



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas
Departamento de Ciencias Ambientales
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

Efectos de la administración crónica de prednisona
sobre memoria, integridad neuronal y reactividad glial
en ratas adultas

TESIS

que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS DEL COMPORTAMIENTO
(opción Neurociencias)

presenta:

Rocío Elizabeth González Castañeda

Comité Tutelar

Mtro. Diego César Ramos Remus (Director)

Dr. Jorge Juárez González

Dr. Jacinto Bañuelos Pineda

Asesor (es):

Dr. Joaquín García Estrada

Dr. Óscar Porfirio González Pérez

Guadalajara, Jalisco

Febrero de 2003

Dedicatorias

A Óscar mi esposo, por las experiencias que juntos hemos compartido, por su amor, apoyo incondicional y por estar siempre presente cuando más lo necesito. Ahora en especial dedico también este trabajo a ese pequeño ser que me llena de alegría con tan sólo pensar que pronto llegara.

A mis padres, por ser la plataforma firme donde siempre puedo aterrizar, por que sé que pase lo que pase cuento con Ustedes para compartir las cosas buenas o malas de la vida, por todo su apoyo y amor, les estaré eternamente agradecida!.

A mis hermanos Tomás, Miguel, Alfonso y especialmente a Sandra la queridísima "flaca", por que son una parte muy importante en mi vida, por que cuento con su apoyo incondicional y por que me llena de orgullo saber que cada uno cumplirá sus metas por difíciles que éstas sean de alcanzar y se esforzarán por ser mejores cada día.

No quiero dejar pasar la oportunidad de mencionar también a: Ing. Jorge, Betty, Ing. Tomás (Quicho), Miriam, Juan, Sandra, Alfredo, Chuy y Francisco, Por su confianza y apoyo. Por el tiempo compartido, por las experiencias amargas que ahora sólo forman parte de recuerdos lejanos y por que es mejor pensar en las cosas buenas que nos quedan por compartir.

Y por último, pero no menos importante, ofrezco una dedicatoria a la memoria de mis abuelos, especialmente a mi abuelita Ma. De Jesús, por que aunque no este físicamente con nosotros, esta presente en cada momento a través de su recuerdo, el cual permanecerá por siempre en nuestra memoria.

Con cariño:

Rocío E. González C.

Agradecimientos

A través de estas breves líneas, agradezco a las instituciones que contribuyeron con los soportes financieros, de infraestructura y académicos para culminar con esta investigación.

**Departamento de Reumatología del Hospital de Especialidades,
Centro Médico Nacional de Occidente, IMSS.**

**Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), en
particular al Laboratorio de Neuroendocrinología Celular de la
División de Neurociencias, IMSS.**

**Fondo de Fomento a la Investigación (FOFOI)
Proyecto número FP0038/1191, del Instituto Mexicano del Seguro
Social.**

**Instituto de Neurociencias, programa de Doctorado en Cs. Del
Comportamiento (opción neurociencias).
Universidad de Guadalajara**

**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)
Becario No. 153614**

Agradecimientos

Dr. César Ramos-Remus. Por haberme brindado la oportunidad de conocerlo y el honor trabajar con Usted, por sus enseñanzas respecto al curso recto y honesto que debe guardarse siempre en esta profesión, la vida y la familia. Por todo ello y por su apoyo absoluto, consejos y confianza. ¡Un millón de gracias!

Dr. Joaquín García Estrada. Por permitirme ser parte de su equipo de trabajo durante todo este tiempo que llevo en su laboratorio, por su empeño en la organización y por su apoyo para la realización de este trabajo, Muchas gracias!!, aprovecho también esta oportunidad para agradecer a la **Dra. Sonia Luquín**, por su disposición de conseguir el material o equipo que uno necesite para realizar alguna prueba y por los momentos de convivencia que hemos compartido, Muchas gracias!!

Dr. Óscar P. González Pérez. Me resulta difícil encontrar las palabras exactas para expresarte mi gratitud por haber sido la persona que tanto me ha enseñado del difícil camino de la investigación y que a su vez me motivo para seguir adelante. Te agradezco también la oportunidad que me brindaste de trabajar, aprender y convivir contigo durante estos años. Con todo y tu genio, la verdad es que eres un gran ejemplo de perseverancia para todos nosotros.

M. en C. Martha Eugenia Morales V. Por todos estos años que juntas hemos pasado ante distintas situaciones, por tu apoyo y amistad incondicional, eres única, nunca me dejaste caer y menos aún perdiste la confianza en mí. Muchísimas gracias!!

Dra. Alicia Navarro Ruíz. Por hacerme ver que en esta vida existen cosas más importantes que uno nunca toma en cuenta y por los todos los momentos agradables que compartimos, Muchas gracias!.

Agradecimientos

Tec. Angélica González Ballesteros. Por tu preocupación, por la disposición de ayudarnos siempre, por darme ánimos y por las dietas de la lechuga que ni siquiera comenzamos, Mil gracias!

Dra. Virginia Medina Hernández. Por permitirme aprender aunque sea un poco a través de tus pláticas sobre las experiencias que has tenido en la psiquiatría.
Psic. Carlos Eduardo Valencia. El famoso "parce", gracias por los momentos compartidos y por tus ocurrencias, también por los "aires internacionales" que diste al laboratorio.

MCP. Estela Adriana Castellanos y MCP Zarela Lizbeth Chinolla. Las integrantes más nuevas del laboratorio, pero no menos queridas, tengo mucho que agradecerles también por contagiarme de su buen humor, su apoyo, también por su disposición incondicional para el trabajo y por aquellas "parrandas" en casa.

Dr. Jorge Juárez G. y Dr. Jacinto Bañuelos P. Por su asesoría durante la maestría, sus observaciones y sugerencias para la realización de esta investigación, Muchas Gracias!!

A todos Ustedes, que nunca perdieron la esperanza de ver este trabajo terminado y que en mayor o menor medida contribuyeron para hacer posible la culminación de este trabajo, mi más sincero agradecimiento.

Rocío E. González C.

ABREVIATURAS Y SIGLAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
I. — INTRODUCCIÓN	
Historia de los glucocorticoides	4
Mecanismo de acción de los glucocorticoides	5
Distribución de los receptores a glucocorticoides en SNC	6
Glucocorticoides sintéticos	7
Prednisona	8
Efecto adverso de los glucocorticoides	9
Glucocorticoides y daño del tejido nervioso	11
Respuesta celular al daño del tejido nervioso	11
II. — ANTECEDENTES	17
III. — PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
IV. — HIPÓTESIS	21
V. — OBJETIVOS	21
VI. — MATERIAL Y METODOS	
Diseño experimental	22
Descripción de los métodos de estudio	22
Evaluación de memoria	24
Perfusión intravascular	26
Tinción con hematoxilina de Harris y eosina	27
Análisis de la población neuronal	28
Inmunocitoquímica para identificación de astrocitos	29

Inmunohistoquímica para identificación de microglia	31
Análisis morfométrico (Astrocitos y Microglia)	32
Análisis estadístico	34

VII.- RESULTADOS

Análisis de adquisición y retención de memoria	37
Análisis celular cuantitativo	42
Neuronas	42
Análisis inmunocitoquímico de astrocitos	44
Análisis inmunohistoquímico de microglia	48

VIII.- DISCUSIÓN

PDN y la Adquisición de Memoria	52
Efecto de la Prednisona sobre la población celular (Neuronas, Astrocitos y Microglia)	54

IX.- CONCLUSIONES

Conclusiones	61
--------------	----

X.- BIBLIOGRAFIA

62

Anexo I

Anexo II

Abreviaturas y siglas

ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
Ca⁺⁺	Calcio
CORT	Corticosterona
CRH	Corticotropina
EAA	Aminoácido excitatorio
GABA_A	Ácido gamma- aminobutírico
GCs	Glucocorticoides
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GRs	Receptor a glucocorticoides
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HPA	Eje hipotálamo-hipófisis
IFγ	Interferon gamma
IgG	Inmunoglobulina G
IL-1	Interleucina tipo 1
IL-4	Interleucina tipo 4
K⁺	Potasio
LES	Lupus eritematoso sistémico
MRs	Receptor a mineralocorticoides
Na⁺	Sodio
NMDA	N-metil-D-aspartato
PVN	Núcleo paraventricular
RNA	Ácido-ribonucleico
SNC	Sistema nervioso central
TNF-α	Factor de necrosis tumoral
5-HT	Serotonina

Antecedentes: Los niveles séricos elevados de glucocorticoides y la terapia con prednisona (PDN) se han asociado con depresión, estrés post-traumático y algunas disfunciones cognitivas en humanos.

Objetivo: Evaluar si la administración crónica (90 días) de PDN produce trastornos en el aprendizaje y la retención de memoria asociado con degeneración neuronal y cambios gliales cerebrales.

Metodología: Se estudiaron ratas macho Wistar. El grupo control-vehículo recibió por vía oral 0.1 ml de agua destilada. Al grupo prednisona se le administró 5mg/kg de PDN por día, que equivale a una dosis moderada utilizada en la clínica. La adquisición y retención de memoria se evaluaron mediante el laberinto acuático de Morris. Se evaluó el índice de neuronas degeneradas. También se analizó el número y transformación citoplásmica de los astrocitos y células de microglia en corteza prefrontal, cuerpo estriado y CA1 del hipocampo.

Resultados: La administración de PDN causó daño en la adquisición y retención de memoria cuando se comparó con el grupo control. Además, el índice de neuronas degeneradas en la corteza prefrontal y en el hipocampo CA1 fue significativamente mayor en el grupo PDN. El número y transformación citoplásmica de los astrocitos también fue significativamente mayor. El número de células de microglia marcadas con isolectina B-4, fue mayor en la corteza prefrontal en el grupo tratado con PDN. No se encontraron diferencias en la región del hipocampo CA1.

Conclusión: Estos resultados sugieren que la exposición crónica de PDN produce daño en la adquisición y retención de memoria, reduce la viabilidad neuronal e incrementa la reactividad glial en las regiones cerebrales implicadas con las funciones cognoscitivas relacionadas con los procesos de memoria.

Background: High glucocorticoids serum levels and prednisone (PDN) therapy have been associated with depression, post-traumatic stress disorder and some cognitive dysfunctions in humans.

Objective: The aim of this study was to assess whether chronic administration (90 days) of PDN produces disturbances on learning and memory retention associated with neuronal degeneration and cerebral glial changes

Methods: Male Wistar rats were studied. Controls orally received 0.1 ml distilled water vehicle. Prednisone group was treated with PDN 5 mg /kg per day, that is the equivalent to moderate doses employed in clinical settings. Learning and memory retention were assessed using the Morris water-maze. The index of degenerated neurons and the number and cytoplasmic transformation of astrocytes and microglia cells were evaluated at prefrontal cortex and CA1 hippocampus.

Main Results: PDN impaired learning and memory retention as compared with controls. In addition, the index of degenerated neurons at prefrontal cortex and hippocampus was significantly higher in the PDN group. The number and cytoplasmic transformation of astrocytes were also significantly higher in the PDN group. Isolectin-B4-labeled microglia cells were higher at prefrontal cortex in the PDN-treated group. No differences were observed in hippocampus.

Conclusion: These results suggest that chronic exposure to PDN produces learning and memory impairment, reduces neural viability and increases glial reactivity in cerebral regions implicated with these cognitive functions.

Historia de los glucocorticoides:

El significado fisiológico de las glándulas suprarrenales comenzó a apreciarse como consecuencia de la descripción por Addison (1855) de un síndrome clínico resultante de la destrucción de las glándulas suprarrenales. Sus observaciones interesaron al fisiólogo Brown-Séquard, que en 1856 realizó los primeros experimentos sobre los efectos de la adrenalectomía, llegando a la conclusión de que las glándulas suprarrenales son indispensables para la vida.

En la tercera década del siglo XX ya se aceptaba que la corteza y no la médula es la parte de la glándula que mantiene la vida. La naturaleza compleja de la deficiencia adrenocortical se hizo dramática en la década de 1930, cuando se demostró en forma contundente que la pérdida renal de sodio y la depleción de reservas de hidratos de carbono eran características de la insuficiencia adrenocortical. De esta manera, surgió el concepto de dos tipos de hormonas adrenocorticales: los mineralocorticoides que regulan principalmente la homeostasis hidro-electrolítica y los glucocorticoides que intervienen en el metabolismo de los hidratos de carbono.

La preparación de extractos adrenocorticales con un grado razonable de actividad fue lograda por primera vez en 1930 por Swingle y Pfiffner, así como por Hartman y col. Cuando se dispuso de cortisona en cantidades suficientes, Hench y cols., la probaron en un caso de artritis reumatoide.

La existencia de extractos de tejido biológico activo representó un desafío para los químicos orgánicos, que en 1942 ya habían aislado, cristalizado y dilucidado la estructura de 28 esteroides de la corteza suprarrenal. Cinco de estos compuestos fueron denominados: cortisol, cortisona, corticosterona, 11-dehidrocorticosterona y 11-desoxicorticosterona. Estos son los glucocorticoides naturales más abundantes y con mayor actividad biológica en los mamíferos de diversas especies (Goodman y cols., 1982).

