di CHD appartenenti alle categorie STAT 1 e 2. Solo due soggetti appartenenti a quest'ultimo raggruppamento hanno raggiunto un NDI alterato con bassi valori di GFAP: questo dato, in contrasto con i risultati principali, potrebbe essere secondario al fatto che sono gli unici due soggetti nell'intera coorte con diagnosi di sindrome eterotassica, patologia che comprende multiple malformazioni congenite.

Infine, l'analisi di regressione logistica ha mostrato come valori di picco di GFAP patologici (i.e. >0.44 ng/mL) sono risultati essere l'unico predittore indipendente di NDI alterato. Né l'età all'intervento, la categoria STAT di appartenenza o la saturazione cerebrale di ossigeno, sia considerata come media totale sia come media delle singole fasi della CEC, sono risultati associati ad un alterato outcome. La lunghezza e il grado dell'ipotermia, invece, hanno mostrato una tendenza verso la significatività statistica in corso di regressione.

I risultati di questo studio vanno valutati nell'ottica di alcuni limiti. In primis, la ridotta numerosità campionaria potrebbe non aver permesso di evidenziare dei risultati significativi. Inoltre, la coorte risulta essere discretamente eterogenea sia per quanto riguarda l'età al momento dell'arruolamento sia per la variabilità delle diagnosi di CHD, in termini di severità e relativo rischio di mortalità e morbilità.

I punti di forza di questo studio includono la profondità e completezza della valutazione neurologica e neuropsicologica attuata che hanno permesso di stilare un profilo completo dello stato di neurosviluppo di ogni singolo partecipante. Inoltre, l'arruolamento da un singolo centro ha permesso di eliminare possibili fattori confondenti riguardo la gestione chirurgica e anestesologica.

Conclusioni

In conclusione, GFAP risulta essere un marker affidabile di danno neurologico acuto in corso di intervento cardiocirurgico con l'utilizzo della CEC in bambini affetti da CHD ed un indicatore promettente di alterato neurosviluppo a distanza, soprattutto in specifiche categorie di pazienti.

Le fasi della CEC caratterizzate dai maggiori cambi di temperatura corporea sono quelle a maggior rischio per lo sviluppo di danno cerebrale e per il rilascio in circolo di GFAP.

Saranno necessarie ulteriori e più approfondite valutazioni al fine di migliorare le tecniche di neuroprotezione utilizzabili in corso di intervento.

Bibliografia

1. Bouma BJ, Mulder BJM. Changing Landscape of Congenital Heart Disease. *Circ Res*. 2017;120(6):908-922. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309302
2. Thiene G, Frescura C. Anatomical and pathophysiological classification of congenital heart disease. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol*. 2010;19(5):259-274. doi:10.1016/j.carpath.2010.02.006
3. Dolk H, Loane M, Garne E, European Surveillance of Congenital Anomalies (EUROCAT) Working Group. Congenital heart defects in Europe: prevalence and perinatal mortality, 2000 to 2005. *Circulation*. 2011;123(8):841-849. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.958405
4. Nelson Textbook of Pediatrics Elsevier eBook on VitalSource, 20th Edition - 9780323428446. Accessed October 28, 2020. <https://evolve.elsevier.com/cs/product/9780323428446?role=student>
5. Hoffman JIE, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(12):1890-1900. doi:10.1016/s0735-1097(02)01886-7
6. Khairy P, Ionescu-Ittu R, Mackie AS, Abrahamowicz M, Pilote L, Marelli AJ. Changing mortality in congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(14):1149-1157. doi:10.1016/j.jacc.2010.03.085
7. van der Linde D, Konings EEM, Slager MA, et al. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(21):2241-2247. doi:10.1016/j.jacc.2011.08.025
8. Marelli A, Miller SP, Marino BS, Jefferson AL, Newburger JW. Brain in Congenital Heart Disease Across the Lifespan: The Cumulative Burden of Injury. *Circulation*. 2016;133(20):1951-1962. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.019881
9. Morton PD, Ishibashi N, Jonas RA. Neurodevelopmental Abnormalities and Congenital Heart Disease: Insights Into Altered Brain Maturation. *Circ Res*. 2017;120(6):960-977. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309048
10. Daly RC, Dearani JA, McGregor CGA, et al. Fifty years of open heart surgery at the Mayo Clinic. *Mayo Clin Proc*. 2005;80(5):636-640. doi:10.4065/80.5.636
11. Whiting D, Yuki K, DiNardo JA. Cardiopulmonary bypass in the pediatric population. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2015;29(2):241-256. doi:10.1016/j.bpa.2015.03.006
12. Marino BS, Lipkin PH, Newburger JW, et al. Neurodevelopmental outcomes in children with congenital heart disease: evaluation and management: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2012;126(9):1143-1172. doi:10.1161/CIR.0b013e318265ee8a
13. Bellinger DC, Wypij D, Rivkin MJ, et al. Adolescents with d-transposition of the great arteries corrected with the arterial switch procedure: neuropsychological assessment and structural brain imaging. *Circulation*. 2011;124(12):1361-1369. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.026963
14. Bellinger DC, Rivkin MJ, DeMaso D, et al. Adolescents with tetralogy of Fallot: neuropsychological assessment and structural brain imaging. *Cardiol Young*. 2015;25(2):338-347. doi:10.1017/S1047951114000031
15. Massaro AN, El-Dib M, Glass P, Aly H. Factors associated with adverse neurodevelopmental outcomes in infants with congenital heart disease. *Brain Dev*. 2008;30(7):437-446. doi:10.1016/j.braindev.2007.12.013

