

EVIDENCIAS PRECLÍNICAS DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA CO-ADMINISTRACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO Y EL PÉPTIDO 6 SECRETAGOGO DE HORMONA DE CRECIMIENTO EN INFARTO CEREBRAL

Autores principales: Diana García del Barco Herrera y Nelvys Subirós Martínez

Otros autores: Jorge Berlanga Acosta, Héctor Pérez-Saad, José Suárez Alba, Jorge Martín, Sandra Rodríguez, Gerardo García Illera, Rosa María Coro y Gerardo Guillen

Colaboradores: Tatiana Zaldívar, Emma Brown, Yaima Rodríguez, Sasha Sánchez, Mariela Vázquez, Manuel Selman, Alain Serra

Entidad ejecutora principal: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)

Otras entidades participantes: Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) y el Instituto de Neurología y Neurocirugía

Autor para la correspondencia:

Dra. Diana García del Barco Herrera, J' del tema de Neuroprotección del proyecto Citoprotección. Dirección de Investigaciones Biomédicas. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31 entre 158 y 190, Reparto Cubanacán, Playa. Habana, Cuba. Apartado Postal 6162. Teléfono: 271 6022 Ext. 3258
E. mail: diana.garcia@cigb.edu.cu

Dr.C Diana García del Barco Herrera (25%). Responsable del tema de Neuroprotección perteneciente al Proyecto Cicatrización-Citoprotección. Concepción de la idea y autor de la patente. Definición de la estrategia del proyecto neuroprotección. Realización de los diseños experimentales. Realización y conducción de los experimentos. Realización de las pruebas estadísticas, análisis y discusión de los resultados. Autora principal de los manuscritos y de los trabajos que sobre el tema se han publicado y presentado en eventos internacionales.

MSc. Nelvys Subirós Martínez (25%). Realización de los diseños experimentales. Realización y conducción de los experimentos. Participó en el análisis y discusión de los resultados. Autora y ejecutora principal de la idea de determinar el grado de anastomosis de los vasos comunicantes y usar ese dato en la interpretación de los resultados. Autora principal de los manuscritos y de los trabajos que sobre el tema se han publicado y presentado en eventos internacionales.

Dr.C Jorge Berlanga Acosta (15%). Jefe del Proyecto de Cicatrización-Citoprotección. Autor de la patente, participó en la concepción de la idea y en la discusión de la definición de la estrategia del proyecto neuroprotección. Participación en la discusión de los diseños experimentales, y en la discusión y análisis de los resultados. Revisión crítica y co-autoría de los manuscritos.

Dr.C Héctor Pérez-Saad (5%). Participó en los diseños experimentales y en la ejecución de experimentos. Participó en la discusión y en la elaboración de los manuscritos.

José Suárez Alba (5%). Técnico especialista en anatomía patológica, participó en las necropsias y en la preparación de las láminas histológicas.

Dr.C Jorge Martín (5%). Participó en el análisis y discusión de los resultados, co-autor y revisor de los manuscritos.

Dr.C Gerardo Guillén (5%). Participó en la concepción de la idea y en la discusión para la definición de la estrategia del proyecto neuroprotección, es co-autor de la patente. Participó en la discusión crítica de los resultados.

Dr.C Rosa María Coro (5%). Participó en el análisis y discusión de los resultados, es co-autora del manuscrito.

Lic. Sandra Rodríguez (5%). Participó en la ejecución de los experimentos quirúrgicos, en las necropsias y en la toma de piezas anatómicas.

Gerardo García Illera (5%). Asesoró los análisis estadísticos de correlación entre grado de anastomosis y grado neurológico.

RESUMEN

Antecedentes: La isquemia cerebral es la tercera causa de muerte y la primera causa de discapacidad en adultos. Hasta el momento no existe un abordaje terapéutico efectivo para reducir los daños asociados al infarto cerebral.

