

# Modelo de hipotermia experimental en murinos para estudios de lesión medular

Aníbal J. Sarotto,<sup>\*</sup> Daniela Contartese,<sup>\*</sup> Verónica Dorfman,<sup>\*\*</sup> Agustina Toscanini,<sup>#</sup> Nicolás Scheverin,<sup>\*</sup> Micaela Besse,<sup>\*\*</sup> Ignacio Larráyoiz,<sup>§</sup> Manuel Rey-Funes,<sup>\*</sup> Alfredo Martínez,<sup>§</sup> César F. Loidl<sup>†</sup>

<sup>\*</sup>Laboratorio de Neuropatología Experimental, Instituto de Biología Celular y Neurociencia "Prof. E. De Robertis" (IBCN), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, CONICET, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

<sup>\*\*</sup>Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico (CEBBAD), Universidad Maimónides, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

<sup>#</sup>Instituto Nanobiotec (UBA-Conicet), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, CONICET, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

<sup>††</sup>Unidad de Patología Espinal, Servicio de Ortopedia y Traumatología, Hospital General de Agudos "Carlos G. Durand", Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

<sup>§</sup>Angiogenesis Study Group, Center for Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), Logroño, España

## RESUMEN

**Introducción:** Los ensayos de hipotermia sistémica en murinos son costosos, debido a la complejidad de los sistemas. El objetivo de este estudio fue evaluar si el modelo de hipotermia sistémica exógena utilizado en nuestro laboratorio para la hipotermia ocular es útil para reducir significativamente la temperatura de la médula espinal en ratas adultas. **Materiales y Métodos:** Se utilizaron 36 ratas Sprague-Dawley albinas macho de 60 días, distribuidas en dos grupos: grupo normotermia a 24 °C (n = 18) y grupo hipotermia (n = 18) en cámara fría a 8 °C durante 180 minutos. **Resultados:** La temperatura rectal promedio fue de 37,71 ± 0,572 °C en el grupo normotermia y 34,03 ± 0,250 °C en el grupo hipotermia (p <0,0001). La temperatura medular promedio fue de 38,8 ± 0,468 °C en el grupo normotermia y de 36,4 ± 0,290 °C en el grupo hipotermia (p <0,0001). **Conclusiones:** El uso de hipotermia sistémica en ratas de laboratorio parece ser un método prometedor para evaluar los mecanismos fisiológicos y patológicos que se desencadenan en la médula espinal. La exposición al frío en cámara genera hipotermia medular significativa en ratas adultas. Los resultados sugieren que podría ser un modelo adecuado de hipotermia medular de bajo costo.

**Palabras clave:** Hipotermia; murinos; médula espinal.

**Nivel de Evidencia:** III

## Experimental Hypothermia Murine Model for Spinal Cord Injury Studies

### ABSTRACT

Given the complexity of hypothermic trial systems in murines, they are expensive. Our objective was to evaluate if the exogenous hypothermic model used in our laboratory for ocular hypothermia was useful for a significant reduction in medullar spine temperature in adult murines. **Materials and Methods:** 36 60-day-old adult male Sprague-Dawley rats were used. They were separated into two groups: a normal temperature group at 24 °C (n=18) and a hypothermia group in a cold chamber at 8 °C for 180 minutes (n=18). **Results:** The mean rectal temperature was 37.71 °C ± 0.572 in the normothermia group and 34.03°C ± 0.250 in the hypothermia group (p <0.0001). The mean medullar temperature was 38.8 ± 0.468 °C in the normothermia group and 36.4 ± 0.290 °C in the hypothermia group (p <0.0001). **Conclusion:** Using systematic hypothermia in lab rats seems to be promising to evaluate physiologic and pathological mechanisms triggered in the medullar spine. Exposure to cold in the external chamber produces significant medullar hypothermia in adult rats. Results suggest this might be an adequate and inexpensive medullar hypothermic model.