16. Miller SP, McQuillen PS, Hamrick S, et al. Abnormal brain development in newborns with congenital heart disease. *N Engl J Med*. 2007;357(19):1928-1938. doi:10.1056/NEJMoa067393
17. Wernovsky G. Current insights regarding neurological and developmental abnormalities in children and young adults with complex congenital cardiac disease. *Cardiol Young*. 2006;16 Suppl 1:92-104. doi:10.1017/S1047951105002398
18. Donofrio MT, Massaro AN. Impact of congenital heart disease on brain development and neurodevelopmental outcome. *Int J Pediatr*. 2010;2010. doi:10.1155/2010/359390
19. McCusker C, Casey F. *Congenital Heart Disease and Neurodevelopment*. Elsevier; 2016. doi:10.1016/C2014-0-00499-6
20. Newburger JW, Jonas RA, Wernovsky G, et al. A comparison of the perioperative neurologic effects of hypothermic circulatory arrest versus low-flow cardiopulmonary bypass in infant heart surgery. *N Engl J Med*. 1993;329(15):1057-1064. doi:10.1056/NEJM199310073291501
21. Licht DJ. The path forward is to look backward in time: fetal physiology: the new frontier in managing infants with congenital heart defects. *Circulation*. 2015;131(15):1307-1309. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016024
22. Gaynor JW, Stopp C, Wypij D, et al. Neurodevelopmental outcomes after cardiac surgery in infancy. *Pediatrics*. 2015;135(5):816-825. doi:10.1542/peds.2014-3825
23. Bellinger D, Newburger J. Neuropsychological, psychosocial, and quality-of-life outcomes in children and adolescents with congenital heart disease. *Prog Pediatr Cardiol*. 2010;29:87–92. doi:10.1016/j.ppedcard.2010.06.007
24. Sarrechia I, Miatton M, François K, et al. Neurodevelopmental outcome after surgery for acyanotic congenital heart disease. *Res Dev Disabil*. 2015;45-46:58-68. doi:10.1016/j.ridd.2015.07.004
25. Kasmi L, Bonnet D, Montreuil M, et al. Neuropsychological and Psychiatric Outcomes in Dextro-Transposition of the Great Arteries across the Lifespan: A State-of-the-Art Review. *Front Pediatr*. 2017;5:59. doi:10.3389/fped.2017.00059
26. Andropoulos DB, Ahmad HB, Haq T, et al. The association between brain injury, perioperative anesthetic exposure, and 12-month neurodevelopmental outcomes after neonatal cardiac surgery: a retrospective cohort study. *Paediatr Anaesth*. 2014;24(3):266-274. doi:10.1111/pan.12350
27. Limperopoulos C, Majnemer A, Shevell MI, et al. Predictors of developmental disabilities after open heart surgery in young children with congenital heart defects. *J Pediatr*. 2002;141(1):51-58. doi:10.1067/mpd.2002.125227
28. Calderon J, Bellinger DC. Executive function deficits in congenital heart disease: why is intervention important? *Cardiol Young*. 2015;25(7):1238-1246. doi:10.1017/S1047951115001134
29. Majnemer A, Limperopoulos C, Shevell M, Rohlicek C, Rosenblatt B, Tchervenkov C. Developmental and functional outcomes at school entry in children with congenital heart defects. *J Pediatr*. 2008;153(1):55-60. doi:10.1016/j.jpeds.2007.12.019
30. Bellinger DC, Wypij D, Kuban KC, et al. Developmental and neurological status of children at 4 years of age after heart surgery with hypothermic circulatory arrest or low-flow cardiopulmonary bypass. *Circulation*. 1999;100(5):526-532. doi:10.1161/01.cir.100.5.526

