

# Efectos de un derivado benzopirónico en el edema cerebral experimental por frío en el conejo

C. Góngora Castillo - I. Alvarez Gómez de Segura - A. López Bravo - E. de Miguel del Campo

Servicio de Cirugía Experimental, Hospital «La Paz»  
Madrid (España)

## RESUMEN

Se analizan en este trabajo las alteraciones parenquimatosas en el edema cerebral del conejo ocasionado por agresión térmica (frío), basado en estudios ultraestructurales de microscopía electrónica de transmisión y los efectos sobre estas lesiones de un derivado benzopirónico (F-117 Hidrosmina). La lesión se indujo con CO-2 sólido, aplicado sobre la duramadre en el hemisferio izquierdo previa craneotomía. Se emplearon 40 conejos, distribuidos en 5 grupos (n=8): un grupo control y 4 grupos tratados, en uno de los cuales se administró la droga sin daño cerebral previo. En aquellos animales donde se emplearon dosis de 50 mgs/Kg peso se observaron áreas focales y difusas de edema alternando con otras zonas menos afectadas; es evidente este edema a nivel de la sustancia blanca así como la disociación de las fibras mielínicas y la tumefacción intracitoplasmática de las células gliales, contrastando con los hallazgos histopatológicos en aquellos animales donde se emplearon dosis superiores (100 mg/Kg peso). En este grupo (V) el edema extracelular fue escaso, la desorganización de las fibras mielínicas no fue importante y no existió degeneración vacuolar en las mismas. Tampoco se observan cambios estructurales de las mitocondrias.

Se plantea como un posible mecanismo de acción el que la disrupción de la barrera hematoencefálica provocada por el frío conlleve a la apertura de las uniones endoteliales de los capilares alterando también su membrana, propiciando de esta manera que la molécula penetre libremente en el parénquima cerebral.

Asimismo se enfatiza, según nuestras observaciones, que la molécula F-117 Hidrosmina puede ser capaz de incrementar la actividad de los macrófagos a nivel cerebral y contribuir de igual forma a un aumento de la proteólisis o de movilizar proteínas en exceso del espacio extracelular.

## SUMMARY

On this study, parenchymal changes during a cerebral edema caused by thermal injury (cool) on the rabbit, are analyzed. The work was based on the ultrastructural findings obtained by transmission electronic microscopy and on the effects produced by a benzopironic derived (F-117 Hy-

## Introducción

La agresión térmica por frío ha sido empleada en múltiples ocasiones como modelo experimental para producir lesiones focales en el parénquima cerebral (2, 3). Este edema que se produce a nivel del órgano ha sido clasificado en vasogénico y citotóxico, lo cual implica diferentes patrones fisiopatológicos, histológicos, evolutivos y en consecuencia diferentes enfoques terapéuticos. Como su nombre indica, el tipo vasogénico es consecuencia del daño de la microvasculatura cerebral mientras que el citotóxico es, presumiblemente, el resultado de lesiones en las células del cerebro (4, 6).

Las correlaciones clínicas con los modelos experimentales han sugerido que el traumatismo craneal y los tumores cerebrales que originan edema semejan más al tipo vasogénico, mientras que los trastornos metabólicos, tales como intoxicación hídrica, coma diabético, uremia, etc., al citotóxico.

En este trabajo experimental hemos inducido el edema vasogénico en el conejo mediante agresión térmica por frío. Se ha tenido en consideración, además, que la composición del líquido en el espacio intersticial fuese alterado por los efectos de la hipoxia, lo cual es frecuente por los problemas respiratorios que se derivan del daño encefálico.

Considerando los efectos de los derivados benzopirónicos para «remover» proteínas en exceso del es-

*drosmína). The injury was produced with solid CO<sub>2</sub>, previous a craniectomy, on the duramater of the left hemisphere. Forty rabbits were included into the study, the animals were distributed into five groups (n=8): a control group and 4 treatment groups. One of the groups received treatment without previous cerebral injury. The group of rabbits with dosis of 50 mg/Kg of weight showed focal and difuse areas of edema alternating with less damaged areas, the edema was evident on the white substance. This group also showed a disociation of the myelinic fibers and an intracytoplasmatic tumefaction into the glial cells. These findings contrast with the histopathological findings obtained from the rabbits (V), the extracelular edema was poor, the myelinic fiber desorganization was minimal with no vacuolar degeneration and no structural mitochondrial changes had been showed.*