**Key words:** Hypothermia; murines; spinal cord.

**Level of Evidence:** III

Recibido el 18-8-2021. Aceptado luego de la evaluación el 27-9-2021 • Dr. ANÍBAL J. SAROTTO • sarotto@icloud.com

 <https://orcid.org/0000-0002-2199-5524>

**Cómo citar este artículo:** Sarotto AJ, Contartese D, Dorfman V, Toscanini A, Scheverin N, Besse M, Larráyoiz I, Rey-Funes M, Martínez A, Loidl CF. Modelo de hipotermia experimental en murinos para estudios de lesión medular. *Rev Asoc Argent Ortop Traumatol* 2022;87(1):89-94. <https://doi.org/10.15417/issn.1852-7434.2022.87.1.1420>

## INTRODUCCIÓN

Diversos estudios realizados desde la década de 1990 han mostrado que la hipotermia reduce el daño del sistema nervioso central en un modelo experimental de asfixia perinatal severa en ratas, con resultados alentadores tanto en la patología medular como ocular y cerebral.<sup>1-4</sup> Estos estudios fueron realizados principalmente en modelos con ratas recién nacidas. Para evaluar adultos, fue necesario desarrollar nuevos modelos de hipotermia sistémica que sean de fácil aplicación y bajo costo, dado que los modelos habituales tienen cierta dificultad técnica y un costo difícil de afrontar en nuestro medio.

En nuestro laboratorio, se usó un modelo de hipotermia sistémica exógena en ratas adultas utilizado para lesión en ojo (8 °C de temperatura ambiental), el cual desencadena un estímulo suficiente para el aumento de la expresión de un particular tipo de proteínas inducibles por frío con efecto neuroprotector.<sup>5</sup> Se propone que este modelo desarrollado para lesiones oculares podría ser adecuado como modelo de hipotermia para lesiones de la médula espinal.

El objetivo de este estudio fue evaluar si el modelo de hipotermia sistémica exógena utilizado en nuestro laboratorio para la hipotermia ocular, es útil para reducir significativamente la temperatura de la médula espinal en ratas adultas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos de manejo y tratamiento de animales se realizaron de acuerdo con las guías de cuidados para animales de laboratorio<sup>6</sup> y lo que establecen las normas CICUAL UBA.<sup>7</sup>

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley albinas macho adultas de 60 días. Los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio. En total, se utilizaron 36 ratas distribuidas en dos grupos: grupo normotermia a 24 °C (n = 18) y grupo hipotermia (n = 18). Para la hipotermia, los animales se colocaron en cámara fría a 8 °C durante 180 min, con hidratación *ad libitum*.<sup>5</sup> La temperatura se midió con un termómetro digital (TES-1300, TES Electrical Electronic Corp., Taipéi, Taiwán) conectado a una termocupla de tipo K (TPK-01).