31. Rosenthal GL. Patterns of prenatal growth among infants with cardiovascular malformations: possible fetal hemodynamic effects. *Am J Epidemiol.* 1996;143(5):505-513. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a008771
32. Donofrio MT, Bremer YA, Schieken RM, et al. Autoregulation of cerebral blood flow in fetuses with congenital heart disease: the brain sparing effect. *Pediatr Cardiol.* 2003;24(5):436-443. doi:10.1007/s00246-002-0404-0
33. Sun L, Macgowan CK, Sled JG, et al. Reduced fetal cerebral oxygen consumption is associated with smaller brain size in fetuses with congenital heart disease. *Circulation.* 2015;131(15):1313-1323. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013051
34. Limperopoulos C, Tworetzky W, McElhinney DB, et al. Brain volume and metabolism in fetuses with congenital heart disease: evaluation with quantitative magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Circulation.* 2010;121(1):26-33. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.865568
35. Licht DJ, Shera DM, Clancy RR, et al. Brain maturation is delayed in infants with complex congenital heart defects. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;137(3):529-536; discussion 536-537. doi:10.1016/j.jtcvs.2008.10.025
36. Beca J, Gunn JK, Coleman L, et al. New white matter brain injury after infant heart surgery is associated with diagnostic group and the use of circulatory arrest. *Circulation.* 2013;127(9):971-979. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001089
37. Dimitropoulos A, McQuillen PS, Sethi V, et al. Brain injury and development in newborns with critical congenital heart disease. *Neurology.* 2013;81(3):241-248. doi:10.1212/WNL.0b013e31829bfdcf
38. Carrascal Y, Guerrero AL. Neurological damage related to cardiac surgery: pathophysiology, diagnostic tools and prevention strategies. Using actual knowledge for planning the future. *The Neurologist.* 2010;16(3):152-164. doi:10.1097/NRL.0b013e3181bd602b
39. Durandy Y. Rationale for Implementation of Warm Cardiac Surgery in Pediatrics. *Front Pediatr.* 2016;4. doi:10.3389/fped.2016.00043
40. Guzmán-Pruneda FA, Fraser CD. Neuroprotective strategies--what do we really need to know? *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu.* 2014;17(1):77-80. doi:10.1053/j.pcsu.2014.01.005
41. Austin EH, Edmonds HL, Auden SM, et al. Benefit of neurophysiologic monitoring for pediatric cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1997;114(5):707-715, 717; discussion 715-716. doi:10.1016/S0022-5223(97)70074-6
42. Andropoulos DB, Stayer SA, Diaz LK, Ramamoorthy C. Neurological monitoring for congenital heart surgery. *Anesth Analg.* 2004;99(5):1365-1375; table of contents. doi:10.1213/01.ANE.0000134808.52676.4D
43. Hirsch JC, Jacobs ML, Andropoulos D, et al. Protecting the infant brain during cardiac surgery: a systematic review. *Ann Thorac Surg.* 2012;94(4):1365-1373; discussion 1373. doi:10.1016/j.athoracsur.2012.05.135
44. Simsic JM. Biomarkers Identify Newborns at Risk following Cardiac Surgery. *J Cardiovasc Dis.* 2014;2(2):82-90.
45. Petzold A. Glial fibrillary acidic protein is a body fluid biomarker for glial pathology in human disease. *Brain Res.* 2015;1600:17-31. doi:10.1016/j.brainres.2014.12.027