*The discontinuance of the hematoencephalic barrier caused by the cool could be a possible mechanism that causes the opening of the endothelial unions from the capilar vessels, changing their membranes and resulting in a free penetration of the molecule into the cerebral parenchyma.*

*On the same way, it is remarkable that F-117-Hydrosmina could be able to produce an increment on the activity of the cerebral macrophages and could stimulate the proteolysis or the movilization of an excess of proteins from the extracelular space.*

pacio extracelular, su acción sobre la microcirculación y factores hemorreológicos, así como de su capacidad para crear condiciones fisiológicas capaces de activar la circulación linfática (1, 9, 10, 12) nos propusimos conocer los efectos de una molécula flavonoide hidrosoluble, derivado benzopirónico: F-117 Hidrosmina, sobre el edema cerebral experimental.

## Material y método

Para el estudio se emplearon 40 conejos de raza neozelandesa (n=8), peso promedio de 3,5 Kgs, distribuidos en los siguientes grupos:

### Grupo Control:

Grupo I. — Edema cerebral+Sue-ro salino 0,9%, dosis 6,6 mls/Kg peso I.V. cada 12 horas, 20 minutos después del daño durante 24 horas.

### Grupos Tratados:

Grupo II. — Sin Edema cerebral+F-117, dosis 100 mgs/Kg peso I.V. cada 12 horas, durante 24 horas.

Grupo III. — Edema cerebral+F-117, dosis 100 mgs/Kg peso I.V. administrado desde 24 horas antes de la intervención y continuado el tratamiento cada 12 horas a los 20 minutos de la lesión durante las 24 horas siguientes.

Grupo IV. — Edema cerebral+F-117, dosis 50 mgs/Kg peso I.V. cada 12 horas, a partir del daño cerebral y continuado el tratamiento como en los grupos precedentes.

Grupo V. — Edema cerebral+F-117, dosis 100 mgs/Kg peso I.V. cada 12 horas, a partir de los 20 minutos de originado el daño cerebral, por espacio de 24 horas.

Se empleó para la anestesia una mezcla de Tiletamina y Zolacepam a las dosis habituales y mantenimiento de la anestesia mediante mascarilla (Isoflurano vaporizado en una mezcla de oxígeno/protóxido/nitrógeno). Se realizó incisión en el cráneo, a nivel de la línea media, hasta el periostio y craniectomía de 20 mm de longitud en la región parietal iz-

quierda. Se provocó el daño cerebral por aplicación de CO<sub>2</sub> sólido sobre la duramadre, protegida ésta con una lámina de plástico, por espacio de 2 minutos y sobre el surco intramarginal izquierdo. Transcurridos 20 minutos se inició la administración de la droga.

Los animales fueron sacrificados a las 24 horas siguientes, posteriormente se realizó una perfusión por ambas carótidas primitivas de una solución al 10% de formol y 90% de suero fisiológico, hasta obtener líquido claro procedente de las venas del cerebro (venotomía de yugulares). A continuación se extrajeron los cerebros en bloque, las muestras para análisis se tomaron del hemisferio izquierdo (sustancia blanca, gris e hipotálamo). De cada uno de estos tres sitios se prepararon los cortes para su estudio. La posterior interpretación de los resultados se realizó siempre por el mismo investigador e ignorando éste la asignación de las piezas a los grupos controles y tratados, empleando método de randomización para el examen de los cortes histológicos, así como estudio ciego procedentes de diferentes bloques de cada región y cada animal.

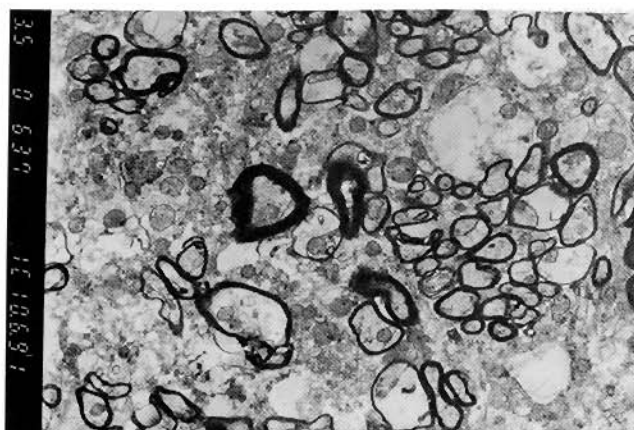
La fijación de las muestras para microscopía electrónica de transmisión (M.E.T.) se realizó por inmersión de las mismas en una solución de formol al 0,1% y glutaraldeído al 0,25% y tampón fosfato 0,2 M, pH: 7,7,5 y a temperatura de 4° C. La tinción se llevó a cabo con colorantes alcalinos a base de plomo. Se empleó un microscopio Ultracud y Microscopio Electrónico Hitachi 7000.