Mecanismo de acción de los glucocorticoides:

Los glucocorticoides participan en el metabolismo de carbohidratos, proteínas, lípidos, balance hidroelectrolítico y en las funciones de los sistemas cardiovascular, renal, nervioso y músculo-esquelético, entre otros. Además, confieren al organismo la capacidad de resistir a estímulos nocivos y cambios ambientales (tolerancia al estrés) (Haynes y col., 1986).

Los glucocorticoides actúan controlando la síntesis de proteínas. Estos reaccionan con proteínas receptoras en el citoplasma de las células sensibles formando un complejo esteroide-receptor (Kubli, 1993). El complejo esteroide-receptor sufre un cambio de conformación y se traslada al núcleo, donde se une a la cromatina. La información transportada por el esteroide dirige al aparato genético hacia la transcripción de RNA. En esta forma los glucocorticoides estimulan la transcripción y en el último término la síntesis de proteínas específicas (Chen y cols., 1996; Joels, 1997).

Distribución de los receptores a glucocorticoides en el sistema nervioso central (SNC).

Por medio de técnicas inmunocitoquímicas e hibridización *in situ* se ha demostrado una amplia distribución de los receptores a glucocorticoides en neuronas, astrocitos y células de microglia. Existen dos tipos de receptores a glucocorticoides: los tipo I ó mineraloreceptores (MRs) y los tipo II ó glucoreceptores (GRs) (de Kloet y cols., 2000).

Los tipo I son de alta afinidad y los segundos de baja afinidad. Los primeros constituyen la mayoría de los receptores en el hipocampo y en condiciones basales ejercen un efecto regulatorio sobre la secreción de corticosteroides mediante retroalimentación negativa. Al incrementarse los niveles de corticosteroides ocupan los receptores tipo II, que en su mayoría se encuentran en el núcleo paraventricular (PVN) y en la adenohipofisis, favoreciendo la retroalimentación desde estas regiones, (Reul y cols., 2000). Asimismo se han encontrado niveles de GRs en corteza cerebral, cuerpo estriado, núcleo supraóptico del hipotálamo, etc. (de Kloet y cols., 2000).

Los receptores tipo I, operan de un modo proactivo al determinar la sensibilidad del sistema de respuesta al estrés, además están relacionados con el comportamiento ansioso, exploratorio de nuevos ambientes. Los receptores tipo II facilitan la recuperación del estrés de una manera reactiva, así como también se encuentran relacionados con efectos en la consolidación y retención del comportamiento aprendido (Oitzl y cols., 1994).

Glucocorticoides sintéticos

Desde la década de los 50's se han sintetizado varios glucocorticoides para uso clínico en diversas enfermedades en humanos. Entre los principales glucocorticoides sintéticos se encuentran la prednisolona, prednisona, hidrocortisona, dexametasona, y más recientemente el deflazacort. La potencia de estos fármacos varía de acuerdo al tipo de modificación química al que se somete su característico núcleo pregnano, el cual es el componente principal de todos los glucocorticoides sean naturales o sintéticos (figura 1). Las modificaciones en la estructura de los glucocorticoides naturales han llevado al desarrollo de compuestos sintéticos con mayor potencia farmacológica (Aron y cols., 1995).

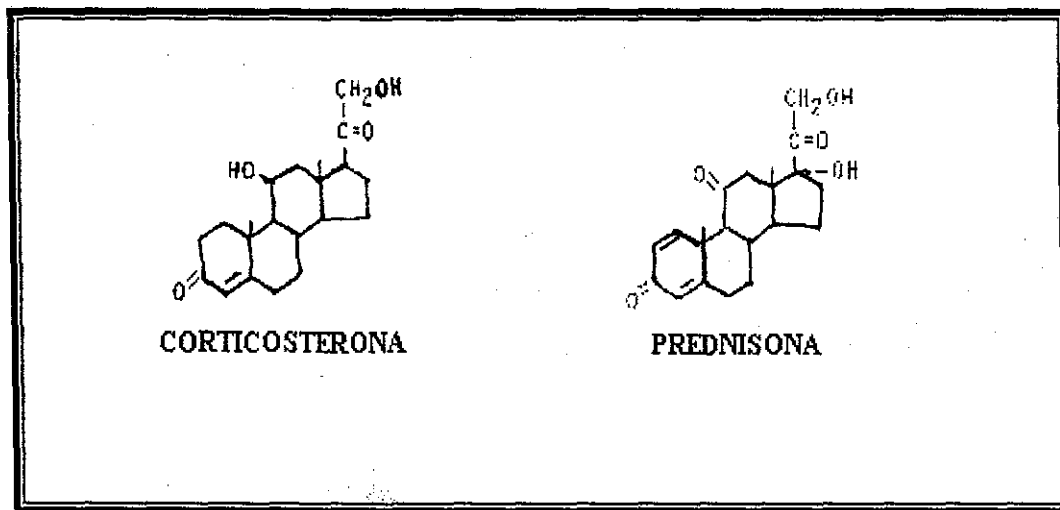


Figura. 1. Fórmula química del glucocorticoide natural corticosterona (el más importante en la rata) y de su análogo prednisona.

Prednisona

La Δ 1-cortisona también llamada **prednisona** ($C_{21}H_{26}O_5$), (figura 1), es uno de los glucocorticoides sintéticos más conocidos y utilizados en la práctica clínica para el tratamiento de diversas enfermedades con componente autoinmune (Cooper y col., 1990); por ejemplo, en la Delegación Jalisco del Instituto Mexicano del Seguro Social se prescribieron aproximadamente 3.5 millones de tabletas de prednisona en el año 2000.

Los glucocorticoides sintéticos, incluyendo la prednisona, atraviesan con gran facilidad la barrera hemato-encefálica (Chen y cols., 1996) y una vez dentro de las células se unen reversiblemente a unas proteínas oligoméricas intracelulares denominadas receptores esteroideos (Joels, 1997; Kubli, 1993), las cuales conforman un complejo esteroide-receptor. Este receptor presenta alta afinidad a glucocorticoides sintéticos como la prednisona y dexametasona, entre otros, por lo que algunos de los efectos de éstos sobre el SNC están mediados por estos receptores (Crossin y cols., 1997; Lackner y cols., 1998;). Sin embargo, los glucocorticoides, sean naturales o sintéticos, no se unen exclusivamente con los GRs, sino que también pueden unirse a los receptores de mineralocorticoides (MRs) y de esta manera ejercen efectos antagónicos (Tanaka y cols., 1997). Algunos autores han propuesto que la afinidad de los glucocorticoides para ocupar los MRs es dependiente de la concentración en que se encuentren los derivados glucocorticoideos (Roberts y col., 1995).

Diversos estudios indican que la prednisona interactúa con el receptor intracelular a glucocorticoides presente en neuronas y células gliales (Coirini y cols., 1994; Crossin y cols., 1997; Lacker y cols., 1998). Debido a ello, posiblemente los mayores efectos de la prednisona son sobre las áreas con mayor densidad de estos

receptores, así, estas mismas regiones serían las más sensibles a los efectos adversos de prednisona.

Efecto adverso de los glucocorticoides

El entusiasmo inicial del uso de corticoides en artritis reumatoide, que se acompañó con el Premio Nobel, pronto dió paso al desconcierto general por los efectos adversos de estos fármacos. Todos los glucocorticoides de uso clínico actual tienen un pobre perfil de seguridad. Existen diversas variables que determinan la frecuencia y características de los efectos adversos. En el paciente influyen la edad, el género, la masa corporal, su idiosincracia y el padecimiento de base. También influyen el tipo de esteroide, la dosis por día y la acumulada, el tiempo de exposición y la vía de administración.

Los efectos adversos más conocidos se anotan en el cuadro 1; de estos destaca por su frecuencia e impacto la osteoporosis, mayor susceptibilidad a infecciones y efectos cardiovasculares diversos, incluyendo hipertensión arterial, aterosclerosis y la consiguiente cardiopatía isquémica.

Como se comentó en secciones previas, se ha reportado que los glucocorticoides producen diversos efectos neuropsiquiátricos, incluyendo alteraciones emotivas, insomnio, depresión y psicosis; sin embargo, las descripciones de estos efectos en libros de texto señalan un carácter temporal y reversible, visión que no es apoyada por la evidencia publicada (Wolkowitz y cols., 1990; Snyder y cols. 1994; Stein y col. 2001).

EFFECTOS ADVERSOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES	
INMUNOLÓGICAS	Mayor susceptibilidad a infecciones, disminución de respuesta inflamatoria, supresión de hipersensibilidad tardía, neutrofilia, linfocitopenia
NEUROPSIQUIATRICAS	Euforia, disforia/depresión, insomnio, psicosis, pseudo tumor cerebral,
DERMATOLOGICAS	Piel delgada, púrpura, fascie Cushingoide, alopecia, hipertrichosis, acné, equimosis
OFTÁLMICAS	Catarata subcapsular posterior, glaucoma
CARDIOVASCULAR	Hipertensión, retención hídrica, aterosclerosis.
GASTROINTESTINAL	Gastritis, úlcera péptica, pancreatitis.
MUSCULOESQUELÉTICO	Osteoporosis y fracturas, necrosis ósea avascular, miopatía
ENDOCRINO Y METABOLISMO	Intolerancia a la glucosa, diabetes mellitus, incremento peso corporal, hiperlipoproteinemia, redistribución de grasa, balance negativo de nitrógeno, inhibición de crecimiento, gasto muscular, impotencia, daño en cicatrización, irregularidades menstruales, retención de sodio y agua, pérdida de potasio, supresión eje HPA, insuficiencia adrenal aguda

Cuadro 1. Algunos de los principales efectos adversos causados por la administración de corticosteroides (Stein y cols. 2001).

Glucocorticoides y daño del tejido nervioso

El cerebro es un órgano blanco para los glucocorticoides circulantes ya que modifican la transcripción génica de neuronas y células gliales a través de los receptores intracelulares que poseen dichas células. Esta modulación génica conlleva a diversas alteraciones sobre el metabolismo intracelular, tales como cambios en el coeficiente de partición y permeabilidad de la membrana al cloro mediada por receptores ácido gamma aminobutírico (GABA_A) bloqueo de corrientes de calcio y modulación alostérica de los receptores a N-metil-D-aspartato (NMDA). Asimismo, los glucocorticoides pudieran ejercer un efecto neurotóxico directo a través de la disminución en el transporte de glucosa y la producción de un déficit de energía debido a la disminución en las concentraciones intracelulares de ATP, que su vez, genera disfunción mitocondrial. Como resultado, sería difícil para las neuronas remover el glutamato de las sinapsis o de secuestrar calcio citosólico. Esta elevación a su vez resulta en un incremento de los eventos degenerativos dependientes de calcio, como la proteólisis citoesquelética (Smith y cols., 1995).

Respuesta celular al daño del tejido nervioso

Neuronas

Como se describió anteriormente, las **neuronas** son particularmente susceptibles a cambios drásticos en su ambiente, lo que provoca su muerte. Esta puede ser por necrosis (muerte aguda o temprana) producida por el incremento de Ca^{++} intracelular, originando una cascada de procesos bioquímicos tales como la liberación de proteasas y endonucleasas con la consiguiente ruptura del citoesqueleto, contracción, fragmentación nuclear o cariólisis; además por cromatólisis central, que se caracteriza por dispersión de la sustancia de Nissl

(retículo endoplásmico) debido a las lipasas liberadas, e inflamación del cuerpo neuronal. También se producen distrofias neuro-axonales que pueden llevar a la neuronas a una muerte retrograda. A pesar de que la cromatólisis y las distrofia axonales pueden ser reversibles, hacen que la neurona sea más susceptible y muera quizás por mecanismos apoptóticos (García y cols., 1995).

Por medio de microscopia de luz se pueden identificar los diferentes estadios y características de muerte neuronal, tales como picnosis, cariorrexis, cariólisis y eosinofilia citoplásmica o pérdida de afinidad a la hematoxilina. Otras alteraciones indicadoras de lesión son: presencia de neuronas oscuras, festonadas o neuronas edematizadas, éstas alteraciones reflejan la ruptura de las membranas nucleares y la presencia de precipitados cálcicos en la matriz mitocondrial interna (Trump y cols., 1973; Trump y cols., 1984).

Microglia

Los cambios histológicos que resultan ante cualquier daño químico o traumático sobre el tejido nervioso se caracterizan por la reactividad de células cerebrales no excitables, denominadas células gliales o neuroglia. Estas se clasifican en 4 tipos: astrocitos, microglia, células endoteliales y oligodendrocitos.

Las células de **microglia**, son residentes cerebrales, ampliamente distribuidas por todo el tejido nervioso. Comprenden el 20% del total de la población glial (Lawson y cols., 1991). Son consideradas "macrófagos cerebrales" dada su capacidad fagocítica, transformación rápida y migración (Marty y col., 1991; Gerhmann y cols., 1995).

Se han reconocido múltiples formas histológicas de microglia. Desde el punto de vista morfológico se aceptan varios tipos: a) ramificada o microglia en reposo del adulto: presenta soma alargado con proyecciones muy delgadas; b) microglia activada no fagocítica: situada en las áreas de lesión secundaria a transección nerviosa y se caracteriza por poseer soma grande con ramificaciones escasas y gruesas; c) microglia activada fagocítica o reactiva: presenta un aspecto muy similar a los macrófagos tisulares, con soma grande y brazos pseudopódicos gruesos; se le encuentra en las áreas de trauma, infección o necrosis neuronal (Marty y col., 1991; Riva-Depati y cols.,1994; Gerhmann y col., 1995). La figura 2 presenta ejemplos de estas formas microgliales.

