

# Contusión medular en ratas tratadas con hipotermia sistémica. Expresión de proteínas inducibles por frío experimental

Anibal J. Sarotto,<sup>\*</sup> María Agustina Toscanini,<sup>‡</sup> Daniela Contartese,<sup>\*</sup> Verónica B. Dorfman,<sup>\*\*</sup> Ronan Nakamura,<sup>\*</sup> Micaela Besse,<sup>\*</sup> Ignacio M. Larráyo, # Alfredo Martínez,<sup>\*\*</sup> Elena De Matteo,<sup>^</sup> Manuel Rey-Funes,<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>Instituto NANOBIOTEC (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, 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>Biomarkers and Molecular Signaling Group, Center for Biomedical Research of La Rioja, Logroño, España

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

<sup>^</sup>Servicio de Patología, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez" (UBA-CONICET), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

## RESUMEN

**Introducción:** La lesión traumática de la médula espinal es la principal causa mundial de discapacidad motora y una prioridad para la OMS. El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de la hipotermia terapéutica tras una contusión medular. **Materiales y Métodos:** Se utilizaron ratas macho a las que se les generó una contusión medular. Se formaron cuatro grupos (6 animales por grupo): a) de control, b) con lesión en normotermia (24 °C, sacrificados 12 h después de la lesión), c) con lesión en normotermia (24 °C, sacrificados 24 h después de la lesión) y d) lesión en hipotermia (8 °C, durante 180 min, sacrificados 24 h después de la lesión). Se estudió la expresión de la CIRBP, la caspasa-3 y la Neu-N. **Resultados:** La lesión medular aumentó ligeramente la expresión de CIRBP a las 24 h y, de manera importante, la de caspasa-3, todo acompañado por imágenes de motoneuronas dañadas en el asta anterior. En los animales tratados con hipotermia, se observó una alta expresión de CIRBP y niveles muy bajos de caspasa-3, que no se distinguen de los controles. El número de motoneuronas viables se restauró parcialmente. **Conclusiones:** Este modelo experimental resultó eficaz para inducir una lesión medular, demostró la protección neuronal mediada por hipotermia. El aumento de la expresión de CIRBP en la médula espinal de ratas con lesión e hipotermia comparado con el del grupo normotérmico abre el camino para un posible uso de sustancias que incrementen la CIRBP como terapéutica para las lesiones medulares contusivas.

**Palabras clave:** Contusión; hipotermia; médula espinal; CIRBP; rata; lesión.

**Nivel de Evidencia:** I

## Spinal Cord Contusion in Rats Treated with Systemic Hypothermia. Experimental Cold-inducible Protein Expression

### ABSTRACT

**Introduction:** Traumatic spinal cord injury is the leading cause of motor disability worldwide, and the WHO considers it a priority. This study sought to investigate the effects of therapeutic hypothermia following spinal cord contusion. **Materials and Methods:** Male rats that underwent experimental spinal cord contusion were used. For this purpose, four experimental groups were created (n=6 per group): a) control, b) lesion in normothermia (24°C, sacrificed 12h after the injury), c) lesion in normothermia (24°C, sacrificed 24h after the injury), and d) hypothermic injury (8°C for 180 min, sacrificed 24h after the injury). The expression of cold-inducible RNA-binding protein (CIRBP), Caspase-3, and NeuN was studied. **Results:** At 24 hours, spinal cord damage raised CIRBP expression slightly while also increasing Caspase-3 significantly. All of this was accompanied by images of damaged motor neurons in the anterior horn. In animals treated with hypothermia, high expression of CIRBP and very low levels of Caspase-3 were observed, which were indistinguishable from controls. Furthermore, the number of viable motor neurons was partially restored.

Recibido el 11-12-2023. Aceptado luego de la evaluación el 7-2-2024 • Dr. ANÍBAL J. SAROTTO • sarotto@icloud.com  <https://orcid.org/0000-0002-2199-5524>

**Cómo citar este artículo:** Sarotto AJ, Toscanini MA, Contartese D, Dorfman VB, Nakamura R, Besse M, Larráyo IM, Martínez A, De Matteo E, Rey-Funes M, Loidl CF. Contusión medular en ratas tratadas con hipotermia sistémica. Expresión de proteínas inducibles por frío experimental. *Rev Asoc Argent Ortop Traumatol* 2024;89(3):299-313. <https://doi.org/10.15417/issn.1852-7434.2024.89.3.1866>

**Conclusions:** The experimental model developed in this study was effective at inducing spinal cord injury, demonstrating neuronal protection through hypothermia. The increased expression of CIRBP in the spinal cord of rats with injury and hypothermic treatment when compared to the normothermic group suggests the possibility of using substances that increase CIRBP as therapies for the treatment of contusive spinal cord injuries.

**Keywords:** Contusion; hypothermia; spinal cord; CIRBP; rat; injury.

**Level of Evidence:** I

## INTRODUCCIÓN

Cada año, unas 500.000 personas sufren una lesión de la médula espinal en el mundo, lo que aumenta su probabilidad de morir prematuramente.<sup>1</sup> Según el Servicio Nacional de Rehabilitación de la Argentina, en 2013, se identificaron 2.176.123 pacientes con discapacidad (54% de hombres y 46% de mujeres), de los cuales el 30% sufría una discapacidad motora pura.<sup>2</sup> Esto genera la necesidad de buscar nuevas terapéuticas que permitan mejorar la calidad de vida de los pacientes. Nuestra propuesta consiste en investigar el uso terapéutico de la hipotermia. En nuestro laboratorio, hemos demostrado su capacidad para reducir el daño del sistema nervioso central en modelos murinos de asfixia perinatal y trauma del nervio óptico, con resultados alentadores.<sup>3-13</sup> La reducción ligera de la temperatura corporal protege al sistema nervioso central contra daños de diversa índole.<sup>3,5,8,12-14</sup>

Numerosas publicaciones muestran que los niveles leves de hipotermia después de una lesión mejoran la función neurológica y reducen el daño histopatológico en la médula.<sup>14-18</sup> El papel neuroprotector de la hipotermia está bien establecido en animales de experimentación y en pacientes con paro cardíaco (Hakim y cols., 2018), encefalopatía hipóxico-isquémica (Yum y cols., 2018), lesión cerebral traumática (Leng, 2017) y otras enfermedades (Zhu y cols., 2015). Aunque los mecanismos neuroprotectores de la hipotermia en diferentes enfermedades varían y aún no se han determinado por completo, la neuroprotección se ha atribuido comúnmente a su efecto sobre la disminución de la tasa metabólica, la reducción de la generación de radicales, la mejoría de la inflamación, la inhibición de la excitotoxicidad y la apoptosis. Se ha descrito el aumento de la expresión de diferentes proteínas inducibles por frío, como la CIRBP (*cold-inducible RNA binding protein*) y la RBM3 (*RNA binding motif protein 3*). La CIRBP, también conocida como CIRP o ribonucleoproteína heterogénea nuclear A18 (hnRNP A18), es una proteína de 18 kDa compuesta por 172 aminoácidos, cuyo gen se encuentra en el cromosoma 19, región p13.3 en los seres humanos. Al igual que otros miembros de la familia de las hnRNP, la CIRBP se une al ARN mensajero y ribosomal presente en la célula y regula su semivida, la expresión potencial de múltiples genes y, por tanto, su función. Tal como sucede con otras proteínas de unión al ARN, se ha visto que la CIRBP es capaz de modular la apoptosis jugando un papel antiapoptótico en situaciones de hipotermia. En células neuronales de rata, este efecto parece darse a través de la ruta de apoptosis mitocondrial, ya que muestran una disminución de la expresión de moléculas proapoptóticas (Bax, Bad, Bak, Cyts, Apaf1, caspasa-9 y caspasa-3). Recientemente, hemos mostrado el aumento de la expresión de la CIRBP en el asta anterior de la médula espinal de ratas sometidas a hipotermia sistémica.<sup>7,9,11,12,19-24</sup> Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo de este estudio fue evaluar la protección medular del frío mediante la expresión de la CIRBP en motoneuronas del asta anterior de la médula espinal de ratas expuestas a una lesión medular y tratadas con hipotermia sistémica. Para ello, aplicamos nuestro modelo hipotérmico como tratamiento para la contusión medular (MASCIS®),<sup>25</sup> y estudiamos la expresión de la CIRBP como proteína inducida por el tratamiento hipotérmico, y la de caspasa-3 y Neu-N para estudiar la viabilidad neuronal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Modelo y diseño experimental

Los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con la guía para el cuidado y el uso de animales de laboratorio de los NIH (*National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals-CCAC 2002; CCAC 2003*). El protocolo fue aprobado por CICUAL, resolución Nro. 970/2015 (Universidad de Buenos Aires, Argentina). La rata Sprague Dawley (desarrollada a partir de la Wistar) es una raza multipropósito exogámica de rata albina utilizada ampliamente en la investigación médica. Entre sus ventajas están su apacibilidad, facilidad de manejo y la experiencia que tenemos en el laboratorio con esta raza, ya que, desde la década de 1980, trabajamos con ellas en hipotermia.