46. Bembea MM, Savage W, Strouse JJ, et al. Glial fibrillary acidic protein as a brain injury biomarker in children undergoing extracorporeal membrane oxygenation. *Pediatr Crit Care Med J Soc Crit Care Med World Fed Pediatr Intensive Crit Care Soc.* 2011;12(5):572-579. doi:10.1097/PCC.0b013e3181fe3ec7
47. Nylén K, Ost M, Csajbok LZ, et al. Increased serum-GFAP in patients with severe traumatic brain injury is related to outcome. *J Neurol Sci.* 2006;240(1-2):85-91. doi:10.1016/j.jns.2005.09.007
48. Honda M, Tsuruta R, Kaneko T, et al. Serum glial fibrillary acidic protein is a highly specific biomarker for traumatic brain injury in humans compared with S-100B and neuron-specific enolase. *J Trauma.* 2010;69(1):104-109. doi:10.1097/TA.0b013e3181bbd485
49. Kaneko T, Kasaoka S, Miyauchi T, et al. Serum glial fibrillary acidic protein as a predictive biomarker of neurological outcome after cardiac arrest. *Resuscitation.* 2009;80(7):790-794. doi:10.1016/j.resuscitation.2009.04.003
50. Ennen CS, Huisman TAGM, Savage WJ, et al. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy treated with whole-body cooling. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;205(3):251.e1-7. doi:10.1016/j.ajog.2011.06.025
51. Papa L, Zonfrillo M, Ramirez J, et al. Performance of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) in Detecting Traumatic Intracranial Lesions on Computed Tomography in Children and Youth with Mild Head Trauma. *Acad Emerg Med Off J Soc Acad Emerg Med.* 2015;22(11):1274-1282. doi:10.1111/acem.12795
52. McKenney SL, Mansouri FF, Everett AD, Graham EM, Burd I, Sekar P. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for brain injury in neonatal CHD. *Cardiol Young.* 2016;26(7):1282-1289. doi:10.1017/S1047951115002346
53. Fink EL, Berger RP, Clark RS, et al. Exploratory Study of Serum Ubiquitin Carboxyl-Terminal Esterase L1 and Glial Fibrillary Acidic Protein for Outcome Prognostication after Pediatric Cardiac Arrest. *Resuscitation.* 2016;101:65-70. doi:10.1016/j.resuscitation.2016.01.024
54. Brunetti MA, Jennings JM, Easley RB, et al. Glial fibrillary acidic protein in children with congenital heart disease undergoing cardiopulmonary bypass. *Cardiol Young.* 2014;24(4):623-631. doi:10.1017/S1047951113000851
55. McHarg Jennifer, Ringel Richard, Coulson John, Jennings Jacky, Everett Allen. Biomarker assessment of brain injury in the cardiac catheterization laboratory. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(14_Supplement):E417-E417. doi:10.1016/S0735-1097(11)60417-8
56. Hinton RB, Andelfinger G, Sekar P, et al. Prenatal Head Growth and White Matter Injury in Hypoplastic Left Heart Syndrome. *Pediatr Res.* 2008;64(4):364-369. doi:10.1203/PDR.0b013e3181827bf4
57. Hernández-García C, Rodríguez-Rodríguez A, Egea-Guerrero JJ. Brain injury biomarkers in the setting of cardiac surgery: Still a world to explore. *Brain Inj.* 2016;30(1):10-17. doi:10.3109/02699052.2015.1079733
58. Clancy RR, McGaurn SA, Wernovsky G, et al. Preoperative risk-of-death prediction model in heart surgery with deep hypothermic circulatory arrest in the neonate. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000;119(2):347-357. doi:10.1016/S0022-5223(00)70191-7
59. Rigby ML, Rosenthal M. Cardiorespiratory Interactions in Paediatrics: "It's (almost always) the circulation stupid!" *Paediatr Respir Rev.* 2017;22:60-65. doi:10.1016/j.prrv.2016.08.003