Los resultados de este proyecto relacionados con las evidencias preclínicas del efecto neuroprotector de la co-administración de EGF+GHRP6 como pruebas de concepto para el tratamiento de la Esclerosis múltiples y de la Esclerosis Lateral Amiotrófica han sido premiados por la Academia de Ciencias de Cuba en el año 2013.

Objetivos: En el proyecto de neuroprotección del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología existe una línea de investigación cuyo objetivo es desarrollar alternativas terapéuticas dirigidas al tratamiento de enfermedades del sistema nervioso, y muy especialmente para el infarto cerebral, entidad que constituye uno de los principales blancos para el desarrollo de candidatos terapéuticos neuroprotectores.

Resultados: En el presente trabajo se demuestra por vez primera que en modelos experimentales de infarto cerebral la co-administración de EGF+GHRP6 fue efectiva porque en animales sometidos a isquemia-reperfusión produjo una atenuación de los signos clínicos neurológicos, redujo el área de las zonas de daño cerebral, y conservó la densidad neuronal. La correspondencia entre el resultado clínico beneficioso y la reducción del daño a nivel de tejido es uno de los criterios que con más fuerza definen una buena estrategia de neuroprotección, por lo que estas evidencias constituyen una prueba de concepto robusta del efecto neuroprotector de esta alternativa terapéutica en isquemia cerebral.

Conclusiones: Los efectos neuroprotectores de la combinación EGF+GHRP6 en los modelos de isquemia cerebral global constituyen importantes pruebas de conceptos a favor del uso de esta alternativa terapéutica en clínica. La estrategia de co-administrar el EGF y el GHRP6 como terapia combinada para reducir el impacto del daño isquémico obedece a la idea de que la fisiopatología compleja del infarto cerebral demanda intervenciones terapéuticas combinadas donde los efectos, comunes y/o exclusivos, de los principios activos de cada ingrediente afecten diferentes puntos de la cascada de eventos moleculares y bioquímicos desencadenados por la isquemia.

Los resultados de este trabajo han sido objeto de una patente concedida en diferentes países, publicados en dos revistas arbitradas de alcance internacional e integran el conjunto de resultados que fue Premio Anual de Salud 2013.

COMUNICACIÓN CORTA

Introducción

La isquemia cerebral es la tercera causa de muerte y la primera causa de discapacidad en adultos. Hasta el momento no existe un abordaje terapéutico efectivo para reducir los daños asociados al infarto cerebral. En las enfermedades con base molecular complejas del sistema nervioso, una estrategia terapéutica mediada por la combinación de agentes con diferentes mecanismos de acción en sus efectos protectores, está en concordancia con las nuevas tendencias que defienden el criterio de que tales tipos de enfermedades demandan abordajes terapéuticos complejos, en los cuales la citoprotección juega un papel reconocido tanto en los eventos preventivos como en los eventos regenerativos (1;2).

El factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el péptido-6 liberador de hormona del crecimiento (GHRP₆) han mostrado una variedad de propiedades fisiológicas y farmacológicas en diferentes contextos clínicos y experimentales. El EGF protege a las neuronas y a otras células del proceso de apoptosis (3;4) y contra la excitotoxicidad mediada por ácido glutámico (5). El GHRP₆ induce la expresión del factor de crecimiento tipo 1 similar a la insulina (IGF-1) en diferentes áreas del sistema nervioso (6). Por tanto, los efectos citoprotectores del EGF y del GHRP₆ parecen estar relacionados con sus mecanismos moleculares pleiotrópicos y de supervivencia, los cuales hacen que diferentes tipos celulares sean más tolerantes frente a un amplio espectro de insultos (7-9).

Con estos antecedentes, se decidió evaluar los efectos del EGF y del GHRP₆, solos o en combinación, en los modelos experimentales de isquemia cerebral global.