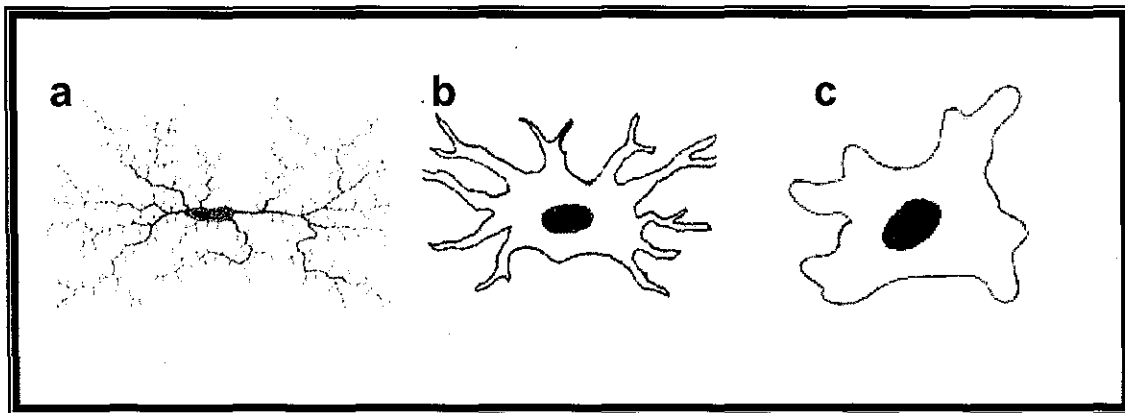


Figura 2. Dibujo esquemático que muestra el aspecto morfológico que puede adquirir una célula microglial; a) Ramificada o microglia en reposo, b) Microglia activada no fagocítica, c) Microglia activada fagocítica.

La microglia en reposo tiene un lento recambio con los monocitos circulantes en sangre, -precursores de los macrófagos tisulares (Hickey y col., 1988). Estas células tienen la capacidad de transformarse, proliferar y migrar ante cualquier evento nocivo y entonces se denominan microglia reactiva (Merrill, 1992; Gerhmann y cols., 1995; Riva-Depati y cols., 1994). Mediante histoquímica la microglia activada se reconoce por una mayor cantidad de residuos α -D-galactosa en las glucoproteínas integrales de membrana; estos residuos D-galactosa son afines a la isolectina-B4, obtenida de la planta *Griffonia simplicifolia* (Riva-Depati y cols., 1994).

La microglia es la principal estirpe efectora de la respuesta inmune celular del cerebro (Gerhmann y cols., 1995). Posee un elevado potencial fagocítico y citotóxico dada su capacidad de producir H_2O_2 (Cotton y col., 1987; Banati y cols., 1993), óxido nítrico y proteinasas lisosomales, que inducen apoptosis neuronal (Banati y cols., 1993). La microglia activada es también una célula presentadora de antígenos para linfocitos T (Frei y cols., 1987); estos últimos, una vez activados, favorecen la migración hacia el tejido nervioso de abundantes células inflamatorias provenientes de la circulación general, potenciando aún más la liberación de una gran cantidad de sustancias mediadoras de la inflamación, incluyendo: interleucina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina 4 (IL-4), interferon gamma (IF- γ), entre otras. Por todo lo anterior, la detección de células de microglia activada en cualquier sitio se considera indicativa de daño (Frei y col., 1987; Martin, 1992; Gerhmann y col., 1995). Finalmente, la microglia estimula también la respuesta astrocitaria, cuya función es regular y limitar la zona de lesión (Marty y col., 1991; Gerhmann y cols., 1995).

Astroцитos

La figura 3 muestra una imagen esquemática de los **astroцитos**. Estos son conocidos también como "células en estrella" se clasifican en 2 clases: fibrosos y protoplásmicos. Los primeros se localizan en la sustancia blanca, su citoplasma sigue trayectos más o menos rectos y con relativamente pocas ramificaciones; en cambio, los protoplásmicos poseen abundantes ramificaciones cortas y se localizan en la sustancia gris (Bignami y col., 1976). Además de las funciones de sostén mecánico, los astroцитos responden activamente frente una lesión cerebral con cambios bioquímicos y morfológicos característicos (García-Estrada y cols., 1999). De esta manera circunscriben la zona de lesión y producen una barrera física entre el sitio dañado y el parénquima nervioso sano. Por otra parte, coadyuvan en el mantenimiento de la barrera hemato-encefálica y en la restauración de los circuitos neuronales dañados (Luquin y cols., 1995).

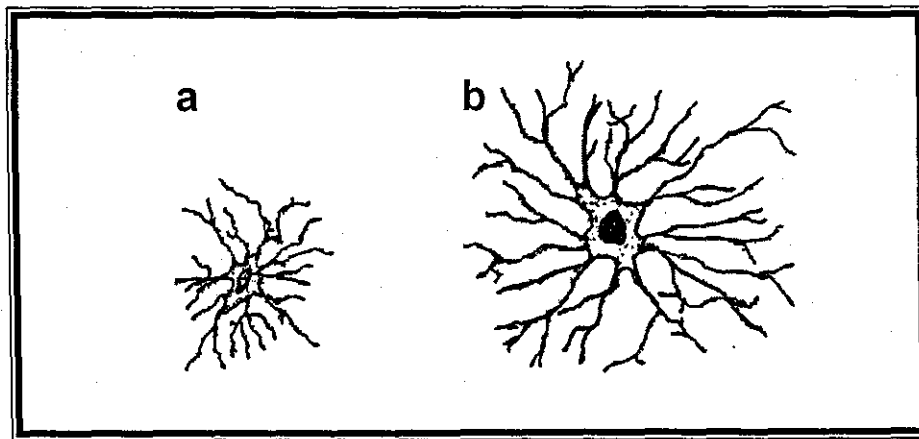


Figura 3. Dibujo esquemático que ilustra la transformación morfológica astrocitaria ante una lesión. a) Astrocitario en estado de reposo, b) Astrocitario reactivo.

Cuando los astrocitos se activan para participar en la reparación del tejido nervioso, expresan nuevas moléculas y sufren transformaciones morfológicas que de otra forma no ocurrirían como cuando están en reposo (Bignami y col., 1976; Mucke y col., 1991). Por ejemplo, incrementa la producción de factores mitógenos y de crecimiento, cuyos niveles son originalmente bajos (Eddleston y col., 1993). Entre las proteínas expresadas por los astrocitos activados se encuentra la **proteína acídica fibrilar glial (GFAP)**, que es un componente estructural de lento recambio de los filamentos intermedios del citoesqueleto astrocitario (Eng y col., 1988; Reier y col., 1988; Weinstein y cols., 1991). Esta proteína solamente se manifiesta en grandes cantidades durante la respuesta tisular a la lesión y se mantiene presente por tiempo variable (Rosengreen y col., 1989). Por esta razón su detección por métodos inmunocitoquímicos se considera un indicador confiable de la activación astrocitaria secundaria a una lesión nerviosa (Bignami y col., 1976; Topp y col., 1989; Hozumi y col., 1990; Mucke y col., 1991; Eddleston y col., 1993).

II.- Antecedentes

A pesar de los avances dramáticos en el conocimiento de la química y biología de los glucocorticoides, continúa emergiendo evidencia importante del papel de los esteroides naturales y sintéticos sobre la función y estructura cerebral en condiciones fisiológicas y en enfermedad. Por ejemplo, se han asociado los niveles elevados de cortisol con una reducción del volumen de la formación hipocampal y disfunción de la memoria en pacientes que padecen síndrome de Cushing (Starkman y cols., 1992); la corrección de los niveles de cortisol revierte la atrofia hipocampal (Starkman y cols., 1999). Se ha descrito que en diversas enfermedades, tales como Alzheimer, esquizofrenia, depresión y demencia senil, los niveles plasmáticos de cortisol se encuentran elevados y correlacionan con la severidad de la atrofia hipocampal y daño en la memoria (Raber., 1998; Miller y cols., 1998).

En cuanto a la PDN, existen algunos estudios que sugieren que puede afectar directamente al cerebro y ocasionar disfunción cognoscitiva, atrofia cerebral, depresión y ansiedad, además del conocido efecto de psicosis esteroidea. Una de las primeras descripciones fue realizada por Bentson y col., en 1978, quienes reportaron una serie retrospectiva de 15 casos de atrofia cerebral en pacientes jóvenes provenientes de una revisión de 7,000 tomografías axiales computarizadas de cráneo. El común denominador fue que estos pacientes recibieron en forma crónica PDN en dosis bajas o moderadas (Bentson y cols., 1978). Por otra parte, existe un subgrupo de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) que a pesar de no tener historia de afección clínica neurológica, desarrollan disfunción cognitiva y atrofia cerebral (Brey y cols., 2002); si bien es controvertido, la visión del Departamento de Reumatología del Centro Médico Nacional de Occidente es que la prednisona produce estos efectos.

Por otra parte, Wolkowitz y su grupo de trabajo realizaron tres estudios independientes con diferentes diseños y grupos de sujetos, los resultados mostraron un mayor número de errores de comisión en tareas de memoria verbal, en: 1) pacientes deprimidos con prueba negativa de supresión a dexametasona, 2) pacientes voluntarios sanos que recibieron 1mg de dexametasona 3) pacientes que recibieron 80 mg/día de prednisona. Estos hallazgos incrementan la posibilidad de daño cognitivo relacionado con la administración de corticosteroides (Wolkowitz y cols., 1994). Existen también reportes que describen pacientes con asma, enfermedad de Crohn y otros padecimientos sistémicos que presentan alteraciones psiquiátricas subclínicas y déficits selectivo neuropsicológico asociado con el tratamiento con glucocorticoides (Snyder y cols., 1994).

En 1996 Keenan y su grupo de trabajo, reportaron los resultados de un estudio de casos y controles en 25 pacientes con enfermedades sistémicas sin alteración en el SNC, tratados con PDN en forma crónica y los compararon con 25 pacientes con enfermedades similares pero sin tratamiento con PDN. En la primera parte del estudio los pacientes fueron sometidos a una prueba de memoria explícita dependiente del hipocampo y una prueba de memoria implícita independiente del hipocampo. A los pacientes tratados con prednisona se les administraron dosis de 5 a 40 mg de prednisona diariamente al menos por un año. El grupo tratado con prednisona mostró peor desempeño que los controles en la prueba de memoria explícita, pero no en la implícita. En el segundo estudio se evaluaron los efectos de la prednisona sobre la memoria, a través de 3 meses de terapia. Sus hallazgos sugieren que el tratamiento agudo puede causar un efecto adverso en la memoria. No encontraron asociación entre la alteración observada en memoria con falta de atención, alteración afectiva, déficit global cognitivo o severidad de una enfermedad. Los autores sugieren que antes de comenzar un

tratamiento con glucocorticoides, debe considerarse el daño sobre la memoria (Keenan y cols., 1996).

Si bien existen diversos estudios experimentales que muestran que la hidrocortisona, la corticosterona y la dexametasona modifican la morfología celular de la microglia en el cerebro de ratas y aceleran su velocidad de maduración durante el período neonatal (Kaur y col., 1994) y que la dexametasona y la corticosterona provocan activación astrocitaria manifestada por un incremento en la expresión génica de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Melcangi y cols., 1997), existe un solo reporte sobre los efectos de la PDN en funciones y estructura cerebral. Este estudio es de nuestro grupo, se realizó en un modelo murino para evaluar si la PDN producía ansiedad o cambios cerebrales gliales. Los animales se dividieron en tres grupos con ocho ratas cada uno. El grupo de dosis moderadas recibió 5 mg/kg/día de PDN mediante un implante subcutáneo de agar. En el grupo de dosis altas, los implantes contenían PDN equivalente a 60 mg/kg/día. El grupo control se les realizó el implante sin PDN. La ansiedad se evaluó con las pruebas de campo abierto y laberinto elevado en cruz. Mediante un análisis inmunohistoquímico se analizó el número de astrocitos y células de microglia así como su transformación citoplásmica. Los resultados de este estudio mostraron mayor nivel de ansiedad en los dos grupos expuestos a PDN, así como un incremento en número y transformación microglial en la corteza prefrontal y cuerpo estriado. Con base en estos resultados, se concluyó que la exposición subaguda de PDN induce ansiedad y reactividad microglial (González-Pérez y cols., 2001). Sin embargo, el corto tiempo de exposición fue insuficiente tanto para establecer si la PDN afecta la esfera cognoscitiva, como para determinar si los cambios gliales son persistentes y se acompañan de degeneración neuronal. Por lo tanto, un modelo de administración crónica debe establecerse para evaluar la magnitud y los posibles efectos lesivos sobre el SNC por el uso de PDN.

Planteamiento del problema

El uso de prednisona (PDN) para el tratamiento de diversas enfermedades se ha incrementado en 200% en Norte América y es uno de los esteroides sintéticos más utilizados en nuestro país; por ejemplo, en la Delegación Jalisco del Instituto Mexicano del Seguro Social se consumen más de 3 millones de tabletas por año. Si bien desde hace años se conocen muchos de sus efectos secundarios, otros se han descubierto recientemente. Existe evidencia indirecta de que la administración de PDN en humanos puede generar ansiedad, depresión, alteración de las funciones mentales superiores y atrofia cortical. En adición, un estudio reciente realizado en roedores ha sugerido la promoción de reactividad glial secundaria a la administración subaguda de PDN. Debido a las implicaciones éticas y metodológicas inherentes a la realización de un ensayo clínico sobre seguridad de la prednisona en humanos, se decidió un abordaje farmacológico experimental en roedores para determinar si la PDN produce cambios cognoscitivos y estructurales en el sistema nervioso central.