60. Jacobs JP, O'Brien SM, Pasquali SK, et al. The Society of Thoracic Surgeons Congenital Heart Surgery Database Mortality Risk Model: Part 2-Clinical Application. *Ann Thorac Surg.* 2015;100(3):1063-1068; discussion 1068-1070. doi:10.1016/j.athoracsur.2015.07.011
61. O'Brien SM, Jacobs JP, Pasquali SK, et al. The Society of Thoracic Surgeons Congenital Heart Surgery Database Mortality Risk Model: Part 1-Statistical Methodology. *Ann Thorac Surg.* 2015;100(3):1054-1062. doi:10.1016/j.athoracsur.2015.07.014
62. Vedovelli L, Padalino M, Simonato M, et al. Cardiopulmonary Bypass Increases Plasma Glial Fibrillary Acidic Protein Only in First Stage Palliation of Hypoplastic Left Heart Syndrome. *Can J Cardiol.* 2016;32(3):355-361. doi:10.1016/j.cjca.2015.06.023
63. Wechsler D. *Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence – Third Edition: Canadian.* Pearson Clinical Assessment Canada; 2002.
64. Grizzle R. Wechsler Intelligence Scale for Children, Fourth Edition. In: Goldstein S, Naglieri JA, eds. *Encyclopedia of Child Behavior and Development.* Springer US; 2011:1553-1555. doi:10.1007/978-0-387-79061-9_3066
65. Davis JL, Matthews RN. NEPSY-II Review: Korkman, M., Kirk, U., & Kemp, S. (2007). NEPSY—Second Edition (NEPSY-II). San Antonio, TX: Harcourt Assessment. *J Psychoeduc Assess.* 2010;28(2):175-182. doi:10.1177/0734282909346716
66. Marini A, Marotta L, Bulgheroni S, Fabbro F. *BVL_4-12. Batteria per La Valutazione Del Linguaggio in Bambini Dai 4 Ai 12 Anni.* Giunti O.S. Organizzazioni Speciali; 2015.
67. BVN 5-11 - Batteria di valutazione neuropsicologic - Test - Erickson. Accessed October 30, 2020. <https://www.erickson.it/it/bvn-511-batteria-di-valutazione-neuropsicologica-per-l-eta-evolutiva>
68. Achenbach T, Rescorla L. Achenbach System of Empirically Based Assessment. In: Volkmar FR, ed. *Encyclopedia of Autism Spectrum Disorders.* Springer; 2013:31-39. doi:10.1007/978-1-4419-1698-3_219
69. Conners' Rating Scales-Revised - children, adults, used, score, health, Definition, Purpose, Precautions, Description. Accessed June 28, 2020. <http://www.minddisorders.com/Br-Del/Conners-Rating-Scales-Revised.html>
70. Bembea MM, Rizkalla N, Freedy J, et al. Plasma Biomarkers of Brain Injury as Diagnostic Tools and Outcome Predictors After Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Crit Care Med.* 2015;43(10):2202-2211. doi:10.1097/CCM.0000000000001145
71. Daniel M, Lindberg MD. Finally, Actual Data for the FDA-Approved Biomarkers of Traumatic Brain Injury. *NEJM J Watch.* 2018;2018. doi:10.1056/nejm-jw.NA47225
72. Vedovelli L, Padalino M, D'Aronco S, et al. Glial fibrillary acidic protein plasma levels are correlated with degree of hypothermia during cardiopulmonary bypass in congenital heart disease surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2017;24(3):436-442. doi:10.1093/icvts/ivw395
73. Vedovelli L, Padalino M, Suppiej A, et al. Cardiopulmonary-Bypass Glial Fibrillary Acidic Protein Correlates With Neurocognitive Skills. *Ann Thorac Surg.* 2018;106(3):792-798. doi:10.1016/j.athoracsur.2018.03.083
74. Graham EM, Martin RH, Atz AM, et al. Association of intraoperative circulating-brain injury biomarker and neurodevelopmental outcomes at 1 year among neonates who have undergone cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2019;157(5):1996-2002. doi:10.1016/j.jtcvs.2019.01.040

75. Hori D, Everett AD, Lee JK, et al. Rewarming Rate During Cardiopulmonary Bypass Is Associated With Release of Glial Fibrillary Acidic Protein. *Ann Thorac Surg*. 2015;100(4):1353-1358. doi:10.1016/j.athoracsur.2015.04.006
76. Alonso-Alconada Daniel, Broad Kevin D., Bainbridge Alan, et al. Brain Cell Death Is Reduced With Cooling by 3.5°C to 5°C but Increased With Cooling by 8.5°C in a Piglet Asphyxia Model. *Stroke*. 2015;46(1):275-278. doi:10.1161/STROKEAHA.114.007330
77. Verrall CE, Blue GM, Loughran-Fowlds A, et al. “Big issues” in neurodevelopment for children and adults with congenital heart disease. *Open Heart*. 2019;6(2):e000998. doi:10.1136/openhrt-2018-000998
78. Claessens NHP, Kelly CJ, Counsell SJ, Benders MJNL. Neuroimaging, cardiovascular physiology, and functional outcomes in infants with congenital heart disease. *Dev Med Child Neurol*. 2017;59(9):894-902. doi:10.1111/dmcn.13461