Para la Microscopía Óptica las piezas fueron adecuadamente tratadas según los métodos convencionales.

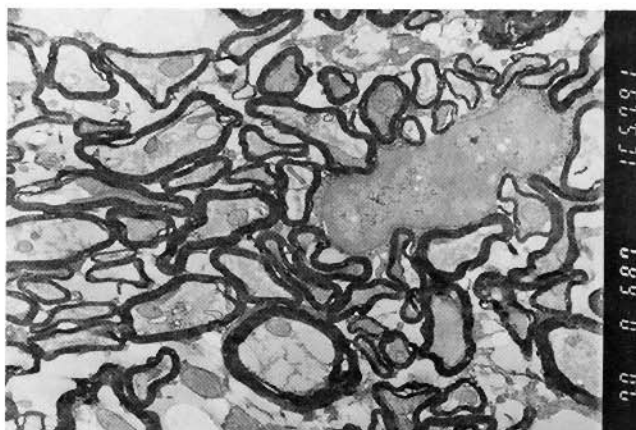
## Resultados

### Grupo Control: I

En los cortes histopatológicos de las piezas de los animales del Gru-



**Fig. 1** - Corte a nivel de la sustancia blanca correspondiente al grupo control de edema cerebral sin tratamiento visto al microscopio electrónico de transmisión. Se destaca el edema extracelular con disociación e hipodensidad de fibras mielínicas. Grados variables de gliosis reactiva.



**Fig. 2** - Corresponde al grupo en que administró F-117 Hidrosmine, 24 horas antes y después de la lesión encefálica. Se observa edema intersticial moderado. Escasas alteraciones en fibras mielínicas. Elementos gliales bien conservados con aumento de la población astrocitaria, según la M.E.T.

po I (Edema Cerebral+Suero Salino), se observó macroscópicamente tumefacción cerebral difusa con aplanamiento de las circunvoluciones. La microscopía óptica reveló la presencia de zonas focales con edema alternando con otras difusas, aumento del espacio extracelular, grados variables de gliosis reactiva de pequeña intensidad y separación de las fibras mielínicas. La M.E.T. permitió comprobar un edema generalizado a nivel de la sustancia blanca con hipodensidad acompañada de disociación de las fibras de mielina y edema perivascular en algunos capilares. Las mitocondrias presentan escasas alteraciones estructurales y el espacio extracelular aumentado. Se destaca una importante degeneración vacuolar en las fibras mielínicas (Fig. 1).

En la microscopía óptica de los cortes pertenecientes al Grupo II (administración de la droga sin edema cerebral) no se detectan alteraciones histopatológicas. El estudio mediante microscopía electrónica de transmisión no muestra alteraciones de los astrocitos. A nivel de la sustancia blanca se conservan las estructuras mielínicas y de oligodendroci-

tos. No existen cambios en las mitocondrias. Ausencia de edema perivascular en los capilares.

#### **Grupos Tratados: II-III-IV-V**

En el Grupo III (administración de F-117 Hidrosmine, 24 horas antes de la intervención y seguido el tratamiento durante las 24 horas siguientes del daño cerebral) se observan diferentes grados de congestión vascular en la microscopía óptica (M.O.), así como una gliosis reactiva de grado moderado con aumento de la población astrocitaria y nucleolos. Existen algunas zonas de hemorragia cerebral. La M.E.T. revela la presencia de edema intersticial moderado con elementos gliales bien conservados y escasas alteraciones en las fibras mielínicas (Fig. 2).

En la microscopía óptica de los cortes histológicos pertenecientes al Grupo IV (administración de la droga a los 20 minutos de la lesión cerebral, cada 12 horas y durante 24 horas) se observan áreas focales y difusas de edema alternando con otras áreas menos afectadas. En la microscopía electrónica se demuestra la existencia de edema intersticial a nivel de la sustancia blanca

con disociación de fibras mielínicas. Existe tumefacción intracitoplasmática en células gliales y estructuras nucleares bien conservadas (Fig. 3).