Se utilizaron 24 ratas Sprague-Dawley macho adultas de 60 días de vida que fueron distribuidas en cuatro grupos (6 por grupo): a) de control, b) con lesión NT 12 h: lesión en normotermia a 24 °C y sacrificadas 12 h después de la lesión, c) con lesión NT 24 h: lesión en normotermia a 24 °C y sacrificadas 24 h después de la lesión, y d) con lesión HT 24 h: lesión en hipotermia a 8 °C, en cámara fría, durante 180 min y sacrificadas 24 h después de la lesión.<sup>24</sup> A los animales se les administró anestesia intraperitoneal con una mezcla de xilazina (Rompun®, Bayer, Kiel, Alemania) 10 mg/kg del peso corporal y ketamina (Ketolar®, Pfizer, Alcobendas, Madrid, España) 60 mg/kg del peso corporal. Se colocó al animal sobre la platina quirúrgica con un realce torácico para mejorar la separación de espinosas y se usó una bolsa de suero tibio a 38 °C como lecho para evitar la hipotermia durante el procedimiento. La médula espinal torácica se expuso quirúrgicamente mediante una incisión en el dorso y laminectomía de T9 a T11. La contusión medular se provocó con el impactador MASCIS®, de acuerdo con los protocolos publicados. Brevemente consiste en dejar caer una barra de 10 g de peso, que se eleva a 25 mm de altura, lo que da una carga lesional de 24 g al caer, esta impacta directamente en la región dorsal de la médula espinal de la rata en T9-T10.<sup>25</sup> Luego de la contusión, la lesión se cerró quirúrgicamente y los animales fueron colocados en cajas individuales para su recuperación en condiciones de bioterio estándar a 24 °C (grupos con lesión NT 12 h y con lesión NT 24 h), o expuestos a hipotermia a 8 °C, en cámara fría, durante 180 min, después de la lesión y luego trasladados para su recuperación en condiciones de bioterio estándar a 24 °C (grupo con lesión HT 24 h). El control de la hipotermia se realizó según se detalla en estudios previos del grupo de investigación.<sup>7-13</sup> El bioterio cuenta con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas. Se utilizó Tylenol® para analgesia posoperatoria (65 mg/kg). La eutanasia fue por decapitación a las 12 o 24 h de la lesión según se indicó antes. El procesamiento de tejidos se realizó siguiendo el procedimiento descrito en publicaciones anteriores.<sup>12,26</sup>

### Hematoxilina-eosina

Las médulas espinales a la altura de la región torácica (donde se provocó la lesión) fueron incluidas en parafina, cortadas con un micrótopo (Leitz, Lauda MGW, Alemania) en secciones coronales de 5 µm de grosor y montadas sobre portaobjetos gelatinizados. Las secciones medulares fueron hidratadas con xilol seguido de concentraciones decrecientes de alcohol y procesadas mediante la tinción con hematoxilina-eosina. Las secciones teñidas fueron observadas con microscopio óptico (Carl Zeiss Axiophot, Alemania) conectado a una cámara digital (Olympus, Q-Color 5, EE.UU.) y se procesaron mediante el programa NIH Image (Wayne Rasband, 1995, NIH, Research Services Branch, NIMH, Bethesda, MD, EE.UU.).

### Inmunohistoquímica

Las secciones medulares fueron rehidratadas, la peroxidasa endógena se inhibió con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3% en metanol) y las uniones inespecíficas se bloquearon con incubación en suero normal de cabra. Posteriormente las secciones se incubaron en cámara húmeda toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios anti-CIRBP policlonal de conejo (Proteintech®, Reino Unido, Cod. 00055668) en una dilución 1:1000 o anti-Neu-N monoclonal hecho en ratón (Abcam, Cod. ab177487) en una dilución 1:1000. El anticuerpo anti-Neu-N reconoce una molécula de 46/48 kDa de masa molecular conocida como proteína nuclear neuronal específica (Neu-N o “NEUronal Nuclei”) localizada en la zona de unión con el ADN que está presente en la mayoría de las neuronas viables del sistema nervioso central, por lo que, en esta investigación, se usó para la cuantificación de la viabilidad neuronal. Al día siguiente, la inmunorreactividad se reveló con anticuerpo secundario biotinilado especie específica: anticonejo (Vector Labs, EE.UU, catálogo número PK-6101) o antirratorón (Abcam Labs, EE.UU. ab6788) según correspondiera, ambos en una dilución 1:200. La marcación se detectó mediante diaminobencidina, usando el kit SK-4100 (Vector Laboratories, EE.UU.). El análisis del grado de respuesta y el número de células inmunorreactivas se llevó a cabo con un microscopio óptico (BX40, Olympus Optical Corporation, Tokio, Japón), acoplado a una cámara digital (390CU 3.2 Megapixel CCD Camera, Micrometrics, España), empleando el programa Micrometrics SE P4 (Micrometrics, España). Se analizaron tres animales por grupo experimental.<sup>27</sup>

### Procesamiento del tejido para Western blot

Se incubó la membrana con el anticuerpo anti-CIRBP de conejo (Proteintech®, Reino Unido) en una dilución 1:1000 y el anticuerpo anticaspasa-3 monoclonal hecho en ratón, en una dilución 1:500 (Santa Cruz Biotech. A2921, EE.UU.). Luego, la membrana se incubó con anticuerpo anti-IgG de conejo (Amersham Pharmacia Bio-

tech, EE.UU.), en una dilución 1:5000, o anti-IgG de ratón en una dilución 1:3000 (Amersham Pharmacia Biotech, EE.UU.) según correspondiera. Para el revelado se utilizó el kit de detección ECLTM (Amersham™). Las bandas se visualizaron con el fotodocumentador UVP Biospectrum/Biolite (Analytik Jena). Se analizaron tres animales por grupo experimental. Para el control de carga se incubó la membrana con anticuerpo monoclonal de ratón anti- $\beta$ -actina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en una dilución 1:5000. El peso molecular de las bandas de proteína se estimó utilizando una escalera de proteínas comercial (PageRuler®, Fermentas UAB, Vilnius, Lituania).

### Análisis de imágenes

Las imágenes de las secciones con tinción de hematoxilina-eosina o inmunotinción se obtuvieron por microscopía y fueron digitalizadas. La cuantificación de las neuronas inmunopositivas se realizó de acuerdo con lo publicado previamente por nuestro grupo de investigación.<sup>3,7-13</sup> Las secciones de médula espinal se seleccionaron de modo que fueran comparables entre los distintos animales. La densidad óptica relativa de las neuronas inmunopositivas y el número de neuronas inmunorreactivas se determinaron con el programa de análisis de imágenes ScionImage. En la tinción con anti-Neu-N, se consideraron motoneuronas viables a aquellas que presentaron una marca homogénea en el núcleo y el citoplasma. Se analizaron 6 secciones por anticuerpo y se contabilizaron 10 campos por sección utilizando un aumento x40. Se consideró marca inmunopositiva a aquella cuya densidad óptica superó 4 veces o más la densidad óptica del fondo. Para la cuantificación de la densidad óptica de las bandas obtenidas por Western blot, se utilizó el programa informático ImageJ (NIH, EE.UU.). Los valores de densidad óptica de CIRBP y de caspasa-3 obtenidos en Western blot fueron normalizados según el valor de densidad óptica de  $\beta$ -actina correspondiente y los resultados se expresaron como el valor medio del grupo  $\pm$  la desviación estándar, y en porcentaje respecto al grupo de control. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

### Análisis estadístico

Los datos se cargaron en una base de datos, se analizaron con el paquete estadístico InfoStat versión 2020, y se graficaron utilizando el programa GraphPad Prism (versión 5.0 para Windows, GraphPad Software). A fin de determinar si las diferencias resultaban estadísticamente significativas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Tukey. Antes de la prueba de hipótesis, se verificaron los supuestos de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk modificada y de homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene. Se consideró estadísticamente significativa una diferencia  $p < 0,05$ .