En este estudio se evaluaron los efectos de la administración crónica de PDN sobre la adquisición y retención de memoria, viabilidad neuronal y gliosis reactiva en ratas. La dosis de PDN administrada es el equivalente a las dosis moderadas utilizadas en enfermedades reumáticas en humanos. La adquisición y retención de memoria se evaluaron con una prueba de valor reconocido. Las regiones cerebrales consideradas para el análisis fueron aquellas con mayor densidad de receptores, como la corteza prefrontal, región CA1 del hipocampo y cuerpo estriado (Petralia y col., 1996). Los astrocitos y las células de microglia fueron seleccionadas por ser las primeras en responder al daño neuronal y juegan un papel importante en la restauración del tejido nervioso dañado (Persson, 1976; Isacson y cols., 1987).

IV.- Hipótesis

La administración crónica de PDN afecta la capacidad de adquisición y retención de memoria, así como la integridad neuronal y reactividad glial en ratas

V.- Objetivos

General:

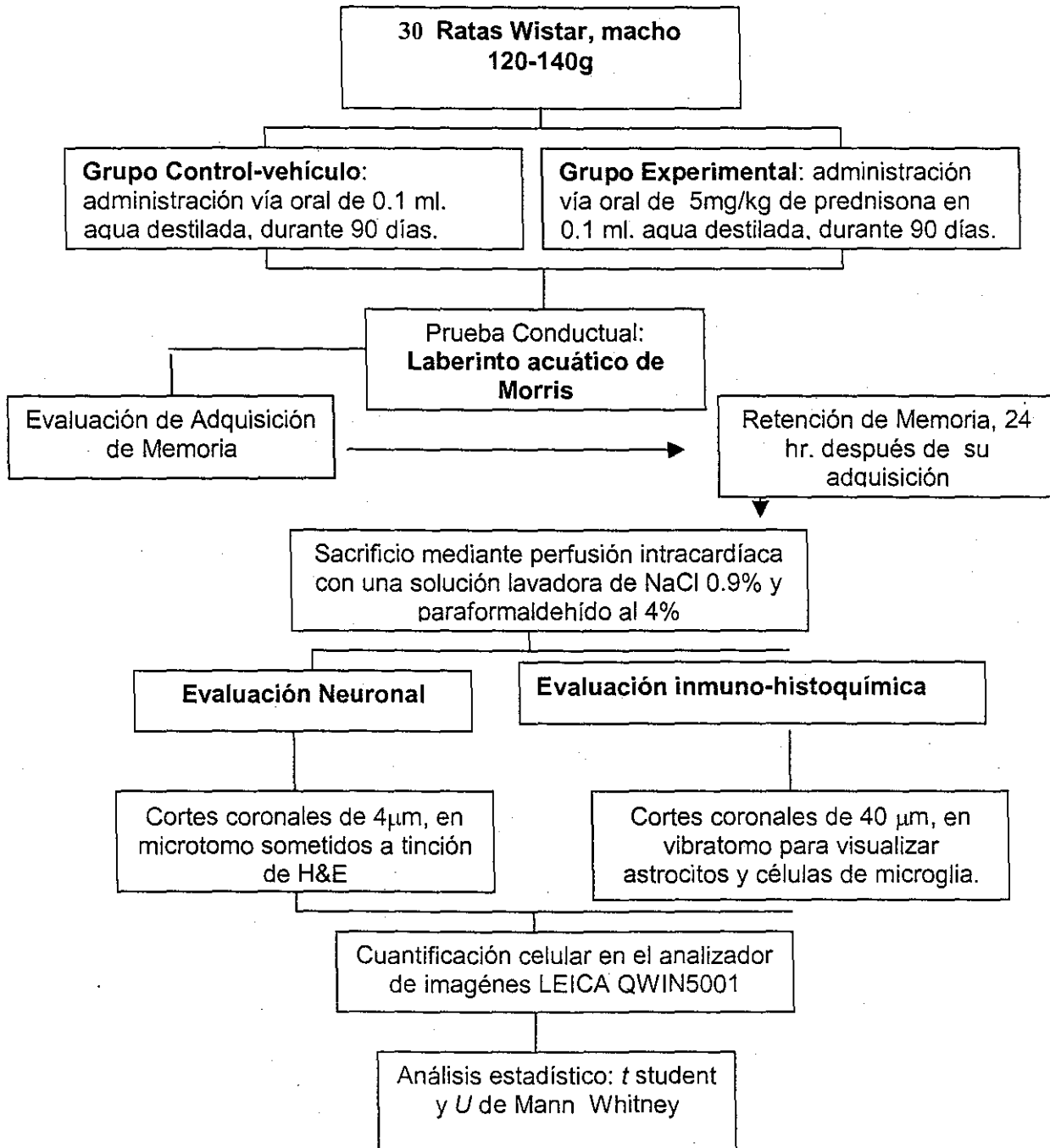
Determinar si la administración prolongada de PDN a ratas afecta las habilidades cognoscitivas en la adquisición y retención de memoria, degeneración neuronal y reactividad glial.

Específicos:

1. Analizar si la PDN disminuye la adquisición y retención de memoria en un modelo de ratas.
2. Cuantificar la densidad neuronal y la población que manifieste alteraciones degenerativas en corteza cerebral prefrontal, hipocampo y cuerpo estriado.
3. Registrar variaciones en la densidad numérica y transformación citoplásmica de astrocitos y células de microglia en estas mismas regiones.

VI.- Materiales y método

La siguiente figura muestra el diseño general del estudio.



Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) machos jóvenes, variedad albina de la cepa *Wistar*, entre 120-140 gr. de peso corporal (8 semanas de edad), mantenidas en condiciones controladas de bioterio con ciclos de luz-oscuridad de 12 h, alimentadas con dieta balanceada para roedores y agua potable *ad libitum*. Se formaron 2 grupos de 15 animales cada uno:

Grupo 1 (controles-vehículo): Diariamente a las 8:00 AM recibieron 0.1ml de agua destilada por vía oral durante 90 días.

Grupo 2 (experimental): Diariamente fueron dosificados por vía oral (8:00 AM) con una dosis moderada de prednisona (Sigma P-6254) a razón de 5mg/kg (Travis y cols.1991; Jacobs y cols, 1996; Gonzalez-Perez y cols., 2001) disuelta 0.1 ml de agua destilada, durante el mismo lapso.

Los animales que fallecieron por cualquier causa durante el periodo de administración del fármaco o vehículo, o aquellos que presentaron alguna enfermedad al momento de las pruebas conductuales, o los que presentaron evidencia de enfermedad durante la autopsia rutinaria al momento del sacrificio no se incluyeron en el análisis final de las variables de desenlace.

Descripción de los métodos de estudios

Evaluación de memoria

Existen numerosas pruebas psicofísicas para identificar la presencia de alteraciones cognoscitivas, una de las más representativas y comúnmente utilizadas es el paradigma acuático de Morris (ver figura 4). Esta prueba sirve para evaluar la integridad de los circuitos corticales e hipocampales, no relacionados con los circuitos espinales de coordinación motora, necesarios para los movimientos de natación; por lo tanto, el desempeño adecuado para resolver el paradigma se considera indicativo de la capacidad de aprendizaje y almacenamiento de memoria (Morris, 1984).

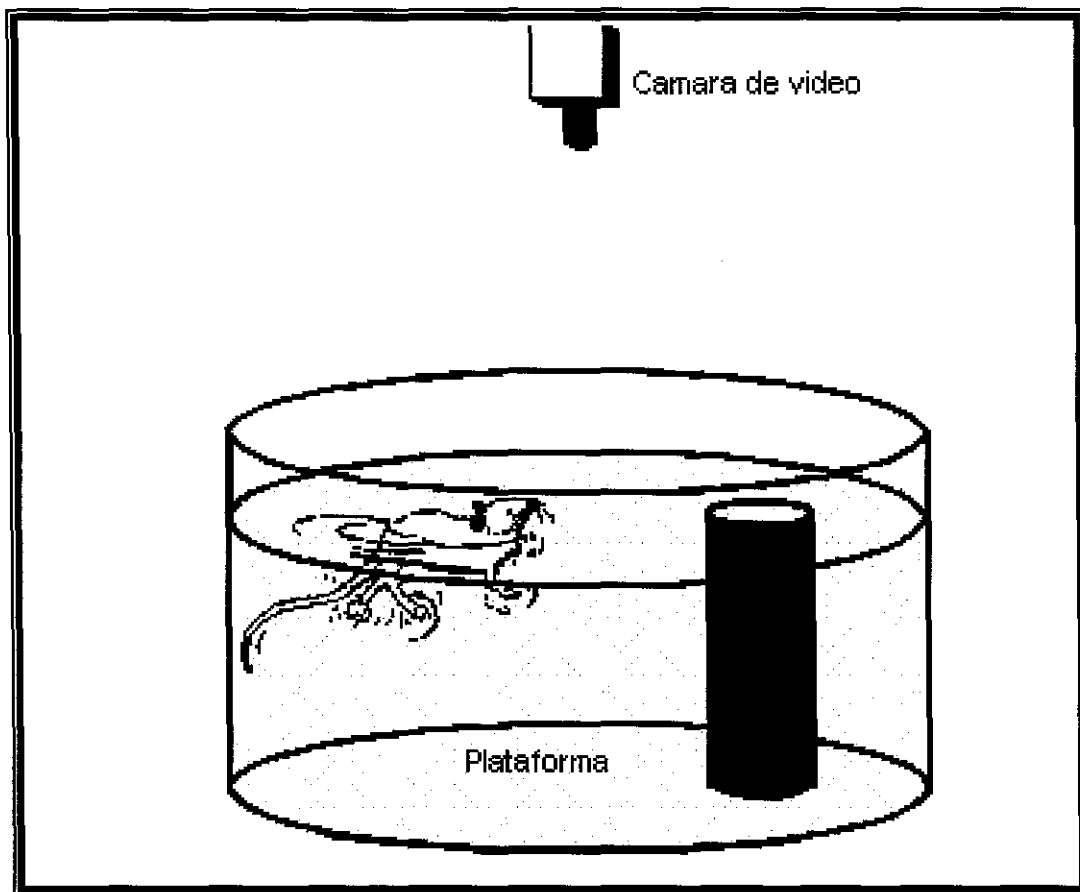


Figura 4. Imagen esquemática del laberinto acuático de Morris

Una vez transcurrido el periodo de administración, se evaluó la **adquisición** y la **retención de memoria** mediante el laberinto acuático descrito por Morris en 1984 (Morris, 1984; de Quervain y cols., 1998). Brevemente: En una piscina circular de 1.8 m de diámetro se depositó agua a 27°C para conseguir una profundidad de 25 cm. Dentro de ella se colocó una plataforma de escape sumergida a 2 cm de la superficie (la cual evita que el roedor nade indefinidamente), ésta se mantuvo en una misma posición al centro de uno de los cuadrantes (seleccionado aleatoriamente) durante todo el estudio. Asimismo, la plataforma de escape se pintó de color negro (el color de la piscina) para evitar que los animales pudieran visualizarla directamente. Alrededor de la piscina se colocaron claves visuales consistentes en figuras geométricas de colores (orientadores espaciales) para permitirle a los roedores establecer la posición exacta de la plataforma de escape.

Durante el primer día, se realizaron ocho ensayos con duración de 60 s cada uno. Cada ensayo consistió en permitir a los animales localizar la plataforma de escape; si al término de los 60 s el animal no logró localizar la plataforma de escape, fue guiado hasta ella y se le permitió permanecer en ella durante 20 s, con la finalidad de permitirle observar los indicadores espaciales (**etapa de adquisición de memoria**). Al término de cada ensayo el animal fue extraído de la piscina, depositado en su jaula durante medio minuto e inmediatamente después se repitió el mismo procedimiento. Cada vez los animales partieron de un cuadrante diferente, así todos los animales iniciaron en dos ocasiones desde cada uno de los cuatro cuadrantes. Se determinaron como parámetros de **adquisición de memoria**: la latencia de escape y el tiempo permanencia de la rata en el cuadrante de la plataforma (expresado en segundos).

La **retención de memoria** se evaluó 24 h después, en un solo ensayo, para ello se retiró la plataforma de escape y se colocó a cada uno de los animales en la piscina durante 60 s. Se midió el tiempo en segundos de la permanencia en el cuadrante donde se encontraba la plataforma.

Ambos procedimientos de retención y adquisición de memoria se iniciaron a las 10:00 AM, fueron grabados con una videocámara y la evaluación la efectuó un observador cegado a la asignación de grupo.