Resultados y Discusión

Para la evaluación del efecto neuroprotector de la coadministración EGF+ GHRP₆ se emplearon modelos experimentales de isquemia cerebral global, logrado a partir de 15 minutos de oclusión de las arterias carótidas comunes.

La mortalidad del grupo control de vehículo y del grupo tratado con el GHRP₆ fue de un 40%. En los grupos que recibieron la coadministración EGF+ GHRP₆ y el EGF se registró un 100 % de supervivencia (**Fig.1 A**). En este experimento las manifestaciones clínicas predominantes fueron la hipotonía, la hiperactividad y en menor grado los trastornos de la marcha. El grado neurológico del grupo tratado con la combinación fue menor en comparación al de los grupos EGF, GHRP₆ y control de vehículo a las 24 y 48 horas posterior a la reperusión (Fig. 1 B).

En la población de gerbos estudiada en este experimento un 49 % tenía arterias comunicantes bilaterales, un 47 % unilaterales y un 4 % carecía de estos vasos. Con estos datos se realizó un análisis de correlación entre el grado de anastomosis y el grado neurológico y se demostró que en los animales de los grupos control de vehículo y EGF había una correlación inversa entre ambos parámetros. En el grupo que recibió la coadministración EGF+ GHRP₆, no se evidenció esta correlación (Fig.1 C).

El volumen de infarto calculado para todo el encéfalo fue significativamente menor en el grupo que recibió la coadministración EGF+ GHRP₆ respecto al grupo control de vehículo (Fig. 1 D). El 96 % de los animales del grupo control de vehículo tuvo daño tisular y en el grupo tratado con la combinación el 50 % de los animales no tuvo infartos. La densidad neuronal disminuyó en los grupos control de vehículo y GHRP₆ con respecto al control falso operado. En cambio, en los animales tratados con EGF+GHRP₆ la densidad neuronal se preservó en corteza cerebral, caudado putamen e hipocampo (Fig. 1 E).

La caracterización del polígono de Willis que se hizo en este trabajo permitió asegurar que los tiempos de isquemia utilizados en este estudio (15 y 20 minutos para modelo moderado y severo respectivamente), aún en presencia de ambas arterias comunicantes posteriores, producen un daño isquémico reproducible y confiable para la evaluación de candidatos terapéuticos: todos los animales del grupo control de vehículo en el modelo de isquemia severa y el 96 % de los animales del grupo control de vehículo en el modelo de isquemia moderada exhibieron infartos.

En el modelo de isquemia moderada el tratamiento con EGF+GHRP₆ protegió las regiones de corteza cerebral y caudado putamen, y adicionalmente preservó la densidad neuronal en el hipocampo (Fig. 1 E). Esto es de particular importancia,

porque los estudios de neuroprotección que solo evalúan el hipocampo como zona más vulnerable, utilizan modelos de oclusión de 5 o 10 minutos (10;11). El hecho de que la combinación EGF+GHRP₆ preservara las neuronas de esta estructura luego de 15 minutos de isquemia, constituye una evidencia adicional del efecto neuroprotector de la estrategia terapéutica propuesta en el presente trabajo.

Las recomendaciones del consorcio académico-industrial para el desarrollo farmacológico en isquemia cerebral (STAIR) establecen que en los estudios preclínicos el criterio más importante para demostrar neuroprotección es la correspondencia entre los resultados de la evaluación clínica y la morfológica (12;13). En los dos modelos de isquemia de este trabajo se evidenció una correspondencia entre los resultados anatomopatológicos (cualitativos y cuantitativos) y la evolución clínica, lo que constituye una prueba de principio a favor del efecto neuroprotector de la combinación EGF+GHRP₆.