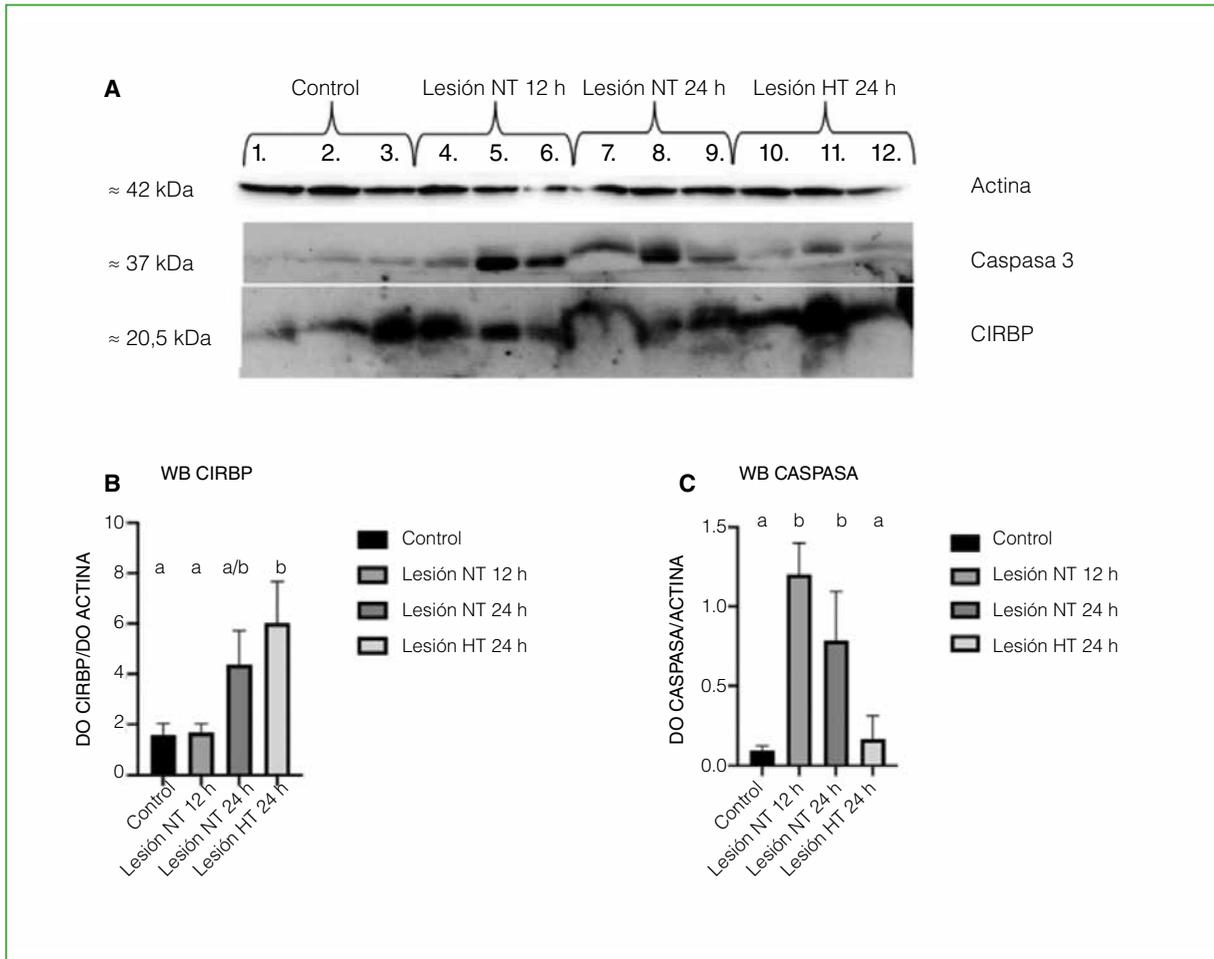
## RESULTADOS

### Western blot

Se obtuvo una banda de  $\approx 20,5$  kDa indicando la expresión de CIRBP, de 37 kDa para caspasa-3 y de 42 kDa para la actina (Figura 1A). En el caso de la CIRBP, se puede observar un aumento significativo de la expresión en el grupo con lesión HT 24 h con respecto al grupo de control y al de lesión NT 12 h (Figura 1B). En lo que respecta a la expresión de caspasa-3, se aprecia un aumento significativo en los grupos con lesión NT 12 h y 24 h con respecto al grupo de control. Cabe destacar que las ratas tratadas con hipotermia (lesión HT 24 h) presentan una disminución significativa en los niveles de caspasa-3 con respecto a ambos grupos lesionados en normotermia, llegando a ser indistinguible del grupo de control (Figura 1C).

### Morfología

Se obtuvieron imágenes del asta anterior de la médula espinal correspondientes a las láminas VII, VIII y IX de Rexed, y se analizaron las motoneuronas alfa con tinción tanto con hematoxilina-eosina como con inmunohistoquímica para CIRBP y Neu-N.

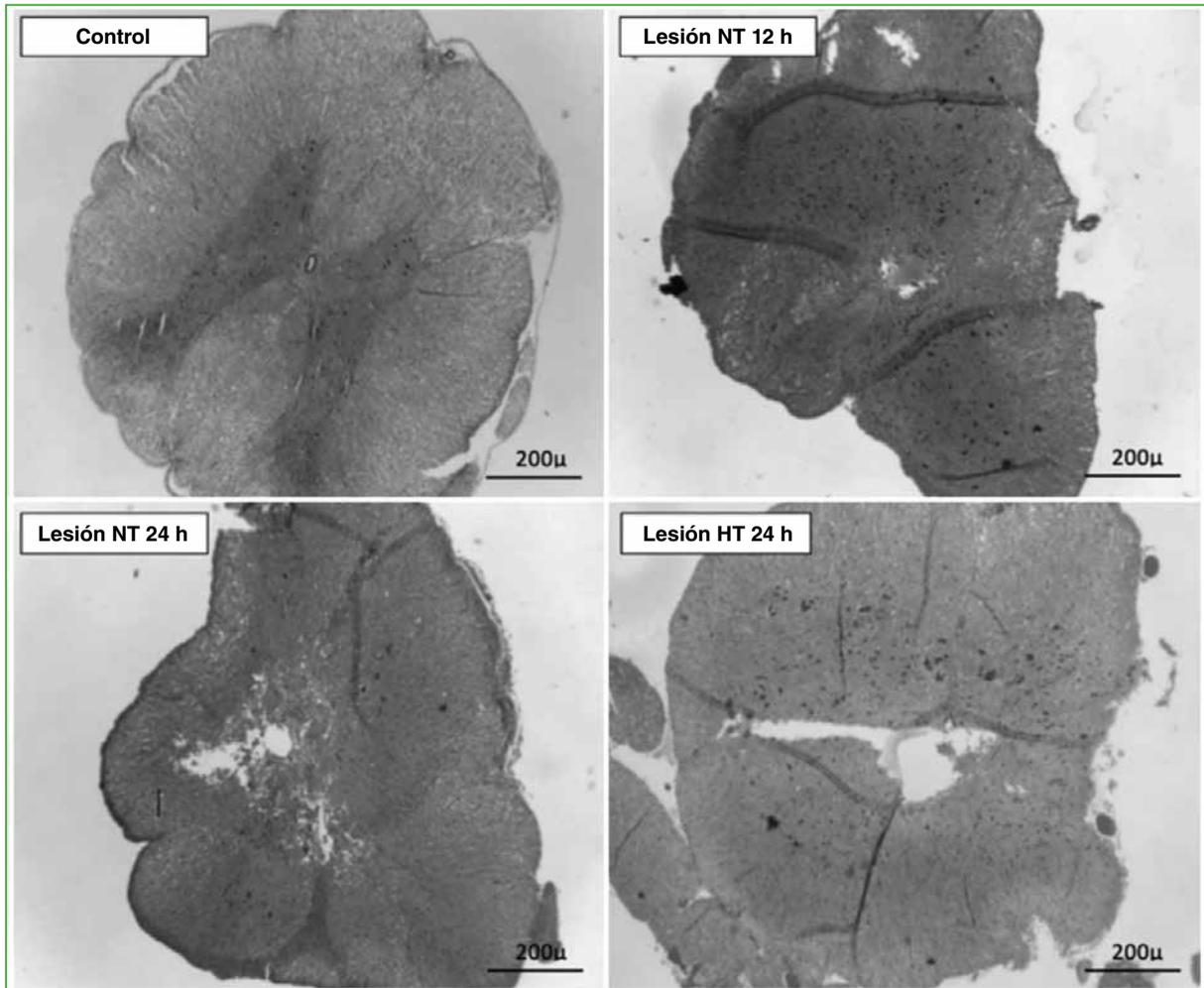


**Figura 1.** A. Western blot (WB) de los homogenatos de médula de los 4 grupos, inmunotinción para CIRBP, caspasa-3 y el control de carga con actina. B. Gráfico de semicuantificación de las bandas de CIRBP por densitometría y análisis, test de ANOVA y test de Tukey. Se observa una diferencia significativa entre el grupo con lesión HT 24 h y el grupo de control (a/b  $p < 0,05$ ). C. Gráfico de semicuantificación de las bandas de caspasa-3 por densitometría y análisis, test de ANOVA y test de Tukey. Se observa una diferencia significativa entre los grupos con lesión NT 12 h y NT 24 h, y los grupos de control y con lesión HT 24 h ( $p < 0,05$ ).

NT = normotermia; HT = hipotermia; DO = densidad óptica.

### Hematoxilina-eosina

En los controles, la estructura está conservada con la distribución en H de la sustancia gris, se observan las grandes motoneuronas; en los cortes de los otros grupos experimentales, se puede ver una pérdida de cohesión marcada por una zona donde se produce una degeneración temprana y desaparece la estructura neurológica, dando paso a una cavitación lesional por ruptura medular con algunos elementos sanguíneos (Figura 2).