Perfusión intravascular

Al finalizar la prueba de aprendizaje, las ratas se sacrificaron mediante perfusión intravascular. Previamente se les aplicó una dosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg), se les practicó una toracotomía amplia para exponer el corazón, se les extrajo 5ml de sangre para procesarla y obtener suero para análisis de glucosa, sodio, potasio y cloro (variables fisiológicas) y posteriormente se pinzó la arteria aorta torácica descendente. Se invadió el corazón realizando un corte a nivel del ápex (ventrículo izquierdo). Se introdujo una cánula (aguja # 14 de punta roma) para alcanzar la arteria aorta ascendente y se seccionó la aurícula derecha para permitir el drenaje de sangre y de soluciones. Se instiló durante 3 minutos 150 ml de una solución lavadora (0.9% NaCl, con 10,000 UI de heparina y 0.1% procaína); inmediatamente después, se pasaron 200 ml de solución fijadora (4% de paraformaldehído disuelto en amortiguador fosfato de sodio 0.1 M pH 7.4).

Al concluir la perfusión, se extrajo el cerebro completo y se fijó adicionalmente por inmersión en la misma solución fijadora a 4 °C durante 24 h. Posteriormente, en una parte de los tejidos fijados se hicieron cortes coronales de

40 μm de espesor con un vibratomo. Los cortes a nivel de la corteza prefrontal y cuerpo estriado se realizaron a partir de Bregma 1.2mm hasta -0.26mm y para la región del hipocampo Bregma -3.3mm hasta -4.8mm (Paxinos y Watson, 1986). Para análisis inmunocitoquímico cuantitativo de astrogliosis y reactividad microglial, se siguió la técnica de flotación libre. El procesamiento de cortes obtenidos de animales controles y experimentales se realizó en paralelo durante todo el estudio.

Para el análisis de la población neuronal con alteraciones degenerativas, se incluyeron cerebros en parafina (n= 5 por grupo). Se realizaron cortes coronales con espesor de 4 μm mediante un microtomo. Posteriormente los cortes se montaron en portaobjetos y se almacenaron en una estufa con una temperatura de 37°C durante 24 h. En seguida se realizó la técnica convencional de tinción con hematoxilina de Harris y eosina para analizar las neuronas dañadas (Estrada y cols., 1982).

Tinción con hematoxilina de Harris y eosina

Los tejidos se procesaron mediante la siguiente técnica: se colocaron dos soluciones de xilol en baño María a 50°: xilol-1 y xilol-2 por 15 min cada una. Después se transfirieron a una solución de xilol-3 a temperatura ambiente durante 10 minutos. Enseguida se pasaron sucesivamente a soluciones de etanol con concentración decreciente (100, 95, 80 y 70%) durante 10 min. Posteriormente, se sumergieron en agua destilada por 3 minutos y acto seguido se inició la tinción de hematoxilina: hematoxilina de Harris (5 min), agua corriente (hasta retirar el colorante excedente), se decoloraron con alcohol-ácido (2-5 seg), lavado con agua corriente, agua amoniacal (1-2 min), lavado con agua corriente, alcohol 96% (2

min), eosina (1-2 min), alcohol 100% (2 min) en 3 ocasiones, xilol (5 min). Finalmente se les agregó unas gotas de la resina *Entellan* (Merck) se colocó los cubreobjetos y se analizaron bajo microscopia de luz a 400 aumentos en un analizador de imágenes Leica QWIN510.

Análisis de la población neuronal

La presencia de células neurodegenerativas se determinaron con base en los siguientes parámetros: neuronas con datos de picnocitosis, cariorrexis, cariólisis, eosinofilia citoplasmática o pérdida de la afinidad por la hematoxilina; otras alteraciones celulares, tales como neuronas oscuras, festonadas y edematizadas se registraron también, la figura 5 muestra algunas de las características antes mencionadas (García y cols., 1995; Li y cols.,1998). La evaluación neuronal la efectuó un evaluador cegado a la asignación de grupo y se realizó en todo el espesor de la corteza prefrontal, hipocampo CA1 y cuerpo estriado. Se analizaron un total de 120 campos/región /rata/grupo.

Para el análisis morfométrico de las neuronas teñidas con hematoxilina y eosina los resultados obtenidos fueron normalizados, es decir, se determinó el cociente del valor obtenido de las neuronas con datos de neurodegeneración entre el número total de neuronas en cada campo expresado en porcentaje. Para ello se empleó la siguiente fórmula:

Índice de neurodegeneración:

$$\frac{\text{No. de neuronas con signos neurodegenerativos} \times 100}{\text{No. total de neuronas /campo}}$$

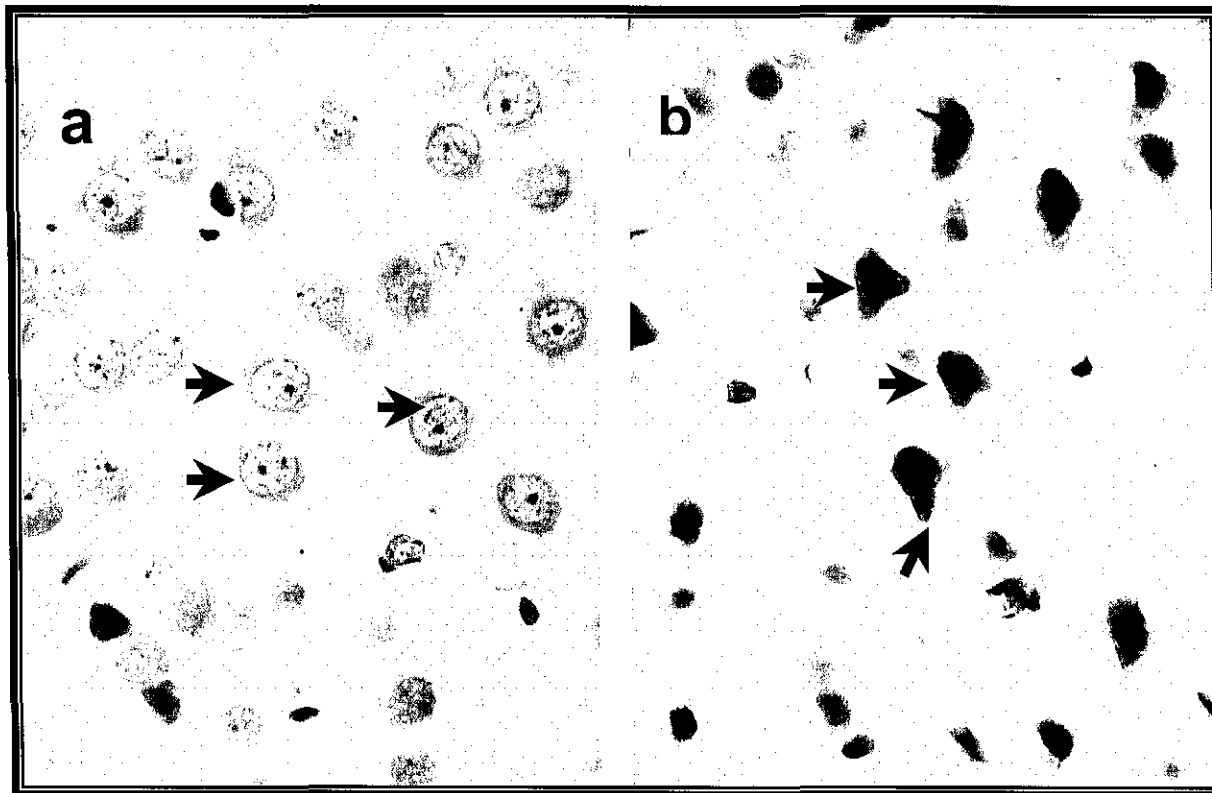


Figura 5. Neuronas de la corteza prefrontal de rata. (a). Morfología normal (flechas): las neuronas son redondeadas con citoplasma escaso, discretamente basófilo, núcleos prominentes con cromatina dispersa y nucleolos excéntricos bien definidos. (b). Patrón típico de necrosis neuronal (flechas): el parénquima cerebral presenta pérdida de basofilia; las neuronas se tornan fusiformes, su citoplasma muestra retracción y basofilia intensa (morado-azul); sus núcleos se tornan picnóticos con cromatina condensada y sin nucleolos aparentes. Tinción hematoxilina y eosina; magnificación x400.

Inmunocitoquímica para Identificación de Astrocitos

Para identificar astrocitos se utilizaron anticuerpos (ac) dirigidos contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), componente principal de los filamentos intermedios presentes en las prolongaciones citoplásmicas de ellos. Para identificar la transformación microglial se utilizó un marcaje histoquímico con

isolectina-B4 obtenida a partir de *Griffonia simplicifolia* que tiene afinidad química por los residuos de α -D-galactosa de las glucoproteínas presentes en su membrana plasmática (Riva-Depati y cols., 1994).

Identificación de GFAP

Los cortes se lavaron (2 x 15 min) con solución PBS 0.1M pH 7.4 con 0.1% de albúmina sérica bovina (Sigma A3059) y 0.05% de Tritón-X-100 (Sigma T6878) (*PBS-Tritón-Albúmina*). Se inactivaron peroxidasas endógenas mediante incubación en una solución de metanol al 10% y peróxido de hidrógeno al 0.3% disuelta en PBS-Tritón-Albúmina durante 10 min. Se hicieron lavados (2 x 15 min) con PBS-Tritón-Albúmina.

Con el fin de bloquear toda la inmunorreactividad inespecífica tisular se incubaron los tejidos durante 1.5 a 2 h a temperatura ambiente en una solución compuesta por 10% de suero normal de cabra, glicina 0.2 M, D-L-lisina 0.2 M, disueltas en PBS-Tritón-Albúmina (amortiguador de inmuno), se hicieron lavados (2 x 15 min) en la misma solución y se incubaron los tejidos toda la noche a 4 °C en el anticuerpo (ac) primario; compuesto por *IgG* generadas en conejo contra GFAP de bovino (*Dako Z334*) a dilución de 1:800, disuelto en PBS-Tritón-Albúmina con 5% de suero normal de cabra. Los tejidos se lavaron (2 x 15 min) y se incubaron durante 2 h con el ac. secundario biotinizado (*IgG generadas en cabra contra IgG de conejo, Vector BA-1000*) a dilución de 1:250, en amortiguador de inmuno y 5% suero de cabra; se hicieron lavados (2 x 15 min) y se continuó la incubación en un compuesto de Avidina-Biotina (ABC estándar. Vector PK-6000), disuelto en la misma solución a dilución 1:100 durante 2 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Posteriormente se realizaron dos lavados por 15 minutos. Para visualizar el producto de reacción se incubaron los cortes en 0.03% de 3'-

diaminobencidina (Sigma D7679) y 0.01% H₂O₂ disueltos en Tris pH 7.6, durante 5-10 minutos hasta que se observó una coloración marrón-oscuro. Finalmente, se detuvo la reacción mediante lavados con PBS 0.1 M pH 7.4. Los cortes fueron montados en portaobjetos con *Entellan* (Merck) para su estudio con microscopia de luz en un analizador de imágenes (*Leica Q5001W Imaging Workstation*).

Inmunohistoquímica para identificación de microglia

Primero se inactivaron peroxidasas endógenas durante 10 min con 10% de metanol y 0.3% de peróxido de hidrógeno en PBS-Tritón-Albúmina durante 10 min. Posteriormente los tejidos se incubaron durante 1.5 a 2 h en una solución bloqueadora (glicina 0.2 M, D-L-lisina 0.2 M, disueltas en amortiguador de inmuno). Para incrementar la afinidad química de las lectinas, las muestras se incubaron durante 10 minutos en una solución catiónica (CaCl₂ 0.1 Mm, MgCl₂ 0.1 mM, MnCl 0.1 mM, disueltas en PBS 0.1M pH 7.4). Los tejidos se incubaron en *isolectina-B4* marcada con biotina (*Sigma L-2140*), en dilución 1:100 en amortiguador de inmuno, durante toda la noche a 4 °C. Después, se incubó con complejo ABC estándar (Vector PK-4000) a dilución 1:250 durante 2 h en la oscuridad.

El producto final de la reacción se reveló con 0.03% de 3'-diaminobencidina y 0.01% de H₂O₂ disueltos en Tris pH 7.6, durante 10-15 minutos hasta que se desarrolló una coloración marrón-oscuro. Entre cada una de las etapas descritas se hicieron 2 lavados de 15 minutos con el mismo amortiguador de inmuno. Al finalizar el revelado los tejidos se lavaron con PBS 0.1 M (2 x 10 min) y fueron montados en portaobjetos con *Entellan* (Merck) para su análisis morfológico cuantitativo en el sistema automatizado (*Leica Q5001W*).

Análisis morfométrico (astrocitos y microglia).

Los cortes inmuno-teñidos fueron analizados con microscopía de luz a 400 aumentos. Se cuantificó la densidad numérica de microglia y astrocitos en regiones de: corteza prefrontal, cuerpo estriado (figura 6) y en CA1 hipocampal (figura 7). De cada grupo experimental se contabilizaron 120 campos visuales por región por rata. La cuantificación del número de células se realizó en un mismo plano de foco del corte y cada campo visual correspondió a $738,982 \mu\text{m}^2$ de superficie.