El grado de anastomosis entre los sistemas vertebro-basilar y carotídeo no ha sido considerado previamente (al alcance de nuestra revisión bibliográfica) en la interpretación de los resultados de la evaluación de compuestos neuroprotectores en modelos de isquemia cerebral en gerbil (14-17). En este trabajo se correlacionó el grado de anastomosis del polígono de Willis con el grado neurológico y se demostró que existe una correlación negativa entre ambos parámetros, la cual se pierde con la intervención farmacológica EGF+GHRP₆ (Fig. 1 C). Esto último significa que la acción farmacológica de la combinación EGF+GHRP₆ elimina el efecto negativo de la carencia de vasos comunicantes.

En este trabajo, los resultados del grado neurológico y de las evaluaciones anatomopatológicas (cualitativas y cuantitativas) de los animales tratados con la combinación EGF+GHRP₆ evidenciaron un efecto neuroprotector que no se observó en los animales tratados solamente con EGF o con GHRP₆.

La estrategia terapéutica representada por la combinación EGF+GHRP₆ está en correspondencia con la idea de que para proteger al sistema nervioso después de eventos isquémicos, los tratamientos tienen que proteger a los diferentes tipos de células del tejido nervioso (18;19). El beneficio terapéutico que se obtuvo coadministrando EGF y GHRP₆ se explica por el hecho de que ambas moléculas tienen propiedades que pueden proteger a las células del sistema nervioso. La amplia distribución de los receptores celulares del EGF (20-23) y del GHRP₆ (24;25) en neuronas y glías es una prueba de ello.

Otro resultado importante resultó de la comparación del efecto terapéutico de la combinación EGF+ GHRP₆ con la hipotermia como estrategia neuroprotectora.

El grado neurológico de los animales isquémicos se comportó de manera similar en los grupos tratados con hipotermia y con la co-administración EGF+ GHRP₆, a las 48 y 72 horas posteriores a la reperusión (Fig.2 A) En los animales del grupo falso operado no se registraron manifestaciones clínicas de daño cerebral. La

afectación neurológica más representativa en los animales del grupo vehículo fueron los trastornos de la conducta por hiperactividad, trastornos en la marcha e hipotonía de las patas delanteras.

El volumen de infarto fue menor en los grupos tratados con hipotermia y con la coadministración EGF+ GHRP₆. (Fig. 2 B). La densidad neuronal en Hipocampo (CA1) se preservó en los grupos tratados con hipotermia y con la coadministración EGF+ GHRP₆ (Fig. 2 C), siendo similar a la densidad neuronal del grupo control falso operado.

El tratamiento con hipotermia es considerado como uno de los mejores métodos para inducir neuroprotección (26-28). En este experimento, los resultados del estado neurológico y de las evaluaciones anatomopatológicas de los animales tratados con la combinación EGF+ GHRP₆ evidenciaron un efecto neuroprotector similar al que se obtuvo con la hipotermia.

El tratamiento con la combinación EGF+ GHRP₆ resulta ventajoso porque influye simultáneamente en varios blancos celulares, moleculares y bioquímicos de la unidad neurovascular, y no tendría los efectos adversos atribuibles al procedimiento de hipotermia (29).

El conjunto de evidencias experimentales presentadas en este documento demuestran por vez primera que la combinación de EGF y GHRP₆ como alternativa terapéutica para neuroprotección tiene efectos beneficiosos en modelos experimentales de isquemia cerebral global.

El efecto del tratamiento con la combinación EGF+ GHRP₆ produce un 100% de supervivencia en los animales isquémicos, una mejoría significativa del grado neurológico respecto al grupo control de vehículo y a los tratamientos con EGF y GHRP₆ de manera independiente, y protección de las regiones corteza cerebral, caudado putamen, tálamo e hipocampo asociado a la preservación de la densidad neuronal. En el estudio de la relación dosis-efecto, la co-administración de EGF (100 µg/kg)+ GHRP₆ (600µg/kg), fue superior al resto de las combinaciones, tanto en los parámetros clínicos como en los anatomopatológicos. En el estudio de ventana terapéutica los resultados clínicos y anatomopatológicos de los animales tratados con la combinación EGF+ GHRP₆ evidenciaron un efecto neuroprotector cuando esta se administrada hasta 4 horas después del insulto isquémico. El tratamiento con la combinación EGF+ GHRP₆ produjo efectos similares al procedimiento de hipotermia, evidenciándose un efecto neuroprotector en términos de mejoría clínica del estado neurológico, reducción del volumen de infarto y preservación de la densidad neuronal en la zona CA1 del hipocampo respecto al grupo vehículo. Los animales isquémicos tratados con la co-administración EGF+ GHRP₆ experimentaron el fenómeno de habituación característico de los animales sanos en las dos fases de la prueba de campo abierto, algo que no ocurrió con el grupo control vehículo.