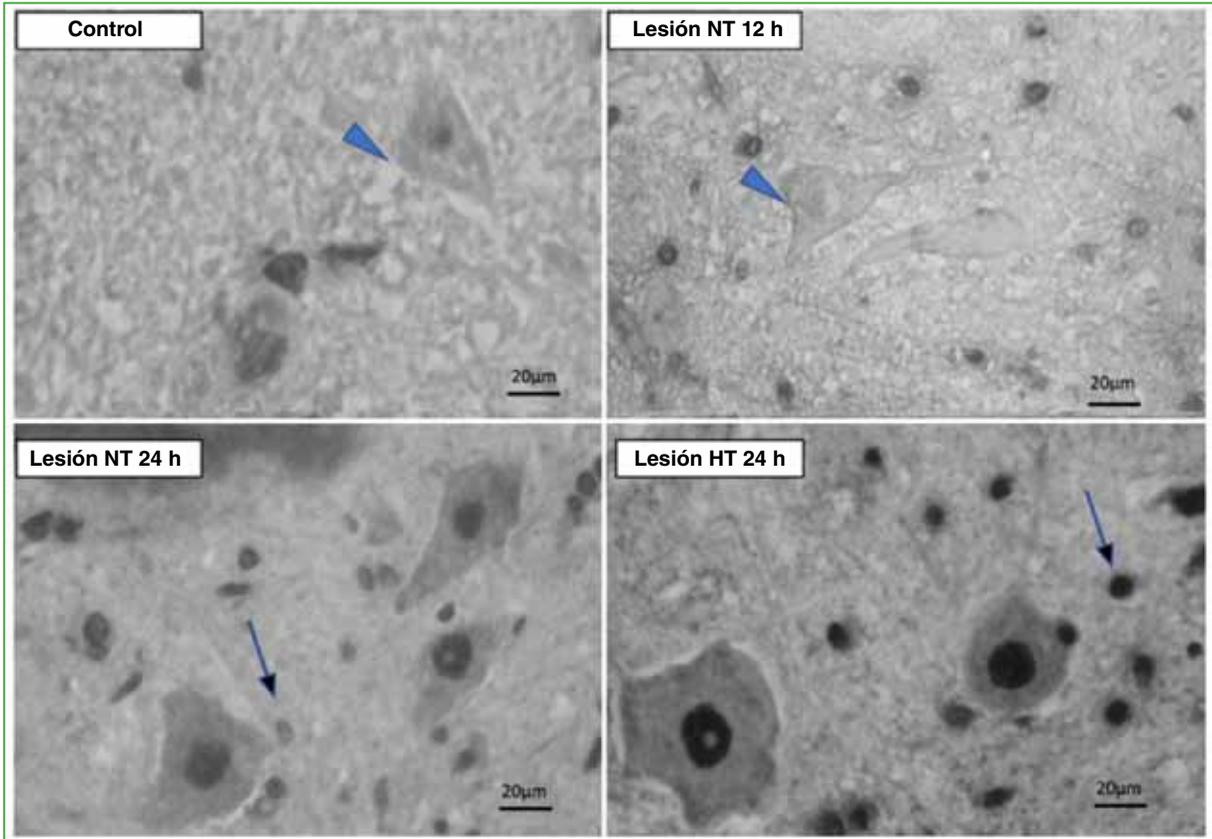
**Figura 2.** Cortes de médula espinal teñida con técnica de hematoxilina-eosina. Aumento x10. Se observa una pérdida de cohesión marcada por una zona donde se produce degeneración temprana y desaparece la estructura neurológica habitual, dando paso a una cavitación poslesión con algunos elementos sanguíneos. NT = normotermia; HT = hipotermia.

## Inmunohistoquímica

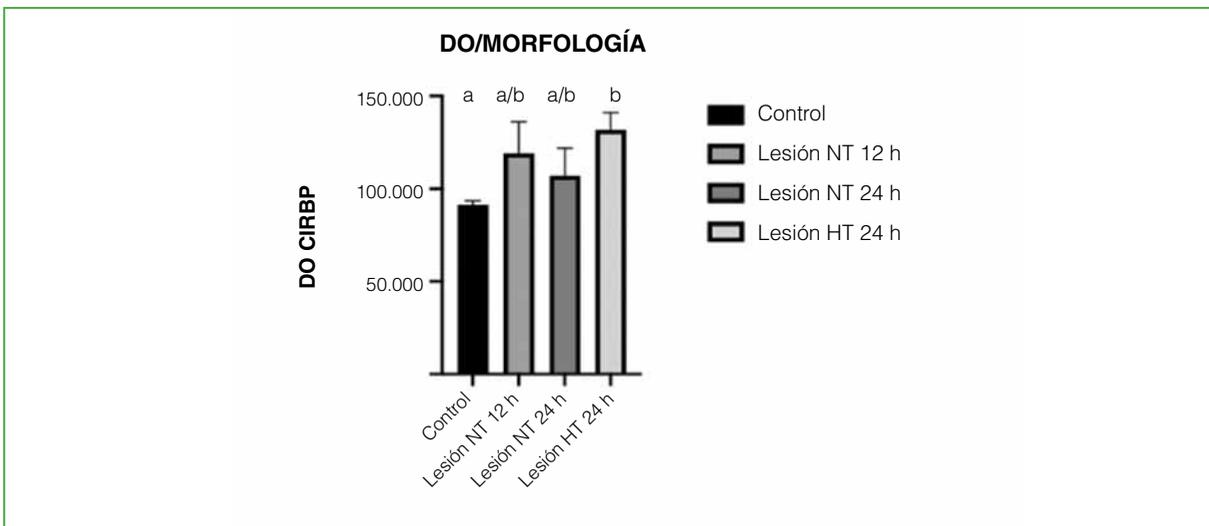
### Expresión de la CIRBP

Cualitativamente, en el grupo de control, se observa una marca inmunorreactiva para CIRBP débil con distribución citoplasmática, y su expresión es levemente superior en el núcleo y el neuropilo. En las imágenes de ratas lesionadas NT 12 h y 24 h, la marca fue algo mayor que la del grupo de control. El grupo con lesión HT 24 h mostró la aparición de marca intensa en el núcleo y en forma de “gránulos” citoplasmáticos, en las alfa motoneuronas y en el neuropilo circundante (Figura 3).

Al cuantificar la densidad óptica para CIRBP, se observó un aumento significativo de la densidad óptica de CIRBP en el grupo con lesión HT 24 h con respecto al grupo de control ( $p = 0,01$ ), sin diferencias con el resto de los grupos experimentales (Figura 4, Tabla 1).



**Figura 3.** CIRBP. Cortes comparativos. Aumento x40. Ampliación de láminas VII y VIII de Rexed. Motoneurona con escasa marca en los controles y a las 12 h de la lesión (punta de flecha). La marca aumenta a las 24 h en normotermia con una expresión mayor a las 24 h con hipotermia. Células gliales con mayor concentración en los grupos lesionados (flechas). NT = normotermia; HT = hipotermia.



**Figura 4.** Gráfico de cuantificación densitométrica de la inmunohistoquímica con anticuerpos anti-CIRBP en cortes de médula espinal de tres ratas por grupo: de control, con lesión NT 12 h y NT 24 h, y con HT 24 h. Como se observó en las microfotografías previas, hay un aumento progresivo de expresión de CIRBP, que es menor en animales de control, moderado entre NT 12 h y NT 24 h, y significativo con HT 24 h. Mediante el análisis con el test de ANOVA y el test de Tukey, se observó una diferencia significativa entre el grupo de control y el grupo con lesión HT 24 h (a/b p < 0,001). NT = normotermia; HT = hipotermia; DO = densidad óptica.

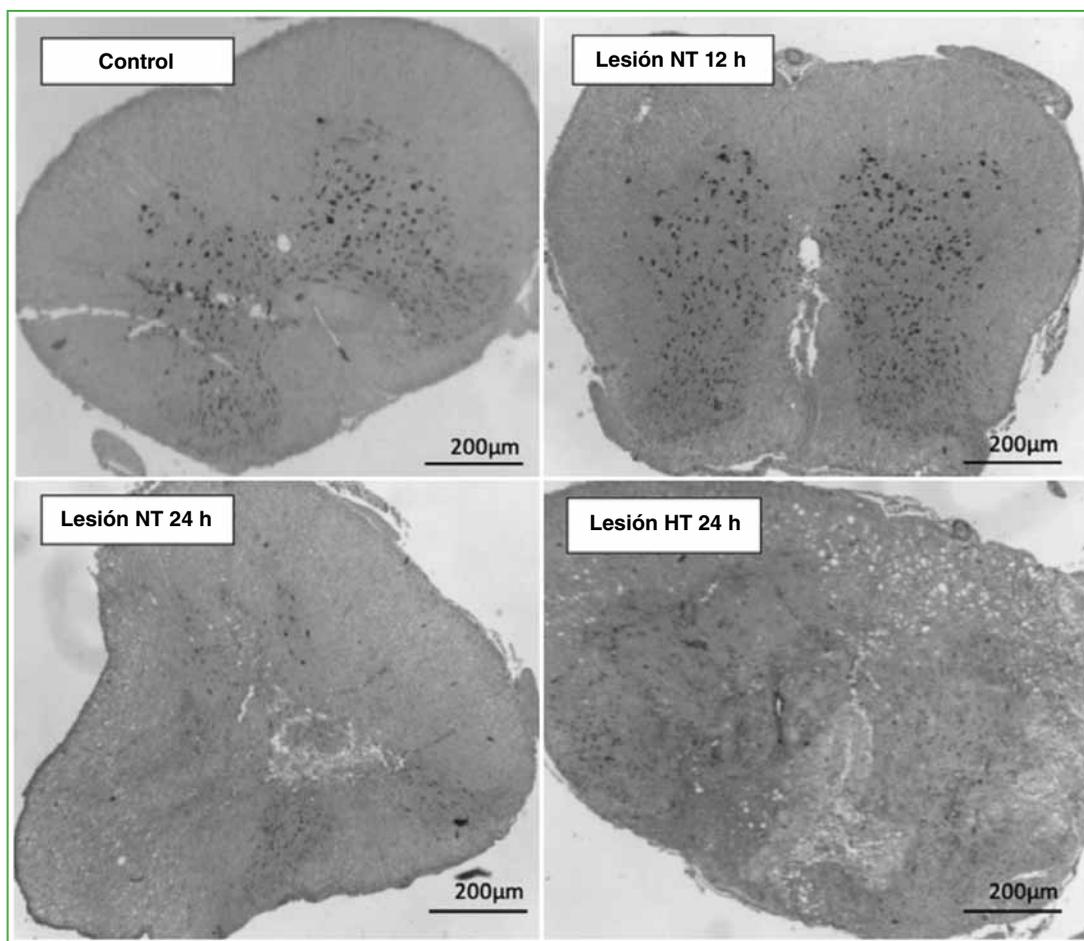
**Tabla 1.** Densidad óptica relativa de CIRBP en inmunohistoquímica