Por último en el Grupo V, a cuyos animales se administró la droga a dosis mayores (100 mgs/Kg peso) se observa en la microscopía óptica escaso edema intersticial vascular, así como ausencia de hemorragia cerebral con aumento moderado de la celularidad. Los hallazgos en el examen ultraestructural confirman un discreto edema intersticial, escasa desorganización de las fibras mielínicas con ausencia de degeneración vacuolar en las mismas. Es apreciable la disminución del espacio extracelular, la ausencia de alteraciones estructurales en mitocondrias y densidad normal en las fibras mielínicas (Fig. 4).

#### **Discusión**

Históricamente se ha negado la existencia de linfáticos en el cerebro, sin embargo su presencia ha sido admitida en aracnoides y piamadre. **Virchow y Robin** (citado por **Casley-Smith**, 3) han señalado que las vainas perivasculares presentes en el cerebro pueden considerarse vías





Fig. 3 - Al M.E.T. se observa en este corte histológico, disociación de fibras de mielina con edema intersticial a nivel de la sustancia blanca. Existe tumefacción intracelular de células gliales. Corresponde al grupo de animales tratados a dosis de F-117 H:50 mgs/Kg peso.

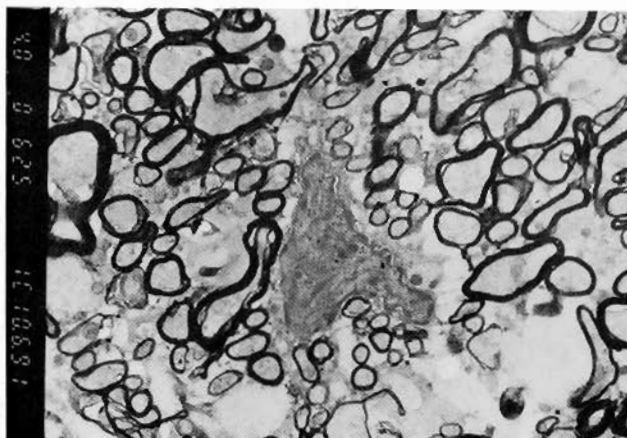


Fig. 4 - Se observa escaso edema intersticial, en la M.E.T., con aumento de la celularidad y ausencia de degeneración vacuolar en fibras de mielina. Se observan células gliales bien conservadas. Este corte pertenece al grupo tratado a dosis de 100 mgs/Kg peso del medicamento.

de drenaje linfático. **Casley-Smith** (4) ha afirmado que el drenaje linfático de este órgano se realiza a través de «los espacios de Virchow-Robin», considerado como el sistema prelinfático y el que se ha definido como un conjunto de canales por los que tienen que discurrir los fluidos intersticiales antes de entrar en el linfático verdadero o inicial. En el cerebro estos canales están presentes a todo lo largo de la membrana basal de los capilares cerebrales y están conectados con canales en la adventicia de las arterias del encéfalo y Polígono de Willis (4, 5).

El análisis de nuestros resultados se ha realizado tomando como punto de referencia el grupo control (I), lo que ha permitido evaluar la intensidad y gravedad del edema cerebral en relación a los grupos tratados con F-117 Hidrosmina (II-III-IV-V). Observamos, así, que en el Grupo III (administración de la droga antes y después del daño encefálico) se observó por microscopía electrónica de transmisión una reducción moderada del edema extracelular con aumento de astrocitos y de nucleolos, lo cual corresponde a un fenómeno de adaptación celular y de respu-

ta a la agresión térmica.

Relacionando los hallazgos histopatológicos del Grupo IV (droga administrada a dosis de 50 mgs/Kg a continuación del daño cerebral) con el grupo precedente (III), tratados antes y después de la agresión térmica, el patrón de lesiones parenquimatosas varía, el edema extracelular es mayor y evidente la disociación de fibras mielínicas con importante tumefacción citoplasmática, aunque las estructuras nucleares aparecen bien conservadas. Las dosis elevadas de Hidrosmina (100 mgs/Kg) en el Grupo V conducen a una reducción apreciable del edema intersticial, escasa desorganización de las fibras mielínicas con ausencia de degeneración vacuolar en las mismas y sin alteraciones estructurales en las mitocondrias. Corresponde a los Grupos III y V menor intensidad de los cambios estructurales parenquimatosos y un edema intersticial menos acentuado. Se deduce, como se ha comprobado con otras moléculas, que este flavonoide, en su condición de derivado benzopirónico, sea capaz de aumentar la actividad macrofágica y/o la proteólisis a nivel encefálico, o que la misma sea ca-

paz de remover proteínas en exceso del espacio intersticial hacia las vías pre-linfáticas (espacios de Virchow-Robin) (7, 8, 11).