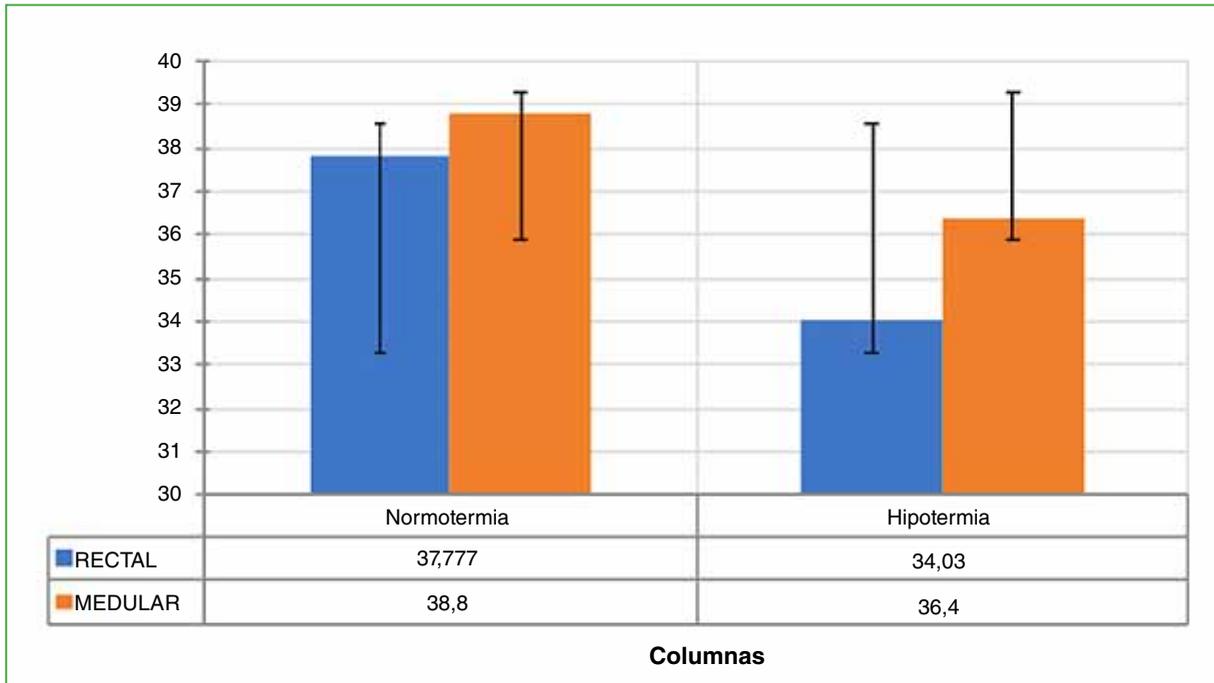
Los animales del grupo hipotermia se sacrificaron inmediatamente después de retirarlos de la heladera. Se practicó eutanasia a todos los animales por decapitación con guillotina. Inmediatamente después, se midió la temperatura intramedular e intrarrectal.

Los resultados se presentan como media  $\pm$  desviación estándar. Las comparaciones se realizaron mediante la prueba t de Student para muestras independientes. Se consideró significativo un valor  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

La temperatura rectal promedio fue de  $37,71 \pm 0,572$  °C en el grupo normotermia y de  $34,03 \pm 0,250$  °C en el grupo hipotermia. La diferencia fue estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). La temperatura medular promedio fue de  $38,8 \pm 0,468$  °C en el grupo normotermia y de  $36,4 \pm 0,290$  °C en el grupo hipotermia ( $p < 0,0001$ ). La diferencia promedio de la temperatura entre los grupos fue de 3,68 °C en el recto y de 2,4 °C en la médula (Tabla y Figura).

Se observó un mayor gradiente entre las temperaturas rectal e intramedular en el grupo hipotermia (+1,1 °C en el grupo normotermia y +2,4 °C en el grupo hipotermia).



**Tabla.** Valores de temperatura rectal y medular en normotermia e hipotermia

Normotermia		Hipotermia	
Rectal	Medular	Rectal	Medular
38	38,8	34,4	36,8
36,3	37,8	34,5	36,9
38,3	39,3	33,8	36,6
37,2	38,9	34,2	36,3
37,6	39	34	36,2
38	39,1	34	36,6
38	39,2	33,8	36,4
38,2	38,5	34,1	35,9
38,1	38,6	33,9	36,5
38,3	38,8	33,7	36
36,7	37,9	34,2	36,1
36,9	38	33,5	36,4
37,8	39	33,9	36,6
37,7	39,1	34,2	36,1
38,1	39,3	34,3	36,2
38	39,2	34	36,8
37,7	38,9	34,1	36,6
37,9	39	34	36,3
<b>37,71111111</b>	<b>38,8</b>	<b>34,03333333</b>	<b>36,40555556</b>
<b>38,3</b>	<b>39,3</b>	<b>34,5</b>	<b>36,9</b>
<b>36,3</b>	<b>37,8</b>	<b>33,5</b>	<b>35,9</b>