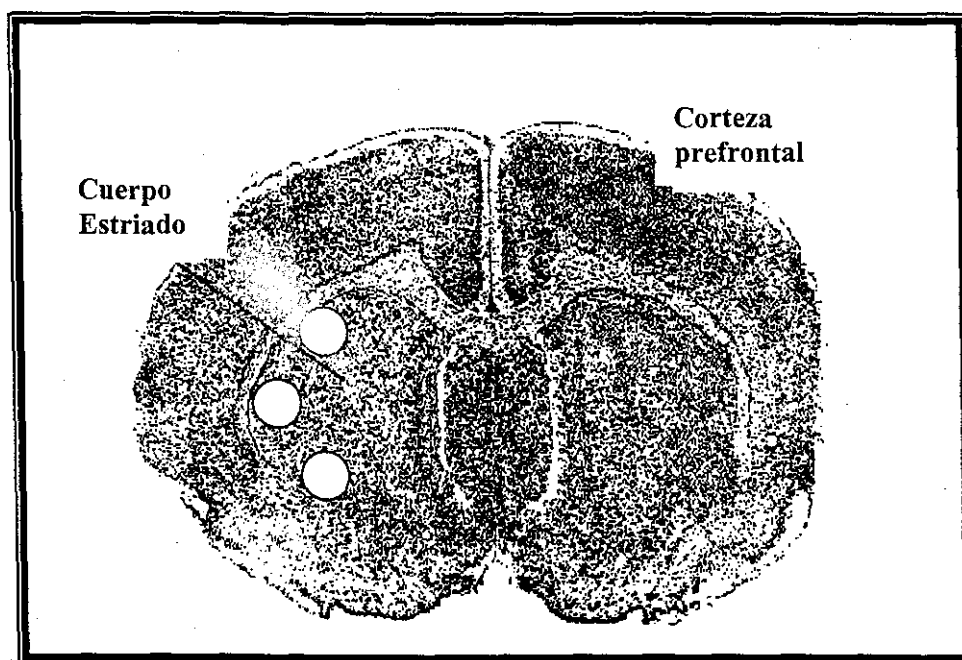


Figura 6. Corte coronal del cerebro de rata que ilustra las zonas estudiadas. Los círculos indican las zonas exploradas en la región del cuerpo estriado. Las coordenadas del corte corresponden a 9.7 mm de la línea interaural y 0.7 mm del Bregma (Paxinos y Watson, 1986).

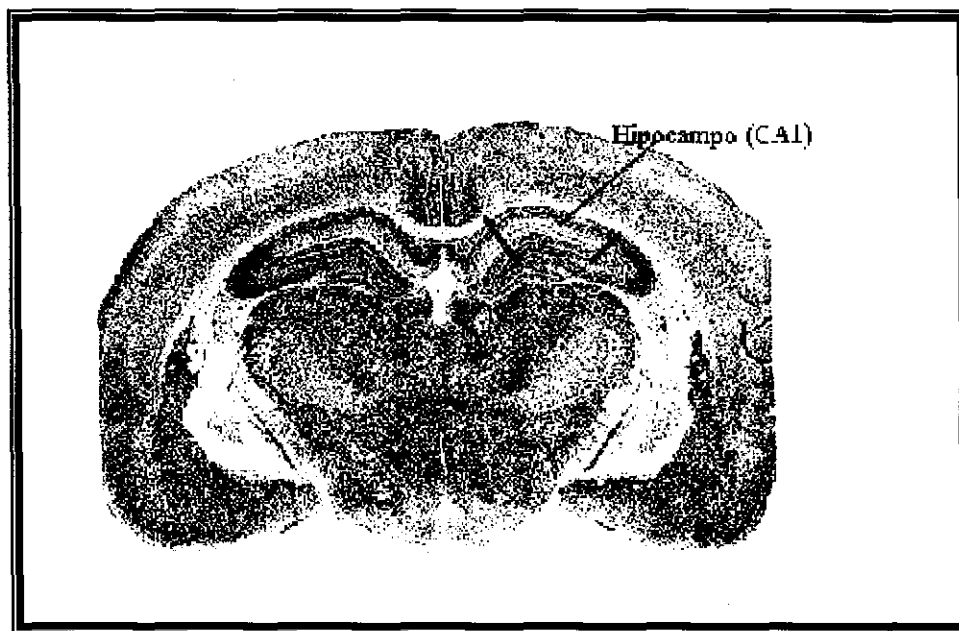


Figura 7. Corte coronal del cerebro de rata donde se muestra la zona CA1 del hipocampo analizada (entre líneas). Las coordenadas corresponden a 5.20 mm de la línea interaural y -3.80 mm del Bregma (Paxinos y Watson, 1986).

El análisis de la transformación de las imágenes inmunorreactivas para GFAP se realizó con las células y sus prolongaciones visibles en un mismo plano focal mediante una rejilla estereológica, siguiendo el método de cuantificación de puntos modificado de Weibel (Luquín, 1995). La rejilla de prueba consistió en 5 círculos concéntricos con una distancia entre cada círculo de $89.85\ \mu\text{m}$, el núcleo del astrocito se fijó en el centro de la rejilla y se cuantificó el número total de puntos en los que las prolongaciones celulares de los astrocitos intersecaron con las líneas de la rejilla de prueba (figura 8). La cuantificación se realizó a 400 aumentos. Para las células de microglia seguimos el mismo método para astrocitos; los núcleos de células de microglia se colocaron en el círculo central de esta gráticula y se cuantificó el número total de intersecciones de las

prolongaciones celulares de la microglia con las líneas de la rejilla de prueba x 400.

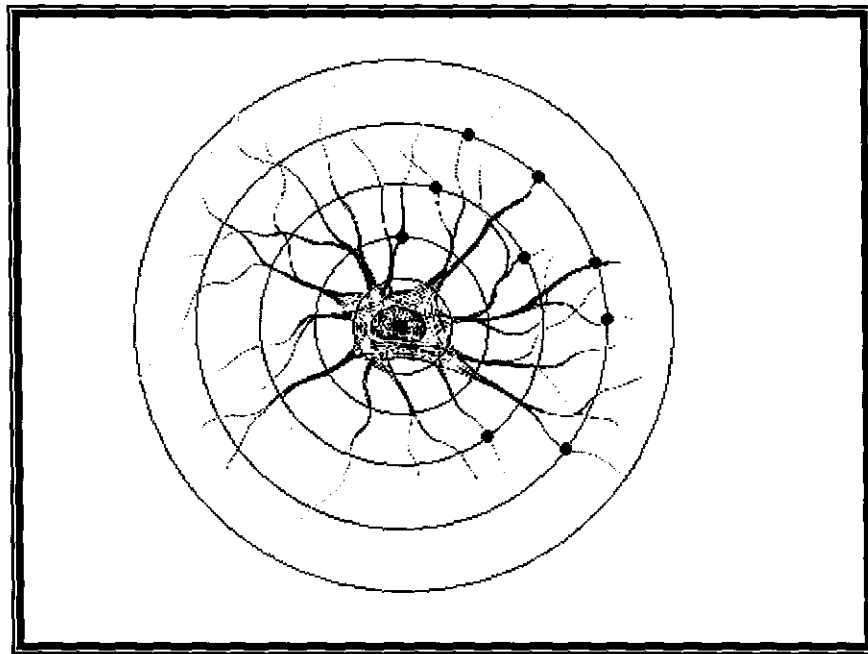


Figura 8. Diagrama del método de cuantificación utilizado mediante el uso de una rejilla estereológica. En el centro de ésta se posicionó el soma de cada astrocito o microglia y se registró el número de intersecciones resultante entre las prolongaciones citoplasmáticas astrocitarias y los círculos concéntricos, x400.

Análisis estadístico

Los resultados principales se expresan en promedios \pm error estándar. Si bien los resultados de las pruebas conductuales son variables continuas, su distribución no fue normal, por lo que las diferencias entre los grupos se determinaron con la prueba no paramétrica de *U de Mann-Whitney*. Los resultados de los análisis histológicos también son variables continuas, pero por el número de campos analizados y el número de células por campo, se puede

aplicar el teorema del límite central. Este teorema dice que puede considerarse distribución normal de una variable cuando su número muestral rebasa 30 (Daniel W., 1995). Por tal motivo, se determinaron las diferencias de estas variables entre grupos con la prueba paramétrica *t* de *student* para muestras independientes. Se consideró significancia estadística cuando $p \leq 0.05$; los intervalos de confianza, tanto para el reporte de promedios como para las diferencias, se determinaron al 95%.

Todos los procedimientos descritos fueron aprobados por el Comité de Ética para el Uso y Cuidado de los Animales de Experimentación del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS.

VII.- Resultados

Las características y los resultados de este estudio se han publicado recientemente (Ramos-Remus y cols., 2002), (ver anexo I).

Durante el transcurso de la administración de PDN, se presentaron algunas complicaciones: tres ratas tratadas con el esteroide fueron excluidas debido a que mostraron signos clínicos de infección pulmonar, caracterizados por hipodinamia, estertores y taquipnea; dichas ratas fueron excluidas del estudio y sacrificadas para efectuar la necropsia correspondiente, la cual reveló secreción traqueal purulenta e infiltrados pulmonares focales intraparenquimatosos de apariencia nodular, sugestivos de un proceso bronconeumónico agudo. El resto de los animales tratados con PDN no presentó ningún otro tipo de complicación. Lo que respecta al grupo control se eliminó un solo animal, por su incapacidad para nadar.

Los niveles séricos de glucosa, sodio, cloro y potasio en el grupo tratado con PDN no fueron diferentes a los del grupo control. Los resultados se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Variables Fisiológicas

	CONTROL	PDN	P
Glucosa	129.5 ± 8.5	131.87±10.38	0.76
Na⁺	147.0 ± 0.4	141.30± 0.62	0.34
K⁺	4.9 ± 0.4	5.03± 0.19	0.8
Cl⁻	103.9 ± 0.5	103.75 ± 0.71	0.82

Se muestran los resultados del análisis de química sanguínea realizados en las muestras de suero obtenidas al momento de su sacrificio. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos. Los datos expresan la media ± error estándar de cada grupo. "t" de student.

Análisis de adquisición y retención de memoria

En el cuadro 3 puede observarse los resultados numéricos de la prueba del laberinto acuático de Morris, la figura 9 muestra los resultados en forma gráfica. Las diferencias de los promedios entre grupos, por ensayo, se puede determinar en forma indistinta utilizando *t* student o *U* de Mann-Whitney para muestras independientes, o bien, con ANOVA de una sola vía o Kruskal-Wallis, aunque estas últimas pruebas estadísticas se utilizan fundamentalmente cuando existen tres o más grupos.

Se determinaron diferencias significativas en los ensayos 2, 5 y 7; esto sugiere que el grupo de PDN presentó retraso en la etapa de adquisición de

memoria en diferentes etapas de la prueba. Sin embargo, al realizar un análisis de regresión múltiple, se encontró que solamente el ensayo 2 entró en el modelo y los demás fueron excluidos por perder su significancia estadística. Esto sugiere entonces que las diferencias mostradas entre ambos grupos estuvieron determinadas principalmente por el retraso inicial (ensayo 2) del aprendizaje en el grupo PDN.

Cuadro 3. Resultados de la fase de adquisición con la prueba de laberinto acuático de Morris

	Grupo control n= 14	Grupo PDN n=12	p	IC 95% para diferencias
Ensayo 1	52.14 ± 4	55.7 ± 3	0.4	-14 a 6.8
2	35.38 ± 5	58.5 ± 1	0.001	-34 a -11.7
3	27.29 ± 5	30.19 ± 6	0.7	-18 a 12.8
4	41.5 ± 5	37.5 ± 5	0.5	-11 a 19
5	29.42 ± 3	44.42 ± 3	0.003	-24 a -56
6	35.4 ± 5	35.2 ± 7	0.9	-17 a 18
7	21.10 ± 2	31.2 ± 2	0.005	-17 a -33
8	37.19 ± 5	37.8 ± 3	0.9	-13 a 12
Promedio	34.3 ± 3	41.3 ± 1	0.02	-13 a -0.8

Cuadro 3 . Los datos muestran el promedio ± el error estándar de los resultados que se obtuvieron durante la evaluación de la fase de adquisición de memoria. El análisis estadístico (*U de Mann-Whitney*) mostró significancia en los ensayos 2, 5 y 7.

CURSO TEMPORAL DE LA ADQUISICIÓN DE MEMORIA

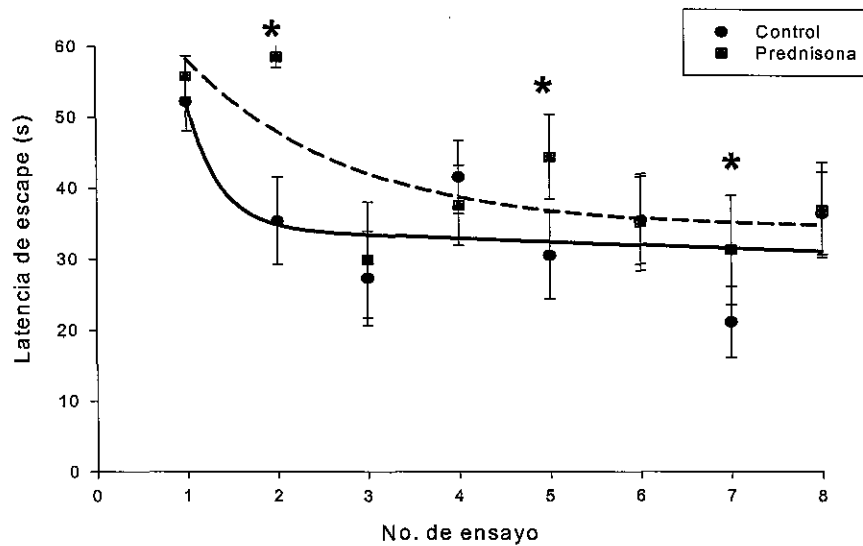


Figura 9. Resultados obtenidos en el laberinto acuático de Morris. El gráfico muestra el análisis de regresión del curso temporal de las latencias de escape, obtenidas durante el transcurso de los ocho ensayos. En forma global, se observa que el grupo tratado con PDN desarrolló más tiempo en localizar la plataforma. (*) Indica diferencias significativas. *U de Mann-Whitney* $P < 0.05$

La retención de memoria se evaluó veinticuatro horas después de la fase de adquisición (figura 10) y se observó que el grupo tratado con PDN permaneció menor tiempo en el cuadrante correcto (13 ± 0.8 s vs. 16 ± 0.75 , $p = 0.009$; IC 95% para diferencias de 0.9 a 5 s).