Grupos	Diferencia media	Intervalo de confianza 95%	Significativo	p
Control vs. NT 12 h	-27785	De -59942 a 4372	No	0,0924
Control vs. NT 24 h	-15734	De -47892 a 16423	No	0,4462
Control vs. HT 24 h	-40419	De -72577 a 8262	Sí	0,0161
NT 12 h vs. NT 24 h	12051	De -20107 a 44208	No	0,6436
NT 12 h vs. HT 24 h	-12634	De -44792 a 19523	No	0,6110
NT 24 h vs. HT 24 h	-24685	De -56842 a 7472	No	0,1424

En el test de Tukey, se observa la diferencia significativa entre el grupo de control y el grupo con HT 24 h; si bien el incremento de CIRBP se observa en los grupos con lesión NT, la diferencia no es significativa entre ellos como así tampoco con los controles. NT = normotermia; HT = hipotermia.

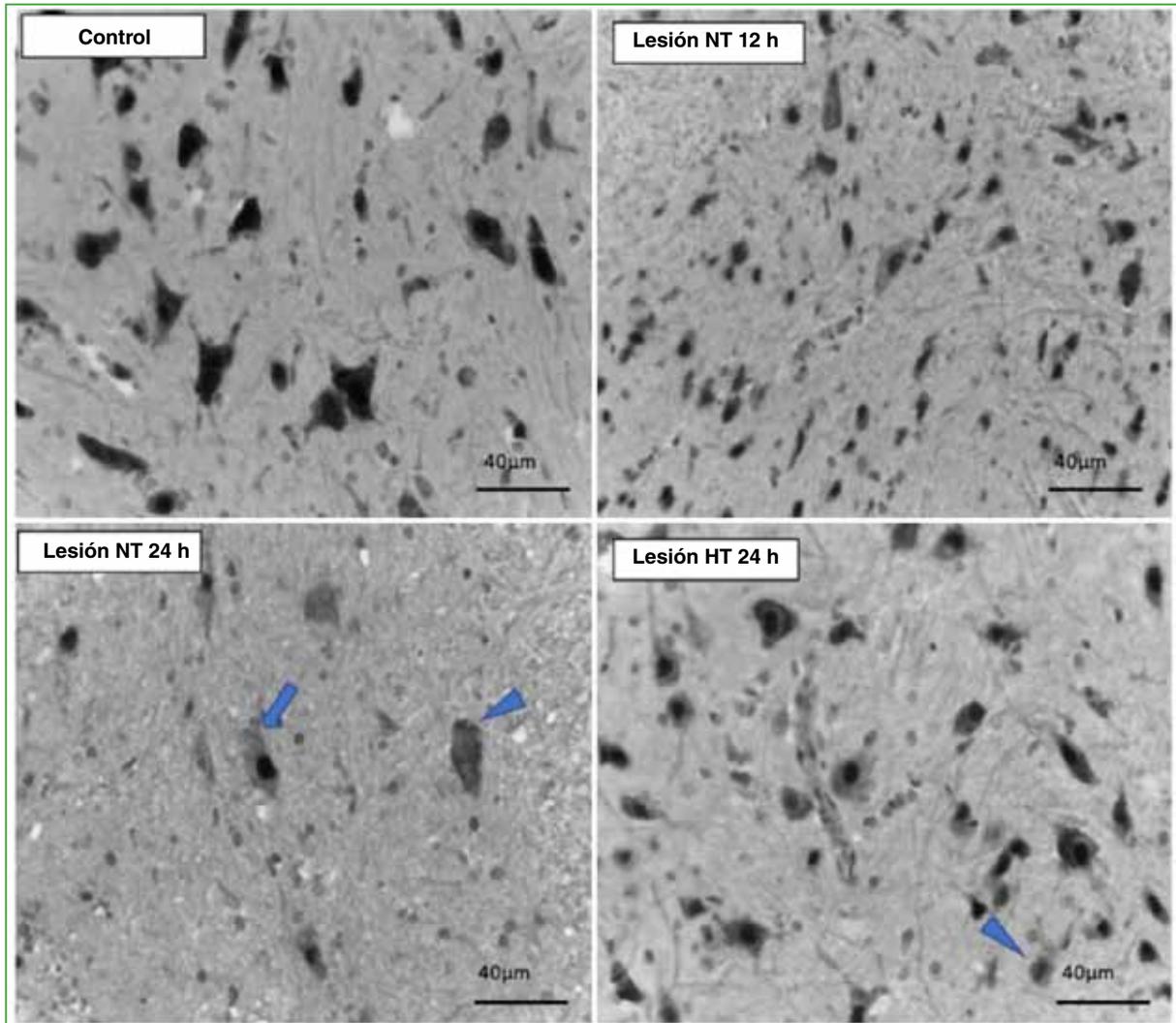
### Viabilidad celular por expresión de Neu-N

Cualitativamente, al analizar la distribución inmunohistoquímica de Neu-N, en los grupos con lesión NT, se ve una disminución de la intensidad de la tinción nuclear, con un halo perinuclear y núcleo excéntrico, retracción citoplasmática con membrana irregular. Algunas células tienen aspecto de “neurona fantasma”, y se aprecia el incremento de células gliales (Figura 5).



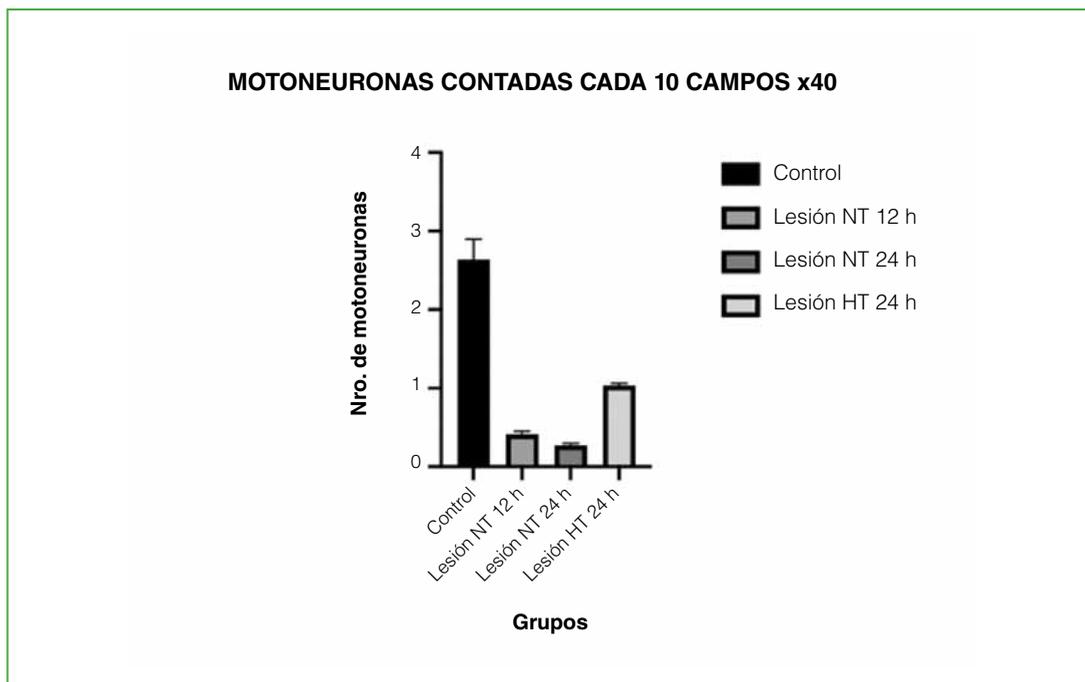
**Figura 5.** Neu-N. Cortes comparativos. Aumento x4. Se puede observar la tinción franca en el grupo de control y el grupo con lesión NT 12 h, también con HT 24 horas. NT = normotermia; HT = hipotermia.