Este efecto farmacológico puede ser ejercido «per se» o requerir moléculas intermediarias o sistemas de transporte específico. Pensamos, por otra parte, que la disrupción de la barrera hematoencefálica ocasionada por frío, al abrir las uniones endoteliales de los capilares y alterar también su membrana, contribuya a favorecer que esta droga penetre libremente al parénquima cerebral. Teniendo en cuenta, además, la estructura química de esta molécula (presencia de radicales hidróxilos), no se excluye un efecto antioxidante si aceptamos que el «stress» oxidativo desencadenado por el daño cerebral induzca a un incremento de los mismos.

**Casley-Smith** ha señalado que dosis elevadas de estas sustancias, empleadas experimentalmente, poseen el efecto de abrir estas uniones, además de incrementar la vasomotricidad linfática y la proteólisis tisular (5). Nosotros hemos observado que cuando el daño neurológico no es de larga duración y en conse-

cuencia no se han establecido lesiones irreversibles, el derivado benzopirónico f-117 Hidrosmina ha hecho posible reducir los cambios histopatológicos a nivel encefálico.

A la luz de los hallazgos obtenidos por M.E.T., parece ser que el efecto farmacológico de esta molécula lo constituye «una simple fagocitosis». Estudios realizados por **Casley-Smith** (4) plantean que la lisis de las proteínas extravasadas es «probablemente» realizada por los macrófagos (estudios «in vitro» y corroborados por Microscopía Electrónica). **Piller** (13) ha comprobado que estos compuestos benzopirónicos aumentan la proteólisis por activación de las proteasas de los macrófagos (13).

Es posible que la droga estudiada por nosotros actúe fundamentalmente sobre las zonas lesionadas si tenemos en cuenta los resultados del Grupo II, a los que se administró el medicamento sin daño neurológico previo. En consecuencia no se puede descartar que esta molécula (F-117 Hidrosmina) ejerza su acción en situaciones donde se acumulen

y activen células mediadoras de la proteólisis farmacológica, propiciando de esta forma un aumento del nivel de proteínas extraídas del espacio extracelular.

## BIBLIOGRAFIA

1. ARTURSON, G.: Effects of O-(B-Hydroxyethyl)-rutosides (HR) on the increased microvascular permeability in experimental skin burns. «Acta Chir. Scand.», 138: 111, 1972.
2. BAETHMANN, A.: Mediators of brain edema and secondary brain damage. «Critical Care Medicine», 16: 972-978, 1988.
3. CASLEY-SMITH, J. R.: The fine structural effects of benzo-pyrones on cold injury of the brain and skin, with and without linfoedema. «Brit. J. Exp. Path.», 5, 15-29, 1975.
4. CASLEY-SMITH, J. R.: Fine structural studies of the prelymphatic systems of the brain and eye. «Progress in Lymphology», XI, 1988.
5. CASLEY-SMITH, J. R.: Efecto de las Benzopironas sobre el sistema sanguíneo, hístico y linfático. «Folia Angiológica», 54, 1/2: 7-22, 1976.
6. FÖLDI, E.: Treatment of experimental vasogenic cerebral edema with benzopyrones. «Blood Vessels», 12, 98-102, 1975. Innerarity tono.
7. FÖLDI, M.: Traitement médical des oedemes lymphatiques. «Rev. Prec. Med.», 6, 48, abril, 1990. «Congreso de Angiología. Roma», Sept. 1990.
8. FÖLDI, M.: «Progress in Lymphology». Ed. A. Ruttimann, 266-268. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, 1967.
9. HAMMERSER, F.: The fine structure of different types of experimental edemas for testing the effect of vasoactive drugs demonstrated with a flavonoid. «Angiológica», 9, 194-22, 1972.
10. INNERARITY, A., ORJALES, A.: Efecto del F-117 Hidrosmina sobre el tono venoso. «Rev. Farm. Clin. Exp.», 3, 209, 1986.
11. JIMENEZ COSSIO, J. A.: Symposium sobre insuficiencia venolinfática: Nuevas perspectivas en terapéutica flebológica. XV Congreso Mundial de Angiología. Roma, Set. 1990.
12. MARCELON, G.: Effect du Ruscus sur la pression et le débit lymphatique périphérique. «Rev. Prec. Med.», 6, 36, Abril 1990.
13. PILLER, N. B.: Benzopyrones: Their selective injury to rabbit vascular endothelium. «Clin. Exp. Pharmacol.», 3: 127, 1976.