Retención de Memoria

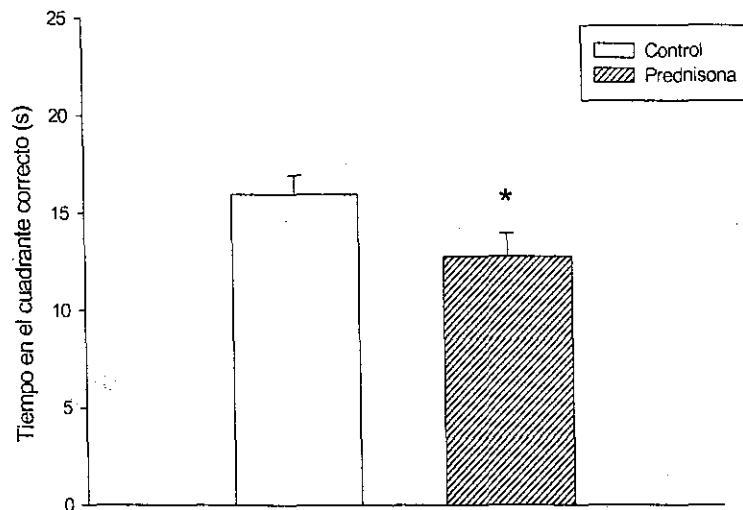


Figura 10. Retención de memoria a las 24 h después de su adquisición. La retención de memoria (reflejada por el tiempo en el cuadrante correcto) del grupo tratado con PDN fue menor en comparación con el grupo control. Las barras muestran la media \pm E.E.M. $P < 0.05$; *U* de Mann-Whitney.

El desempeño locomotor evaluado mediante la cuantificación de la distancia total recorrida y la velocidad de navegación no se encontró alterado por la administración de prednisona. Las figuras 11 y 12 muestran los resultados de estas variables. La velocidad de navegación cm/s del grupo control fue 20 ± 1.2 vs. 18 ± 0.9 , $p = 0.09$; IC 95%, 17 a 22; grupo PDN, 18 ± 0.9 ; IC 95%, de 15 a 19). La distancia recorrida en cm del grupo control fue de 692.9 ± 51 vs. 723.7 ± 51 ; IC 95% de la media para el grupo control de 581 a 802 s vs. grupo prednisona 611 a 836 s). El calculo *post hoc* del poder fue de 0.83 (Daniel, 1995).

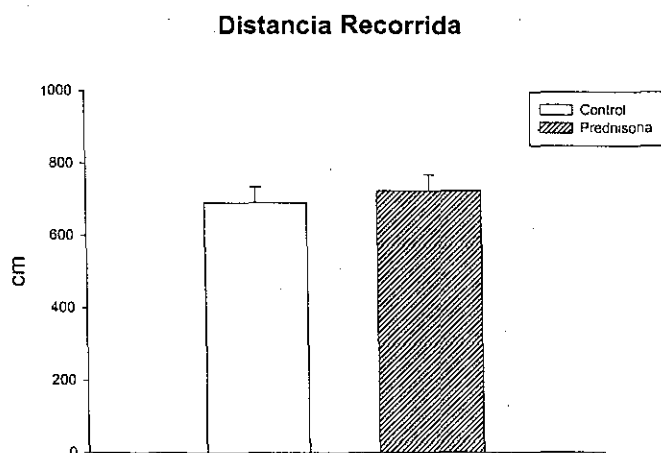


Figura 11. Evaluación de la distancia total recorrida (parámetro de motricidad), durante los 8 ensayos de la fase de adquisición de memoria. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el tratado con PDN. Las barras muestran la media \pm E.E.M. $P = 0.806$. *U* de Mann-Whitney

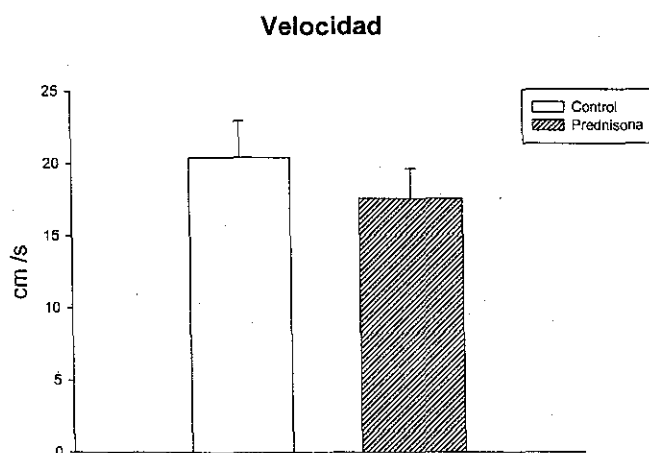


Figura 12. Análisis de la velocidad de navegación (parámetro de motricidad) desarrollada por los animales en el laberinto acuático, durante la etapa de retención de memoria. Las diferencia observadas entre los grupos control y PDN no fueron estadísticamente significativas. Las barras indican la media \pm E.E.M. $P = 0.118$; *U* de Mann-Whitney.

Análisis celular cuantitativo

Neuronas

La morfología neuronal predominante se ilustra en la figura 13. Los datos recabados del computo de la población total de neuronas cuantificadas por campo mostraron una disminución significativa en la población global de neuronas en corteza prefrontal (PDN 72.93 ± 0.65 vs. 75.50 ± 0.63 del control-vehículo; $p < 0.001$) y CA1 del hipocampo (PDN 76.71 ± 1.06 vs. 83.15 ± 0.87 control-vehículo; $p < 0.001$), no así en cuerpo estriado (PDN 71.26 ± 0.70 vs. 71.75 ± 0.73 del grupo control-vehículo) donde las diferencias observadas entre ambos grupos no mostraron significancia estadística.

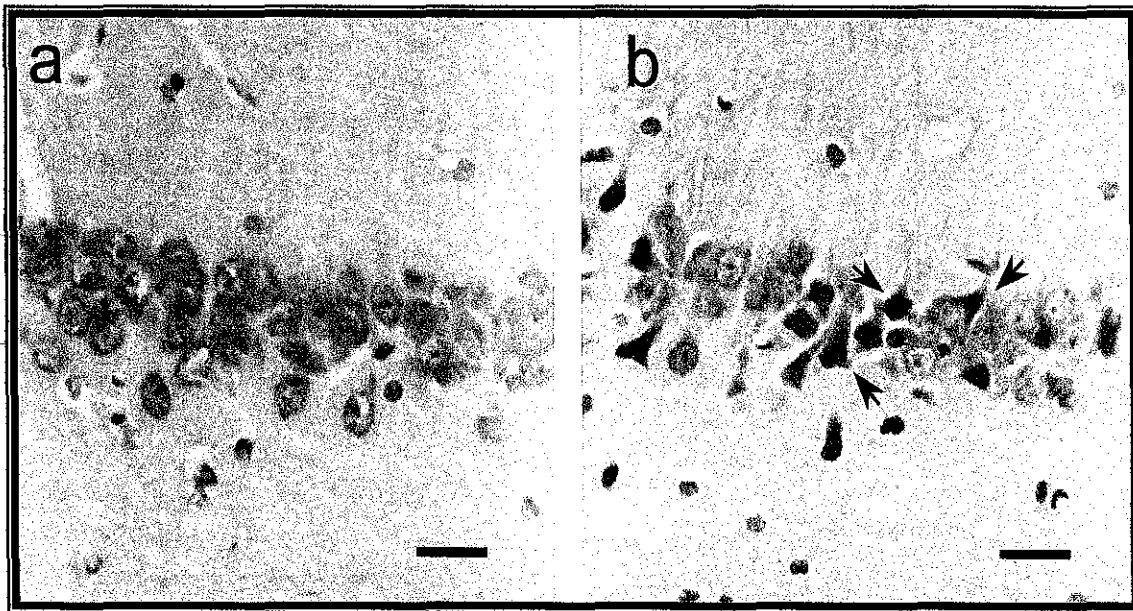


Figura 13. Neuronas de la región CA1 del hipocampo de rata. **a.** Morfología neuronal normal, grupo control; las neuronas aparecen redondeadas con citoplasma discretamente basófilo, núcleos prominentes con cromatina dispersa y nucleolos bien definidos. **b.** Grupo PDN, muestra un patrón típico de degeneración neuronal (flechas); el parénquima cerebral presenta pérdida de la afinidad a la hematoxilina; las neuronas se tornan fusiformes, su citoplasma muestra retracción y basofilia intensa (morado-azul), sus núcleos se tornan picnóticos con cromatina condensada y sin nucleolos aparentes. Tinción hematoxilina y eosina; barra = 25 μm .

Los resultados obtenidos del cálculo del número de neuronas degeneradas expresado en términos porcentuales, reveló que el índice de neurodegeneración en la corteza prefrontal del grupo tratado con PDN fue aproximadamente el doble respecto al grupo control-vehículo (grupo PDN, 10 ± 0.5 , IC 95%, 9 a 11; grupo control 5 ± 0.3 , IC 95%, 5 a 6, $p < 0.001$, IC 95% para diferencias de -6 a -3). En la región CA1 del hipocampo se incremento diez veces más el número de neuronas degeneradas en el grupo tratado con el esteroide (grupo PDN 5 ± 0.5 , IC al 95% de 4 a 6; grupo control, 0.5 ± 0.6 , IC 95%, 0.37 a 0.59, $p < 0.001$, IC 95% para diferencias de -6 a -4). El análisis realizado en la región del cuerpo estriado no mostró diferencias significativas entre ambos grupos (grupo PDN, 1.54 ± 0.15 vs. 1.99 ± 0.20 , $p = 0.078$).

Basados en una distribución de cuartiles se categorizó arbitrariamente la frecuencia de degeneración neuronal en: ninguna, leve, moderada y severa. Los resultados mostraron que el grupo tratado con PDN presentó casi el doble de degeneración severa en la corteza prefrontal y aproximadamente 10 veces más daño neuronal en la región CA1 del hipocampo cuando se comparo con el control $p < 0.001$ (cuadro 4). La variabilidad intraobservador fue 0.87.

Cuadro 4. Distribución de frecuencias de la degeneración neuronal

	Control	PDN
Corteza Prefrontal		
Ninguna	199 (39.2%)	102 (19.8%)
Leve	52 (10.2%)	29 (5.6%)
Moderada	86 (16.9%)	78 (15.2%)
Severa	171 (33.7%)	305 (59.3%)
CA1 Hipocampo		
Ninguna	346 (80.7%)	276 (59.5%)
Leve	27 (6.3%)	11 (2.4%)
Moderada	23 (5.4%)	16 (3.4%)
Severa	33 (7.7%)	161 (34.7)

Distribución de frecuencias de los grados de degeneración neuronal. En corteza prefrontal, el análisis estadístico mostró diferencias en el grupo tratado con PDN, en el cual se encontró aproximadamente el doble de neuronas con severa degeneración; mientras que, en el hipocampo, el porcentaje de neuronas con severa degeneración fue aproximadamente 5 veces mayor.

Análisis inmunocitoquímico de astrocitos

a) Estudio cuantitativo poblacional

Las características morfológicas de los astrocitos encontrados se presentan en la figura 14. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en la densidad de población astrocitaria del grupo tratado con PDN en las tres regiones examinadas (figura 15). En corteza prefrontal el grupo tratado con PDN presentó una media de 30.50 ± 0.40 células por campo en comparación con el grupo control-vehículo (26.75 ± 0.80 células por campo; $p < 0.01$). En el cuerpo estriado

se observó también un mayor número de células astrocitarias en el grupo PDN (26.93 ± 0.57) respecto al grupo control-vehículo (22.86 ± 0.35 ; $p < 0.01$). Por último en la región CA1 del hipocampo también se encontró un incremento en el número de astrocitos dentro del grupo tratado con PDN (34.25 ± 0.35 vs. control, 30.88 ± 0.41 ; $p < 0.01$).