Sin embargo, en el grupo con lesión HT 24 h, se observan neuronas en vías de muerte, pero en menor número (Figura 6).



**Figura 6.** Neu-N. Cortes comparativos. Aumento x2. Controles con fuerte marca y glia circundante sin marca para Neu-N, las lesiones NT 12 h tienen un leve aumento de la glia y pérdida de tinción en algunas neuronas, algo mucho más marcado en las lesiones NT 24 h, con neurona fantasma (punta de flecha) o neurona con núcleo excéntrico (flecha). La lesión HT 24 h tiene un aspecto parecido al del grupo NT 12 h, con algunas motoneuronas en vías de muerte, pérdida de tinción leve (punta de flecha). NT = normotermia; HT = hipotermia.

Al cuantificar el número de neuronas viables por campo en los cortes medulares teñidos con inmunomarcación de la Neu-N, donde este anticuerpo marca la fibra neurológica de citoplasmas y núcleos vitales, y se pierde tinción cuando la célula está muerta o en vías de muerte, se contabilizaron las células con núcleo central y tinción citoplasmática homogénea. Se observó una reducción significativa en los grupos con lesión NT 12 h y NT 24 h comparados con el grupo de control ( $p < 0,0001$ ) (Figura 7, Tabla 2).



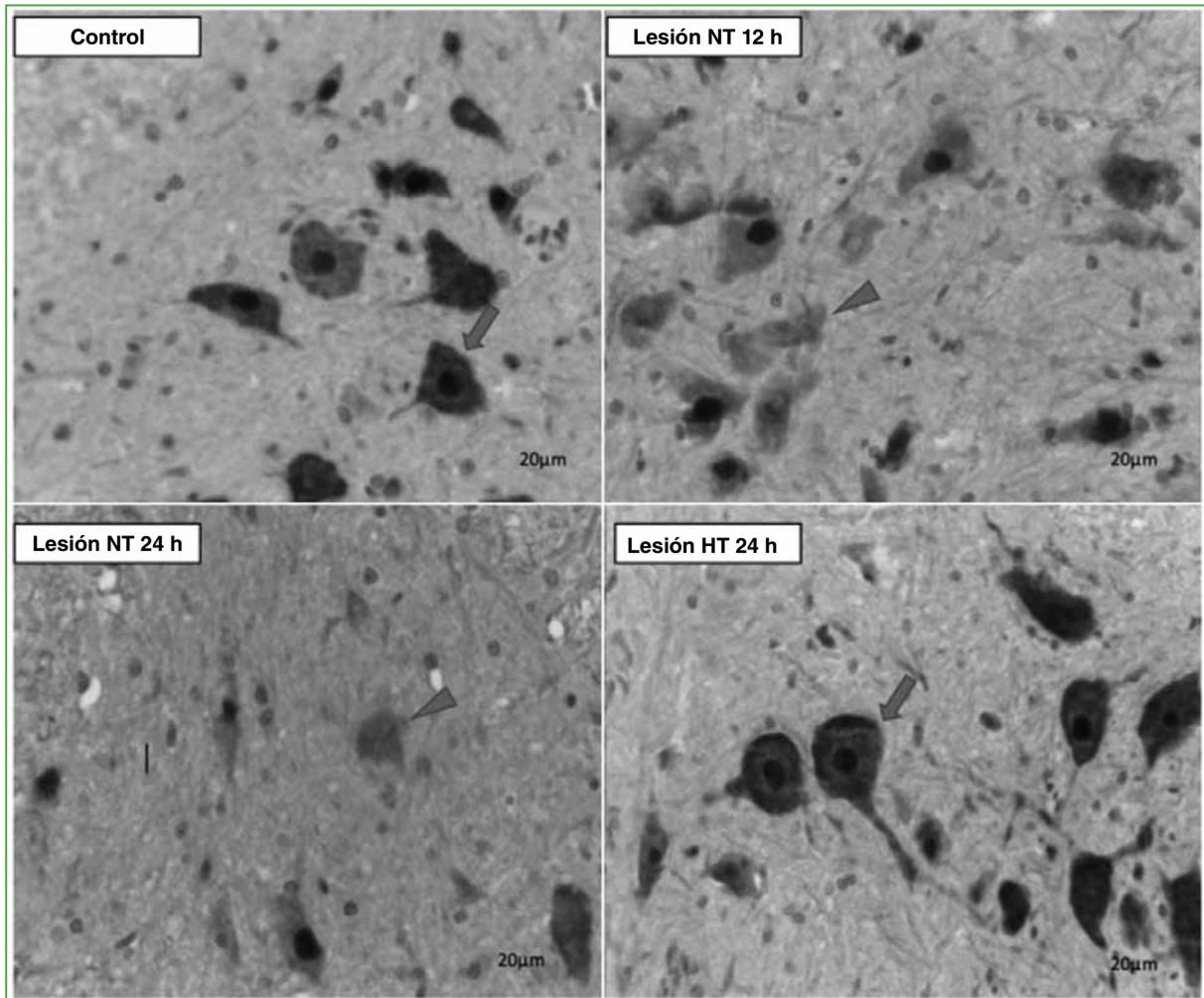
**Figura 7.** Gráfico de cuantificación densitométrica de la inmunohistoquímica con anticuerpos anti-Neu-N en cortes de médula espinal de tres ratas por grupo: de control, NT 12 h y NT 24 h, y HT 24 h. Como se observó en las microfotografías previas, hay una pérdida de expresión con destrucción neuronal progresiva entre las 12 h y 24 h del grupo con lesión NT. En el grupo con lesión HT 24 h, se observa una persistencia de la estructura de las motoneuronas viables. Mediante el análisis utilizando el test de ANOVA con test de Tukey, se observó una diferencia significativa entre el grupo de control y el grupo con lesión HT 24 h (a/b  $p < 0,001$ ).

**Tabla 2.** Test multiparamétrico comparativo de Tukey. Inmunohistoquímica Neu-N

Grupos	Diferencia media	Intervalo de confianza 95 %	Significativo	p
Control vs. NT 12 h	9,947	De 6,355 a 13,54	Sí	<0,0001
Control vs. NT 24 h	10,54	De 6,946 a 14,13	Sí	<0,0001
Control vs. HT 24 h	6,227	De 2,635 a 9,819	Sí	0,0024
NT 12 h vs. NT 24 h	0,5917	De -3,000 a 4,184	No	0,95
NT 12 h vs. HT 24 h	-3,72	De -7,312 a -0,1279	Sí	0,0426
NT 24 h vs. HT 24 h	-4,312	De -7,904 a -0,7195	Sí	0,0206

Test multiparamétrico comparativo de Tukey. Recuento celular a un aumento x40 cada 10 campos de células viables con anticuerpos anti-Neu-N en el asta anterior de la médula. Hay una diferencia significativa entre los grupos, excepto entre los grupos con lesión NT 12 h y 24 h. NT = normotermia; HT = hipotermia.

Asimismo, se comprobó un aumento significativo en el número de neuronas viables en el grupo con lesión HT 24 h comparado con ambos grupos con lesión NT ( $p < 0,002$ ). Sin embargo, los niveles de neuronas en hipotermia no llegaron a alcanzar los niveles del grupo de control (Figuras 6 y 8).



**Figura 8.** Neu-N. Cortes comparativos. Aumento x40. En los grupos de control y con lesión HT 24 h, se puede observar la tinción de la Neu-N con marcada intensidad nuclear y moderada en el citoplasma de las motoneuronas (flechas). En tanto que, en los grupos con lesión NT 12 h y NT 24 h, se visualizan neuronas en vías de muerte (punta de flecha). NT = normotermia; HT = hipotermia.