La neuroprotección aplicable a enfermedades neurodegenerativas para detener su curso, o instrumentada para revertir el daño y facilitar eventos regenerativos, es aún una necesidad clínica no cubierta. El aporte práctico y social de estos resultados es la demostración de la utilidad de la combinación EGF+GHRP₆ en el tratamiento de enfermedades isquémicas del sistema nervioso, en las cuales la muerte celular es un elemento común. Estas enfermedades constituyen importantes causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial.

La reproducción de los efectos neuroprotectores de la combinación EGF+GHRP₆ en estudios clínicos constituirá una incuestionable contribución a la medicina contemporánea, así como un indudable beneficio al tratamiento y la calidad de vida de los enfermos, con el consecuente beneficio a sus familias y a la sociedad.

Los resultados de este trabajo llevan a pensar que el concepto de neuroprotección es insuficiente en el contexto de la biología del daño cerebral y que es necesario implementar una praxis más abarcadora que involucre la cerebroprotección.

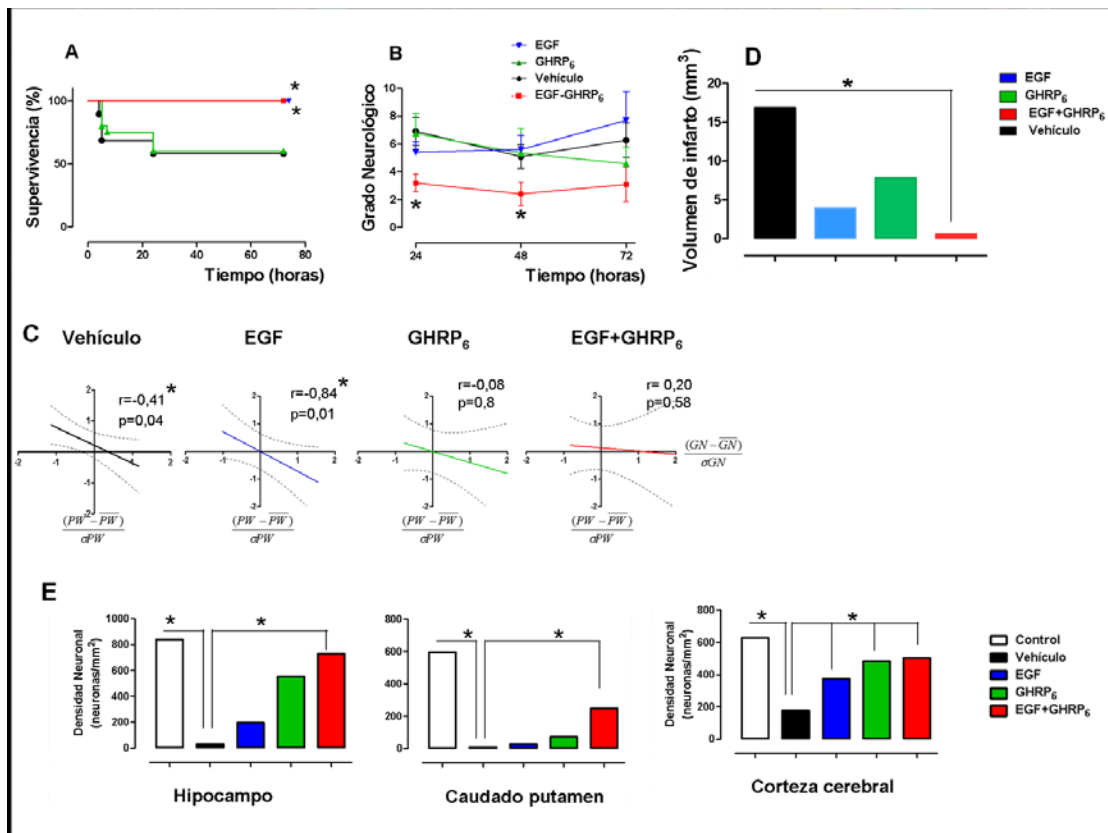


Figura 1. **A:** Curvas de supervivencia de los animales. Prueba de log rank. **B:** Evolución del grado neurológico. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. **C:** Correlación entre el grado neurológico (GN) y el número de arterias del polígono de Willis (PW) en cada grupo experimental del modelo de isquemia cerebral moderada. Prueba de correlación de Spearman. r: coeficiente de correlación de Spearman. **D:** Volumen de infarto en los animales del modelo de isquemia cerebral moderada. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. **E:** Densidad neuronal en corteza, núcleo caudado putamen e hipocampo. Los datos representan las medianas. Prueba de Kruskal Wallis seguida de la prueba de Dunn. Los asteriscos señalan diferencias significativas.