## DISCUSIÓN

Desde el punto de vista experimental, la hipotermia sistémica inducida tiene propiedades neuroprotectoras en la isquemia cerebral<sup>8</sup> y medular<sup>9</sup>. En la asfixia, a nivel medular, la superproducción de óxido nítrico se manifiesta como lesión estructural y funcional. Esta situación puede prevenirse inhibiendo la enzima óxido nítrico sintetasa mediante el uso de hipotermia en neonatos.<sup>1,10</sup>

Los ensayos de hipotermia sistémica en modelos experimentales murinos plantean grandes dificultades, debido a los costos de adquisición, la complejidad de los sistemas y del manejo de los enfriadores por la circulación de agua helada<sup>11</sup> o el coma inducido en cámara fría<sup>12</sup> o, incluso, sistemas de enfriamiento transrectales que requieren varias horas<sup>13</sup>.

Sobre la base de la experiencia publicada,<sup>5</sup> decidimos evaluar la posibilidad de aplicar un método sencillo y de bajo costo para obtener un modelo de enfriamiento medular útil para ensayos de laboratorio. Los resultados de esta investigación muestran datos a favor de la utilidad de un modelo de hipotermia sistémica exógena que habitualmente se emplea en nuestro laboratorio para la hipotermia ocular en ratas adultas. Observamos que la aplicación simple de frío en cámara a 8 °C por espacio de 3 horas logra reducir significativamente la temperatura de la médula espinal.

El uso de la hipotermia se ha propuesto como tratamiento neuroprotector en humanos. En recién nacidos a término con encefalopatía hipóxico-isquémica, se observaron beneficios del enfriamiento selectivo de la cabeza (10 °C), la hipotermia sistémica leve (34,5-35 °C) y también de la combinación de ambos métodos.<sup>14,15</sup>

Asimismo, la evidencia científica sugiere utilizar la hipotermia terapéutica en pacientes con lesión medular aguda.<sup>9</sup> Debido a los costos médicos asociados con lesiones de la médula espinal y la falta de tratamientos eficaces, hay una necesidad continua de evaluar nuevas terapéuticas que puedan iniciarse cerca de la lesión aguda para limitar los mecanismos de lesión secundarios y mejorar el resultado funcional en esta población de pacientes.<sup>16-18</sup>

Las terapéuticas posibles con frío son de dos tipos: local y sistémica. La hipotermia regional medular mediante el enfriamiento epidural proporcionó citoprotección en la profilaxis de la isquemia medular durante la cirugía aórtica,<sup>19</sup> pero por lo complejo del procedimiento, se opta por la hipotermia sistémica.<sup>20</sup> En casos de lesión de la médula espinal, los niveles relativamente leves de hipotermia sistémica, después de una lesión, mejoran la función y reducen el daño histopatológico.<sup>21,22</sup> La hipotermia moderada inducida sistémicamente es protectora en una variedad de modelos de lesión de la médula espinal y, por lo tanto, merece consideración para la aplicación clínica.

A pesar de sus aplicaciones potenciales, la hipotermia plantea un problema: la dificultad de aplicar frío a algunos órganos o regiones concretas del organismo, debido a la capacidad de los organismos homeotermos de regular la temperatura.<sup>23</sup> Para aplicar hipotermia en órganos internos, como el cerebro o la médula, es necesario enfriar la sangre con un sistema de circulación externo,<sup>24</sup> mientras que, en recién nacidos, es necesario un dispositivo bastante elaborado y que no es fácilmente asequible para hospitales de países en vías de desarrollo o para dispensarios.<sup>25</sup>

## CONCLUSIÓN

La exposición al frío en cámara a 8 °C durante 3 horas genera hipotermia medular significativa en ratas Sprague-Dawley albinas macho de 60 días. Los resultados sugieren que podría ser un modelo adecuado de hipotermia medular de bajo costo.

## Agradecimientos

A Andrea Pecile, Mariana Ceol Retamal y Manuel Antonio Ponce por la excelente asistencia en el cuidado de los animales.