## DISCUSIÓN

En la actualidad, se desarrollan modelos de lesión medular en animales buscando que sean fiables, coherentes y que reproduzcan las lesiones que se observan en los seres humanos.<sup>28,29</sup> Persisten interrogantes sobre su validez y si son comparables con las condiciones clínicas en los seres humanos, lo que muestra las limitaciones del artículo, y especialmente porque solo se evaluaron motoneuronas del asta anterior. Algunas revisiones han examinado los modelos de lesión de médula espinal y sus usos potenciales en la imitación de este cuadro.<sup>30,31</sup>

Las terapéuticas posibles con frío para evitar el daño neuronal después de una lesión de la médula espinal son de dos tipos: local y sistémica. La local se ha utilizado en la profilaxis de la isquemia medular durante la cirugía aórtica. En este caso, la hipotermia mediante enfriamiento epidural proporciona citoprotección,<sup>32</sup> pero, por lo complejo

del procedimiento, se opta por la hipotermia sistémica,<sup>33</sup> sus riesgos son conocidos: aumento de la incidencia de infecciones, insuficiencia renal, necrosis de zonas expuestas y escaras, por lo que su manejo debe ser prudente. La evidencia sugiere utilizar esta última cuando hay una lesión medular aguda.<sup>34</sup>

A la CIRBP se la considera una proteína citoprotectora, que acelera la recuperación de las células ante el estrés.<sup>35,36</sup> Zhang la describe como un modulador de las telomerasas a 32 °C y a 37 °C. Esta se asocia con el complejo de la telomerasa activa a través de la unión directa del componente ARN de telomerasa (TERC) y regula la localización de la telomerasa en el “cuerpo de Cajal”.<sup>37,38</sup> La posible interacción de estos cuerpos con ribonucleoproteínas pequeñas nucleares podría tener implicancias en fenómenos de protección generados a nivel nuclear. En 2019, Mingyue Liu (<https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2018.08.100>) describe los efectos neuroprotectores al reducir la degradación de la barrera hematoencefálica en ratas. Además, Li-hui Chen publicó en 2013 (<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2628773/v1>) un estudio sobre la hipotermia y observó que la sobreexpresión de CIRBP en neuronas podría reducir la liberación de sustancias reactivas al oxígeno inducida por OGD/R (*oxygen-glucose deprivation and reoxygenation* [privación/reoxigenación de oxígeno-glucosa]) al reducir los niveles de malondialdehído y aumentar el nivel de superóxido dismutasa y glutatión, reduciendo la apoptosis neuronal inducida por OGD/R al regular negativamente la expresión de caspasa-3 y la regulación positiva de la expresión de Bcl-2 (efectos ya conocidos de la CIRBP).

A nivel experimental, la hipotermia sistémica tiene propiedades neuroprotectoras en isquemia cerebral y medular.<sup>39-41</sup> Los ensayos para realizarla en modelos experimentales generan grandes dificultades debido a los costos y la complejidad de los sistemas.<sup>42,43</sup> La mayoría tiene dos inconvenientes: invasividad y costos.

En investigaciones previas, hemos determinado que una breve exposición al frío induce la expresión de CIRBP en la médula de ratas a nivel torácico (T8-T9-T10), su expresión es significativamente mayor en animales expuestos a hipotermia con una cinética de expresión y localización horaria diferente posintervención.<sup>12</sup> Sobre la base de este modelo, pasamos a una nueva etapa donde evaluamos la lesión medular y su tratamiento con frío, midiendo la expresión de CIRBP y el número de neuronas viables después de la lesión.

El uso del impactador MASCIS® está probado como generador de lesión contusiva medular y resulta útil para diversos tipos de estudio, por ejemplo, el publicado por Colón y cols., en 2017,<sup>44</sup> con el uso de tamoxifeno como tratamiento posterior a la lesión. En este estudio, a las ratas se les provocó una contusión torácica (T10) usando el impactador, y se les administró placebo o gránulos de tamoxifeno (15 mg, por 21 días) con intervalos de 0, 6, 12 y 24 horas. Se practicó la eutanasia a los 2, 7, 14, 28 o 35 días de la lesión para estudiar los cambios moleculares y celulares en etapas aguda y crónica. La terapia inmediata o diferida (6 horas después de la lesión) mejoró la función locomotora, aumentó el tejido respetado de la materia blanca y la supervivencia neuronal.<sup>44</sup> Si bien nuestro estudio no se extendió en el tiempo buscando etapas crónicas, los resultados inmediatos (24 h) usando frío luego de una contusión moderada son alentadores.

La investigación sobre los mecanismos fisiopatológicos de la lesión medular espinal ha dado lugar a un esquema de clasificación de lesión primaria y secundaria,<sup>45,46</sup> incluso la secundaria se divide en fase aguda (de 0 a 48 h), fase subaguda (primeras 2 semanas) y crónica (luego de la anterior y dura años).<sup>47</sup> Es importante resaltar y recordar a los autores que han marcado esta diferencia, ya que la acción terapéutica postrauma debe basarse en el tratamiento de la lesión secundaria mediada por la cascada inflamatoria, las citocinas, las proteínas proapoptóticas, así como las causas asociadas a la hipoxia relativa generada por múltiples factores, como la reducción de la presión arterial sistémica a causa del shock (puede ser por dolor o neurogénico o hipovolémico, o una combinación de todos), la hipoxemia por reducción de la ventilación generada por estados de coma o por la reducción en la excursión de la jaula torácica en inspiración y espiración debida al dolor.<sup>48</sup>

La familia de caspasas regula la ejecución del programa de apoptosis de los mamíferos. La caspasa-3 escinde varios sustratos “downstream” esenciales implicados en la expresión del fenotipo apoptótico *in vitro* (gelsolina, PAK2, fodrina, láminas nucleares y la subunidad inhibidora del factor de fragmentación del ADN8-12). La activación de caspasa-3 *in vitro* puede desencadenarse por eventos “upstream”, lo que lleva a la liberación de citocromo c de la mitocondria y la subsiguiente activación de procaspasa-9 por Apaf-1. Estudios en ratas mostraron que componentes de la vía apoptótica de la caspasa-3 se activan “upstream” y “downstream” después de una lesión contusiva de la médula espinal y ocurren temprano en las neuronas en el sitio de la lesión y horas o días después en la oligodendroglia adyacente y distante del sitio de la lesión.<sup>49</sup> En nuestro estudio, vemos la presencia de necrosis y de mediadores de apoptosis, como la caspasa-3, cuya manifestación es mayor en los grupos con lesión NT 12 h y NT 24 h, su reducida presencia en el grupo con lesión HT 24 h es estadísticamente significativa, lo que, en parte, estaría explicado por el hecho de que el frío y, en particular, la CIRBP intervienen tanto en los procesos de apoptosis como de muerte celular bloqueándolos.

La proteína CIRBP actúa bloqueando varias de estas cascadas inflamatorias, de muerte celular y vías apoptóticas. Si bien, en este estudio, no se buscó marcar todas estas vías, sí podemos observar que hay una mayor cantidad de neuronas viables (Neu-N inmunopositivas) en el grupo con HT que en los grupos con NT, es similar a las lesionadas a las 12 h que a las 24 h normotérmicas, lo que muestra que probablemente estas cascadas han sido inhibidas por esta proteína.

Como limitaciones del estudio, debemos aclarar que se ha realizado con un número reducido de animales con el fin de adecuar la investigación a las normas de buen uso y cuidado de animales de laboratorio, por lo cual esta investigación deberá continuarse, aumentando el tamaño de la muestra, así como su prueba en otras razas de rata y otros modelos animales, con el fin de trasladar, en un futuro, esta investigación a la práctica médica.

## CONCLUSIÓN GENERAL

El uso del frío como terapéutica se asoció a una mayor expresión de CIRBP y una disminución de la muerte de motoneuronas del asta anterior de la médula en ratas lesionadas. Esto alienta a continuar con la investigación de la terapia del frío en lesiones contusivas de la médula espinal.

Conflicto de intereses: El Laboratorio de la UBA cuenta con el subsidio UBACyT 2019-2022, número 20020160100150.

ORCID de M. A. Toscanini: <https://orcid.org/0000-0001-9431-7794>

ORCID de V. B. Dorfman: <https://orcid.org/0000-0002-7950-1400>

ORCID de R. Nakamura: <https://orcid.org/0000-0002-0816-0020>

ORCID de M. Besse: <https://orcid.org/0000-0002-4388-1384>

ORCID de I. M. Larráyo: <https://orcid.org/0000-0003-1629-152X>

ORCID de A. Martínez: <https://orcid.org/0000-0003-4882-4044>

ORCID de E. De Matteo: <https://orcid.org/0000-0002-3856-0252>

ORCID de M. Rey-Funes: <https://orcid.org/0000-0002-0213-3056>

ORCID de C. F. Loidl: <https://orcid.org/0000-0001-6609-8969>

ORCID de Daniela Contartese: <https://orcid.org/0000-0003-3690-264X>

## BIBLIOGRAFÍA

1. National Spinal Cord Injury Statistical Center. *Spinal cord injury facts and figures at a glance*. University of Alabama, Birmingham, Alabama; 2021. Disponible en: <https://www.nscisc.uab.edu/public/SCI%20Facts%20and%20Figures%20at%20a%20Glance%20-%202021%20-%20Spanish.pdf>
2. Ministerio de Salud de la Nación Argentina. *Anuario estadístico nacional sobre discapacidad del año 2013*. Disponible en: <https://www.snr.gov.ar/publicacion>
3. 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>
4. Loidl CF. *Short and long term effects of perinatal asphyxia*. Thesis. Netherlands: Maastricht University; 1997.
5. 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)
6. Peña M, Rey-Funes M, Sarotto A, Loidl FC. Estudio del patrón migratorio de neuronas corticofrontales que expresan reelina en la asfisia perinatal experimental. *Medicina (Buenos Aires)* 2012;72(Supl II) Neurociencias 4 369 p. 157. Disponible en: <https://medicinabuenosaires.com/demo/revistas/vol72-12/supl-2/53-252-SAIC-Resumenes72-2012.pdf>
7. Rey-Funes M, Ibarra ME, Dorfman VB, López EM, López-Costa JJ, Coirini H, et al. Hypothermia prevents the development of ischemic proliferative retinopathy induced by severe perinatal asphyxia. *Exp Eye Res* 2010;90(1):113-20. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.09.019>
8. Rey-Funes M, Ibarra M, Dorfman VB, Martínez-Murillo R, Martínez A, Coirini H, 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>
9. Rey-Funes M, Dorfman VB, Ibarra M, Peña E, Contartese DS, Goldstein J, 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>