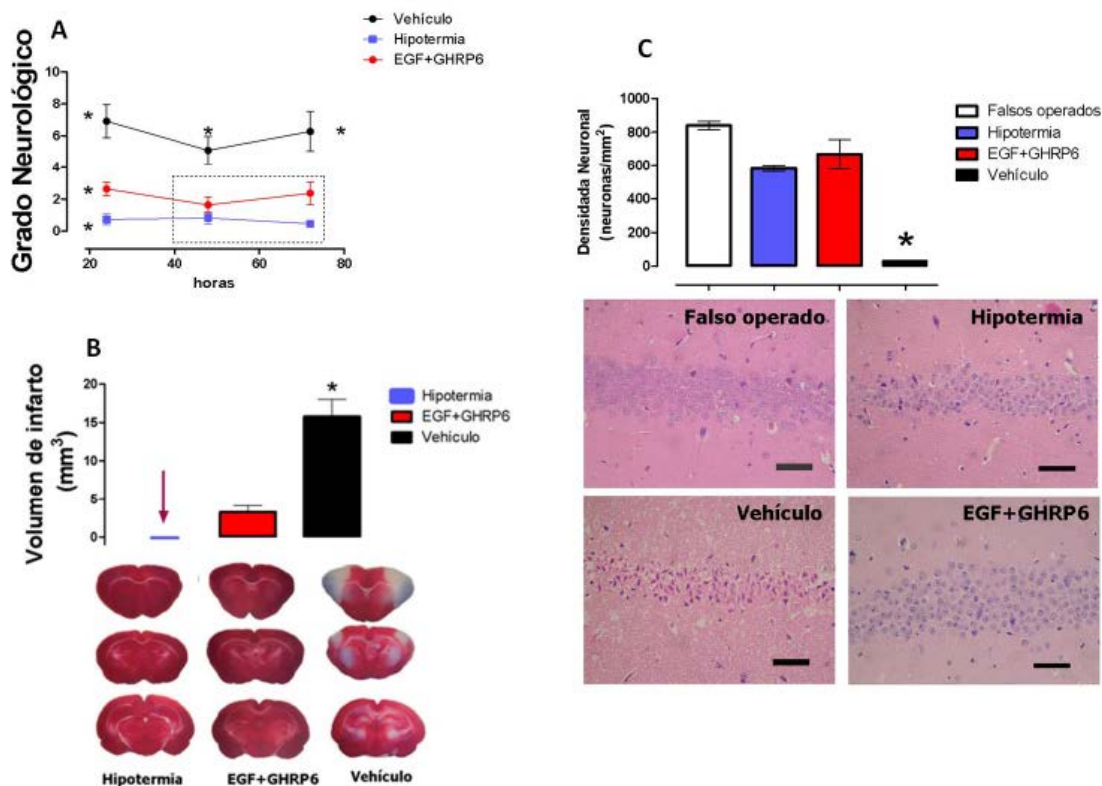


Figura 2. **A:** Grado Neurológico de los animales isquémicos tratados con vehículo, con la combinación EGF+GHRP6 y con hipotermia. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. **B:** Volumen de infarto en los grupos experimentales, vehículo, EGF+GHRP6 e hipotermia. Anova seguida de la prueba de Dunnett. Cortes coronales seriados teñidos con TTC de cada grupo representativo, excepto el del grupo falso operado. **C:** Análisis de la densidad neuronal en hipocampo (CA1). Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. Fotos representativas de la zona CA1 del hipocampo en cada grupo experimental. Los asteriscos indican diferencias significativas.

Referencias

- (1) Kriz J, Gowing G, Julien JP. Efficient three-drug cocktail for disease induced by mutant superoxide dismutase. *Ann Neurol* 2003 Apr;53(4):429-36.
- (2) Zausinger S, Westermaier T, Plesnila N, Steiger HJ, Schmid-Elsaesser R. Neuroprotection in transient focal cerebral ischemia by combination drug therapy and mild hypothermia: comparison with customary therapeutic regimen. *Stroke* 2003 Jun;34(6):1526-32.
- (3) Niidome T, Morimoto N, Iijima S, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H. Mechanisms of cell death of neural progenitor cells caused by trophic support deprivation. *Eur J Pharmacol* 2006 Oct 24;548(1-3):1-8.

- (4) Satoh T, Enokido Y, Kubo T, Yamada M, Hatanaka H. Oxygen toxicity induces apoptosis in neuronal cells. *Cell Mol Neurobiol* 1998 Dec;18(6):649-66.
- (5) Casper D, Blum M. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor protect dopaminergic neurons from glutamate toxicity in culture. *J Neurochem* 1995 Sep;65(3):1016-26.