---

Conflicto de intereses: El Laboratorio de la UBA cuenta con el subsidio UBACyT 2019-2022 número 20020160100150. Este trabajo fue apoyado por el Departamento de Defensa de los Estados Unidos, Grant MR130239 (a AM) y por UBACyT, Grant 20020160100150BA (a CFL). IML está respaldado por un contrato de Miguel Servet (CP15 / 00198) del Instituto de Salud Carlos III-FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional) y por FRSS.

ORCID de D. Contartese: <https://orcid.org/0000-0003-3690-264X>  
 ORCID de V. Dorfman: <https://orcid.org/0000-0002-7950-1400>  
 ORCID de A. Toscanini: <https://orcid.org/0000-0001-9431-7794>  
 ORCID de N. Scheverin: <https://orcid.org/0000-0001-9878-0372>  
 ORCID de M. Besse: <https://orcid.org/0000-0002-4388-1384>

ORCID de I. Larráyo: <https://orcid.org/0000-0003-1629-152X>  
 ORCID de M. Rey-Funes: <https://orcid.org/0000-0002-0213-3056>  
 ORCID de A. Martínez: <https://orcid.org/0000-0003-4882-4044>  
 ORCID de C. F. Loidl: <https://orcid.org/0000-0001-6609-8969>

## BIBLIOGRAFÍA

1. Dorfman VB, Rey-Funes M, Bayona JC, López EM, Coirini H, Loidl CF. Nitric oxide system alteration at spinal cord as a result of perinatal asphyxia is involved in behavioral disabilities: hypothermia as preventive treatment. *J Neurosci Res* 2009;87(5):1260-9. <https://doi.org/10.1002/jnr.21922>
2. Loidl CF, De Vente J, van Dijk E, Vles SH, Steinbusch H, Blanco C. Hypothermia during or after severe perinatal asphyxia prevents increase in cyclic GMP-related nitric oxide levels in the newborn rat striatum. *Brain Res* 1998;791(1-2):303-7. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00195-4](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00195-4)
3. Rey-Funes M, Ibarra ME, Dorfman VB, Loidl CF, Serrano J, Fernández AP, et al. Hypothermia prevents nitric oxide system changes in retina induced by severe perinatal asphyxia. *J Neurosci Res* 2011;89(5):729-43. <https://doi.org/10.1002/jnr.22556>
4. Rey-Funes M, Dorfman VB, Ibarra ME, Peña E, Contartese DS, et al. Hypothermia prevents gliosis and angiogenesis development in an experimental model of ischemic proliferative retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(4):2836-46. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-11198>
5. Larrayoz IM, Rey-Funes M, Contartese DS, Rolón F, Sarotto A, et al. Cold shock proteins are expressed in the retina following exposure to low temperatures. *PLoS One* 2016;11(8):e0161458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161458>
6. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8<sup>th</sup> ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. PMID: 21595115
7. Reglamento para el cuidado y uso de animales de laboratorio en la Universidad de Buenos Aires. CICUAL. [Consulta: marzo 2019] Disponible en: [https://www.fmed.uba.ar/sites/default/files/2018-04/Reglamento%20UBA\\_0.pdf](https://www.fmed.uba.ar/sites/default/files/2018-04/Reglamento%20UBA_0.pdf)
8. Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdes I, Scheinberg P, Ginsberg MD. Small differences in intras ischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987;7(6):29-38. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1987.127>
9. Horiuchi T, Kawaguchi M, Kurita N, Inoue S, Nakamura M, et al. The long-term effects of mild to moderate hypothermia on gray and white matter injury after spinal cord ischemia in rats. *Anesth Analg* 2009;109(2):559-66. <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e3181aa96a1>
10. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271(5 Pt 1):C1424-37. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.271.5.C1424>
11. Bazley FA, Pashai N, Kerr CL, All AH. The effects of local and general hypothermia on temperature profiles of the central nervous system following spinal cord injury in rats. *Ther Hypothermia Temp Manag* 2014;4(3): 115-24. <https://doi.org/10.1089/ther.2014.0002>
12. Badr El-Bialy, Shaimaa Abu Zaid, Nermeen El-Borai, Anis Zaid, Amanallah El-Bahrawy. Hypothermia in rat: Biochemical and pathological study. *Int J Cri For Sci* 2017;1(1):22-30. [Consulta: marzo 2019] Disponible en: <https://biocoreopen.org/ijcf/Hypothermia-in-Rat-Biochemical-and-Pathological-Study.php>
13. Liu P, Yang R, Zuo Z. Application of a novel rectal cooling device in hypothermia therapy after cerebral hypoxia-ischemia in rats. *BMC Anesthesiol* 2016;16:77. <https://doi.org/10.1186/s12871-016-0239-5>
14. Azzopardi DV, Strohm B, Edwards AD, Dyet L, Halliday HL, Juszczak E, et al. Moderate Hypothermia to treat perinatal asphyxia encephalopathy. *N Engl J Med* 2009;361(14):1349-58. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0900854>
15. Battin MR, Penrice J, Gunn TR, Gunn AJ. Treatment of term infants with head cooling and mild systemic hypothermia (35 degrees C and 34,5 degrees C) after perinatal asphyxia. *Pediatrics* 2003;111(2):244-51. <https://doi.org/10.1542/peds.111.2.244>
16. Dietrich WD, Levi AD, Wang M, Green BA. Hypothermic treatment for acute spinal cord injury. *Neurotherapeutics* 2011;8(2):229-39. <https://doi.org/10.1007/s13311-011-0035-3>
17. Tay Bobby K-B, Eismont FJ. Injuries of the upper cervical spine. En: Herkowitz HN. *Rothman-Simeone The Spine*, 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders; 1980, vol. II, cap. 67, págs. 1073-99.
18. Videla N, Steverlynck A, Castelli R, Sarotto AJ, Sbrero D, Scheveri N, et al. Incidencia de lesiones espinales en accidentes de tránsito. Nuestra experiencia, análisis y conclusiones sobre la prevalencia de lesiones por motocicletas. XVIII Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Patología de la Columna Vertebral, Córdoba, Argentina, 2014.
19. Cambria RP, Davison JK. Regional hypothermia for prevention of spinal cord ischemic complications after thoracoabdominal aortic surgery: experience with epidural cooling. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 1998;10(1):61-5. [https://doi.org/10.1016/s1043-0679\(98\)70020-6](https://doi.org/10.1016/s1043-0679(98)70020-6)