10. Rey-Funes M, Contartese DS, Rolón F, Sarotto A, Dorfman VB, Loidl CF. Efecto protector de la hipotermia en la retinopatía del prematuro (ROP) experimental. Rol de las proteínas inducibles por frío. *Arch Argent Oftalm* 2016;(6):45-56. Disponible en: <https://archivosoftalmologia.com.ar/index.php/revista/issue/view/17/13>
11. Rey-Funes M, Larrayoz IM, Contartese DS, Soliño M, Sarotto AJ, Bustelo M, et al. Hypothermia prevents retinal damage generated by optic nerve trauma in the rat. *Sci Rep* 2017;7(1):6966. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07294-6>
12. Sarotto AJ, Rey-Funes M, Dorfman VB, Contartese D, Larrayoz IM, Martínez A, et al. Expresión de proteínas inducibles por frío en la médula espinal de rata sometida a hipotermia sistémica. *Rev Asoc Argent Ortop Traumatol* 2022;87(3):393-403. <https://doi.org/10.15417/issn.1852-7434.2022.87.3.1488>
13. Contartese DS, Rey-Funes M, Sarotto A, Dorfman VB, Loidl CF, Martínez A. A hypothermia mimetic molecule (zr17-2) reduces ganglion cell death and electroretinogram distortion in a rat model of intraorbital optic nerve crush (IONC). *Front Pharmacol* 2023;14:1112318. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1112318>
14. 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>
15. 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>
16. Yu CG, Jimenez O, Marcillo AE, Weider B, Bangerter K, Dietrich WD, et al. Beneficial effects of modest systemic hypothermia on locomotor function and histopathological damage following contusion induced spinal cord injury in rats. *J Neurosurg* 2000;93(1 Suppl):85-93. <https://doi.org/10.3171/spi.2000.93.1.0085>
17. Yu WR, Westergren H, Farooque M, Holtz A, Olsson Y. Systemic hypothermia following compression injury of the rat spinal cord: reduction of plasma protein extravasation demonstrated by immunohistochemistry. *Acta Neuropathol* 1999;98(1):15-21. <https://doi.org/10.1007/s004010051046>
18. Batchelor PE, Skeers P, Antonic A, Wills TE, Howells DW, Macleod MR, et al. Systematic review and meta-analysis of therapeutic hypothermia in animal models of spinal cord injury. *PLoS One* 2013;8(8):e71317. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071317>
19. Sonna LA, Fujita J, Gaffin SL, Lilly CM. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J Appl Physiol* (1985) 2002;92(4):1725-1742. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01143.2001>
20. Al-Fageeh MB, Smales CM. Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochem J* 2006;397(2):247-59. <https://doi.org/10.1042/BJ20060166>
21. Nishiyama H, Itoh K, Kaneko Y, Kishishita M, Yoshida O, Fujita J. A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth. *J Cell Biol* 1997;137(4):899-908. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.4.899>
22. Tong G, Endersfelder S, Rosenthal LM, Wollersheim S, Sauer IM, Bühner C, et al. Effects of moderate and deep hypothermia on RNA-binding proteins RBM3 and CIRP expressions in murine hippocampal brain slices. *Brain Res* 2013;1504:74-84. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.01.041>
23. Rey-Funes M, Contartese DS, Peláez R, García-Sanmartín J, Narro-Íñiguez J, Soliño M, et al. Hypothermic shock applied after perinatal asphyxia prevents retinal damage in rats. *Front Pharmacol* 2021;12:651599. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.651599>
24. Larrayoz IM, Rey-Funes M, Contartese DS, Rolón F, Sarotto A, Dorfman VB, et al. Cold shock proteins are expressed in the retina following exposure to low temperatures. *PLoS One* 2016;24;11(8):e0161458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161458>
25. Young W. Spinal cord contusion models. *Prog Brain Res* 2002;137:231-55. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(02\)37019-5](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(02)37019-5)
26. Rodrigo J, Peinado MA, Pedrosa A. *Avances en inmunocitoquímica y técnicas relacionadas*. Jaén: Publicaciones de la Universidad de Jaén; 1996.
27. Rodrigo J, Alonso D, Fernández AP, Serrano J, Richart A, López JC, et al. Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression and protein nitration in rat cerebellum after oxygen and glucose deprivation. *Brain Res* 2001;909(1-2):20-45. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02613-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02613-0)
28. Wrathall JR. Spinal cord injury models. *J Neurotrauma* 1992;9(Suppl 1):S129-34. PMID: 1588603
29. Fehlings MG, Tator CH. A review of experimental models of acute spinal cord injury. En: Illis LS (ed.). *Spinal cord dysfunction: assessment*. Oxford: Oxford University; 1988, p. 3-43.

30. Parent S, Mac-Thiong JM, Roy-Beaudry M, Sosa JF, Labelle H. Spinal cord injury in the pediatric population: a systematic review of the literature. *J Neurotrauma* 2011;28(8):1515-24. <https://doi.org/10.1089/neu.2009.1153>
31. Kundi S, Bicknell R, Ahmed Z. Spinal cord injury: current mammalian models. *Am J Neurosci* 2013;4(1):1-12. <https://doi.org/10.3844/ajns.2013.1.12>
32. 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)
33. Bicknell CD, Riga CV, Wolfe JH. Prevention of paraplegia during thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009;37(6):654-60. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2009.02.008>
34. Dietrich WD III. Therapeutic hypothermia for spinal cord injury. *Crit Care Med* 2009;37(7 Suppl):S238-S242. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181aa5d85>
35. Lleonart ME. A new generation of proto-oncogenes: cold-inducible RNA binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 2010;1805(1):43-52. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.11.001>
36. Liao Y, Tong L, Tang L, Wu S. The role of cold-inducible RNA binding protein in cell stress response. *Int J Cancer* 2017;141(11):2164-73. <https://doi.org/10.1002/ijc.30833>
37. Zhang Y, Wu Y, Mao P, Li F, Han X, Zhang Y, et al. Cold-inducible RNA-binding protein CIRP/hnRNP A18 regulates telomerase activity in a temperature-dependent manner. *Nucleic Acids Res* 2016;44(2):761-75. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1465>
38. Torres Montaner A. El cuerpo accesorio de Cajal. *Rev Esp Patol* 2002;35(4):529-32. Disponible en: <https://www.xn--patologia2a.es/volumen35/vol35-num4/pdf%20patologia%2035-4/35-4-24.pdf>
39. 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):729-38. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1987.127>
40. Horiuchi T, Kawaguchi M, Kurita N, Inoue S, Nakamura M, Konishi N, 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>
41. Yu CG, Jagid J, Ruenes G, Dietrich WD, Marcillo AE, Yezierski RP. Detrimental effects of systemic hyperthermia on locomotor function and histopathological outcome after traumatic spinal cord injury in the rat. *Neurosurgery* 2001;49(1):152-9. <https://doi.org/10.1097/00006123-200107000-00023>
42. 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>
43. 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. Disponible en: <https://biocoreopen.org/ijcf/Hypothermia-in-Rat-Biochemical-and-Pathological-Study.php>
44. Colón JM, González PA, Cajigas Á, Maldonado WI, Torrado AI, Santiago JM, et al. Continuous tamoxifen delivery improves locomotor recovery 6h after spinal cord injury by neuronal and glial mechanisms in male rats. *Exp Neurol* 2017;299(Pt A):109-21. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.006>
45. Di Giovanni S, Knoblach SM, Brandoli C, Aden SA, Hoffman EP, Faden AI, et al. Gene profiling in spinal cord injury shows role of cell cycle neuronal death. *Ann Neurol* 2003;53:454-68. <https://doi.org/10.1002/ana.10472>
46. Kafka J, Lukacova N, Sulla I, Maloveska M, Vikartovska Z, Cizkova D. Hypothermia in the course of acute traumatic spinal cord injury. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2020;80:172-8. <https://doi.org/10.21307/ane-2020-016>
47. Anjum A, Da'in Yazid M, Fauzi Daud M, Idris J, Ng AMH, Selvi Naicker A, et al. Spinal cord injury: Pathophysiology, multimolecular interactions, and underlying recovery mechanisms. *Int J Mol Sci* 2020;21(20):7533. <https://doi.org/10.3390/ijms21207533>
48. Horn E, Forage J, Sonntag V. Acute treatment of patients with spinal cord injury. Neurologic management. En: Herkowitz HN, Garfin SR, Eismont FJ, Bell GR, Balderston RA. *Rothman-Simeone The spine*, 5<sup>th</sup> ed, Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006, p. 1190.
49. Springer JE, Azbill RD, Knapp P. Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nat Med* 1999;5(8):943-6. <https://doi.org/10.1038/11387>