- (6) Frago LM, Paneda C, Argente J, Chowen JA. Growth hormone-releasing peptide-6 increases insulin-like growth factor-I mRNA levels and activates Akt in RCA-6 cells as a model of neuropeptide Y neurones. *J Neuroendocrinol* 2005 Nov;17(11):701-10.
- (7) Cibrian D, Ajamieh H, Berlanga J, Leon OS, Alba JS, Kim MJ, et al. Use of growth-hormone-releasing peptide-6 (GHRP-6) for the prevention of multiple organ failure. *Clin Sci (Lond)* 2006 May;110(5):563-73.
- (8) Berlanga J, Cibrian D, Guevara L, Dominguez H, Alba JS, Seralena A, et al. Growth-hormone-releasing peptide 6 (GHRP6) prevents oxidant cytotoxicity and reduces myocardial necrosis in a model of acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)* 2007 Feb;112(4):241-50.
- (9) Berlanga J, Caballero ME, Ramirez D, Torres A, Valenzuela C, Lodos J, et al. Epidermal growth factor protects against carbon tetrachloride-induced hepatic injury. *Clin Sci (Lond)* 1998 Mar;94(3):219-23.
- (10) Plahta WC, Clark DL, Colbourne F. 17beta-estradiol pretreatment reduces CA1 sector cell death and the spontaneous hyperthermia that follows forebrain ischemia in the gerbil. *Neuroscience* 2004;129(1):187-93.
- (11) Calapai G, Marciano MC, Corica F, Allegra A, Parisi A, Frisina N, et al. Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharmacol* 2000 Aug 11;401(3):349-56.
- (12) Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 1999 Dec;30(12):2752-8.
- (13) Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke* 2009 Jun;40(6):2244-50.
- (14) Radenovic L, Selakovic V, Janac B, Andjus PR. Neuroprotective efficiency of NMDA receptor blockade in the striatum and CA3 hippocampus after various durations of cerebral ischemia in gerbils. *Acta Physiol Hung* 2011 Mar;98(1):32-44.