20. Choi R, Andres RH, Steinberg GK, Guzman R. Intraoperative hypothermia during vascular neurosurgical procedures. *Neurosurg Focus* 2009;26(5):E24. <https://doi.org/10.3171/2009.3.FOCUS0927>
21. Lo TP, Cho K-S, Garg MS, Lynch MP, Marcillo AE, Koivisto DL, et al. Systemic hypothermia improves histological and functional outcome after cervical spinal cord contusion in rats. *J Comp Neurol* 2009;514(5):433-48. <https://doi.org/10.1002/cne.22014>
22. Shibuya S, Miyamoto O, Janjua NA, Itano T, Mori S, Horimatsu H. Post-traumatic moderate systemic hypothermia reduces TUNEL positive cells following spinal cord injury in rat. *Spinal Cord* 2004;42(1):29-34. <https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101516>
23. Morrison SF. Central neural control of thermoregulation and brown adipose tissue. *Auton Neurosci* 2016;196:14-24. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2016.02.010>
24. Andrews PJ, Sinclair HL, Rodriguez A, Harris BA, Battison CG, Rhodes JKJ, et al. Hypothermia for Intracranial Hypertension after Traumatic Brain Injury. *N Engl J Med* 2015;373(25):2403-12. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507581>
25. Dingley J, Liu X, Gill H, Smit E, Sabir H, Tooley J, et al. The feasibility of using a portable xenon delivery device to permit earlier xenon ventilation with therapeutic cooling of neonates during ambulance retrieval. *Anesth Analg* 2015;120(6):1331-6. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000000693>