- (15) Kim JM, Kim S, Kim DH, Lee CH, Park SJ, Jung JW, et al. Neuroprotective effect of forsythiaside against transient cerebral global ischemia in gerbil. *Eur J Pharmacol* 2011 Jun 25;660(2-3):326-33.
- (16) Lee H, Bae JH, Lee SR. Protective effect of green tea polyphenol EGCG against neuronal damage and brain edema after unilateral cerebral ischemia in gerbils. *J Neurosci Res* 2004 Sep 15;77(6):892-900.
- (17) Kirby BP, Shaw GG. The neuroprotective effects of N1-dansyl-spermine in the gerbil model of cerebral ischaemia. *Brain Res* 2004 Jun 11; 1011(1):74-83.
- (18) Guo S, Lo EH. Dysfunctional cell-cell signaling in the neurovascular unit as a paradigm for central nervous system disease. *Stroke* 2009 Mar;40(3 Suppl):S4-S7.
- (19) Lo EH. Experimental models, neurovascular mechanisms and translational issues in stroke research. *Br J Pharmacol* 2008 Mar;153 Suppl 1:S396-S405.
- (20) Kinoshita A, Yamada K, Hayakawa T, Kataoka K, Mushiroi T, Kohmura E, et al. Modification of anoxic neuronal injury by human recombinant epidermal growth factor and its possible mechanism. *J Neurosci Res* 1990 Mar;25(3):324-30.
- (21) Simpson DL, Morrison R, de VJ, Herschman HR. Epidermal growth factor binding and mitogenic activity on purified populations of cells from the central nervous system. *J Neurosci Res* 1982;8(2-3):453-62.
- (22) Sun Y, Goderie SK, Temple S. Asymmetric distribution of EGFR receptor during mitosis generates diverse CNS progenitor cells. *Neuron* 2005 Mar 24;45(6):873-86.
- (23) Planas AM, Justicia C, Soriano MA, Ferrer I. Epidermal growth factor receptor in proliferating reactive glia following transient focal ischemia in the rat brain. *Glia* 1998 Jun;23(2):120-9.
- (24) Delgado-Rubin A, Chowen JA, Argente J, Frago LM. Growth hormone-releasing peptide 6 protection of hypothalamic neurons from glutamate excitotoxicity is caspase independent and not mediated by insulin-like growth factor I. *Eur J Neurosci* 2009 Jun;29(11):2115-24.
- (25) Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, et al. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 1997 Aug;48(1):23-9.
- (26) Blanco D, Garcia-Alix A, Valverde E, Tenorio V, Vento M, Cabanas F. [Neuroprotection with hypothermia in the newborn with hypoxic-ischaemic encephalopathy. Standard guidelines for its clinical application]. *An Pediatr (Barc)* 2011 Nov;75(5):341-20.

(27) Li J, Benashski S, McCullough LD. Post-stroke hypothermia provides neuroprotection through inhibition of AMP-activated protein kinase. *J Neurotrauma* 2011 Jul;28(7):1281-8.

(28) Weng Y, Sun S. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest in adults: mechanism of neuroprotection, phases of hypothermia, and methods of cooling. *Crit Care Clin* 2012 Apr;28(2):231-43.

(29) Nielsen N, Sunde K, Hovdenes J, Riker RR, Rubertsson S, Stammet P, et al. Adverse events and their relation to mortality in out-of-hospital cardiac arrest patients treated with therapeutic hypothermia. *Crit Care Med* 2011 Jan;39(1):57-64