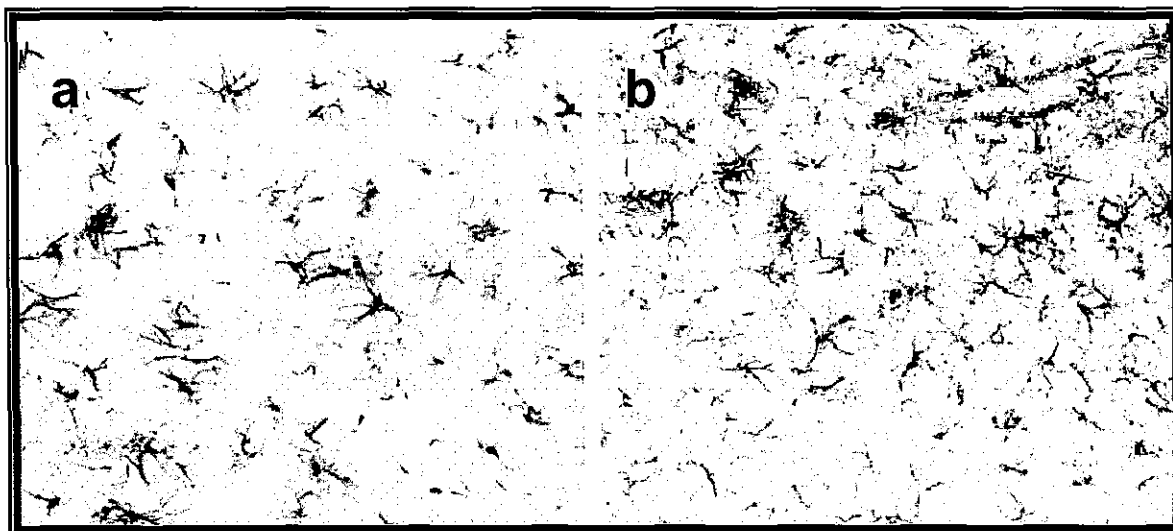


Figura 14. Astrocitos inmunopositivos a GFAP de la corteza prefrontal de rata en los grupos control (a) y PDN (b). En general, se observa un incremento en el número de astrocitos en el grupo experimental vs. control. Ampliación x200.

b) Estudio de transformación morfológica

Los resultados de la cuantificación del grado de transformación astrocitaria, entendido como el cambio en el número de intersecciones citoplasmáticas, se muestran en la figura 16. El análisis morfométrico del número de intersecciones citoplásmicas astrocitarias en la *corteza prefrontal* de las ratas control-vehículo (9.64 ± 0.19) mostró diferencias significativas con respecto al grupo PDN (11.70 ± 0.22 ; $p < 0.01$). Por otra parte, el grado de transformación que presentaron los astrocitos en el *cuerpo estriado* en ambos grupos: control-vehículo (14.71 ± 0.25) y PDN (14.14 ± 0.29), el análisis estadístico en esta zona no reveló diferencias

significativas ($p = 0.146$). En contraste, los datos obtenidos en la región CA1 del hipocampo mostraron diferencias entre el grupo control-vehículo (13.04 ± 0.25) y el grupo PDN (16.4 ± 0.26 ; $p < 0.01$).

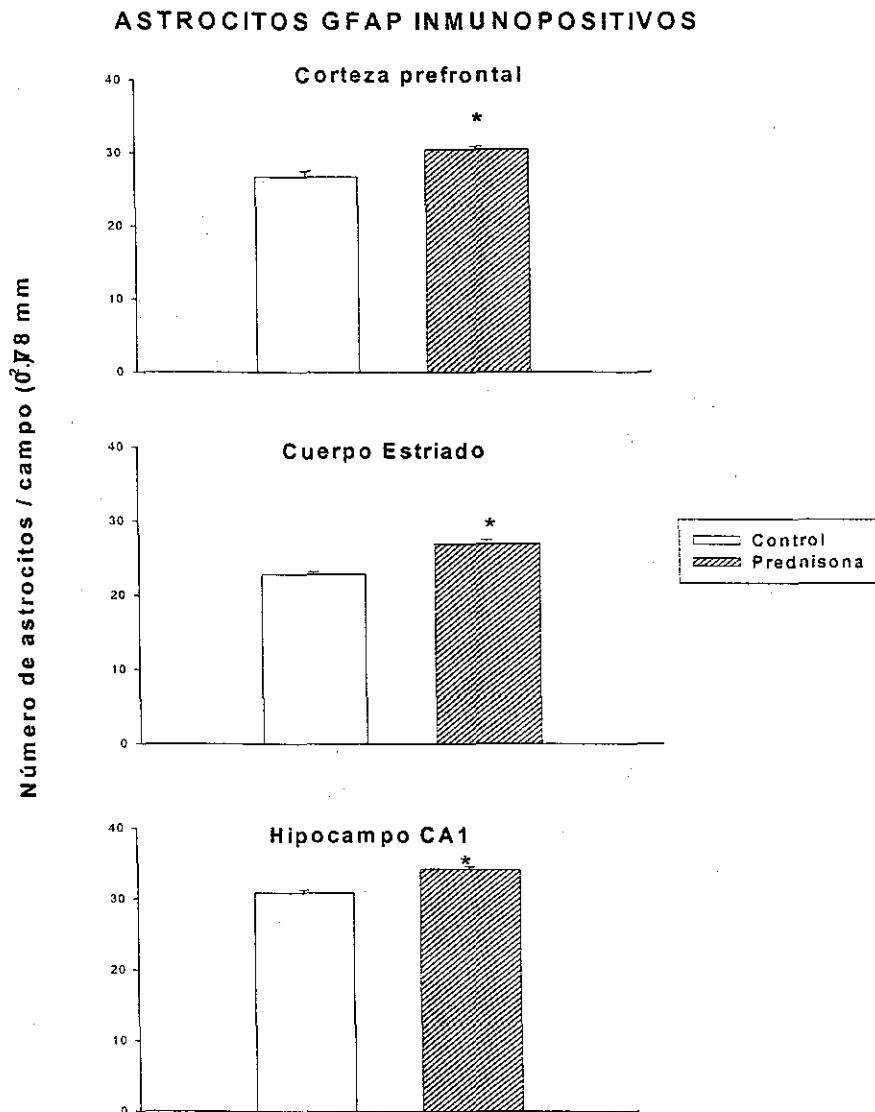


Figura 15. Número de astrocitos GFAP inmunopositivos, en ratas control vehículo y tratadas con PDN durante 90 días. La densidad numérica de astrocitos fue mayor en el grupo tratado con PDN en las tres regiones analizadas. Las barras muestran las medias \pm E.E.M. (*) Indica diferencias significativas entre las 3 regiones examinadas. $P < 0.01$; "t" de student.

TRANSFORMACIÓN ASTROCITARIA

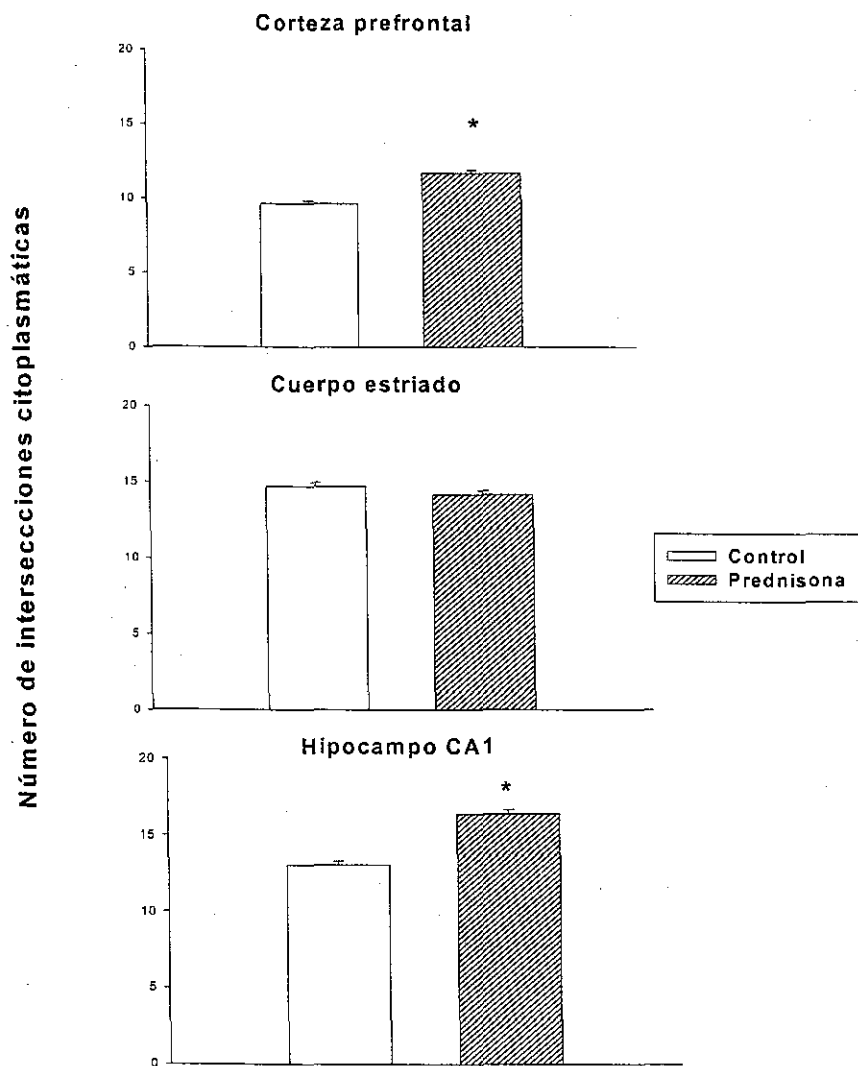


Figura 16. Transformación morfológica astrocitaria mediante registro del número de intersecciones citoplasmáticas en ambos grupos. Se observó mayor grado en corteza prefrontal y en la región CA1 del hipocampo del grupo PDN. Las barras indican las medias \pm E.E.M. (*) Indica diferencias significativas, "t" student ($p < 0.01$).

Análisis inmunohistoquímico de microglia

a) Estudio cuantitativo poblacional

La figura 17 muestra las características morfológicas de las células microgliales que prevalecieron durante el estudio. La cuantificación del número de las células microgliales (figura 18) en el grupo PDN mostró incremento del número de células de microglia isolectina-B4-positivas (24.92 ± 0.31) en la corteza prefrontal respecto al control (22.5 ± 0.35 ; $p < 0.01$). Por otra parte, los resultados obtenidos de la cuantificación en el *cuerpo estriado* también arrojaron diferencias significativas entre el grupo control (9.97 ± 0.22) respecto al tratado con PDN (8.25 ± 0.30 ; $p < 0.01$). Asimismo, el análisis sobre la región *CA1 del hipocampo* mostró diferencias limítrofes entre ambos grupos (control = 17.12 ± 0.24 vs. PDN 16.32 ± 0.35 ; $p = 0.064$).

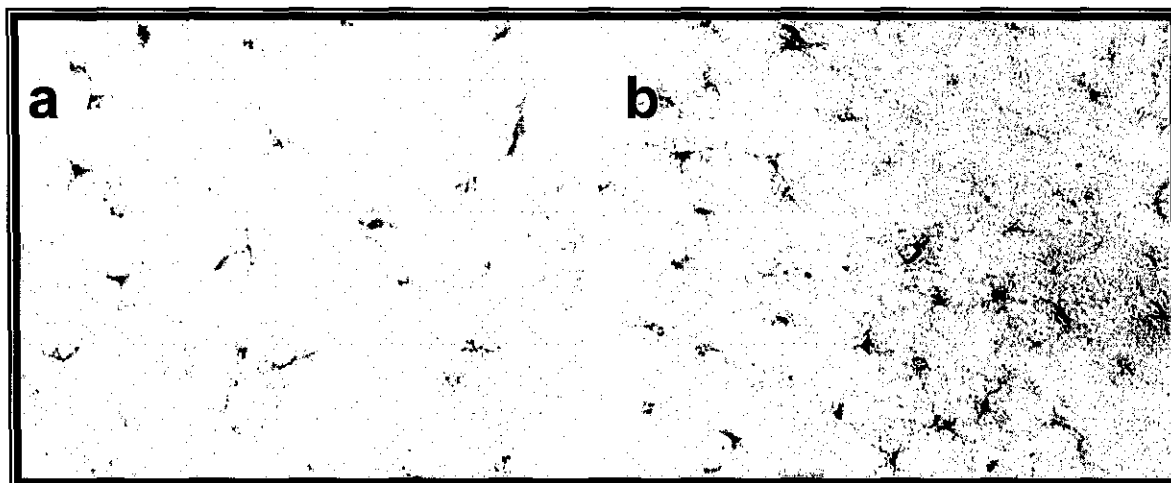


Figura 17. Histoquímica con isolectina-B4 para marcaje de células de microglia de la corteza prefrontal en los grupos control (a) y PDN (b). Se distingue un marcaje intenso en el grupo tratado con PDN, caracterizado por la detección de un mayor número de células de microglia en dicha zona. Amplificación x200.

b) Estudio de transformación morfológica microglial

Con el análisis regional de las células de microglía (figura 19) de la corteza prefrontal se observaron diferencias entre el grupo de ratas control-vehículo = 12.20 ± 0.28 , en relación con el grupo PDN = 8.40 ± 0.27 ($p < 0.01$). En contraparte, el análisis de la transformación citoplasmática microglial en el *cuerpo estriado* no mostró diferencias en el número de intersecciones: grupo control (8.66 ± 0.18) vs. grupo PDN (8.37 ± 0.22); $p = 0.324$. Por último el análisis en la región *CA1 del Hipocampo* tampoco reveló diferencias entre ambos grupos (control-vehículo = 14.02 ± 0.26 vs. PDN = 13.7 ± 0.29 ; $p = 0.533$).

ANÁLISIS MICROGLIAL

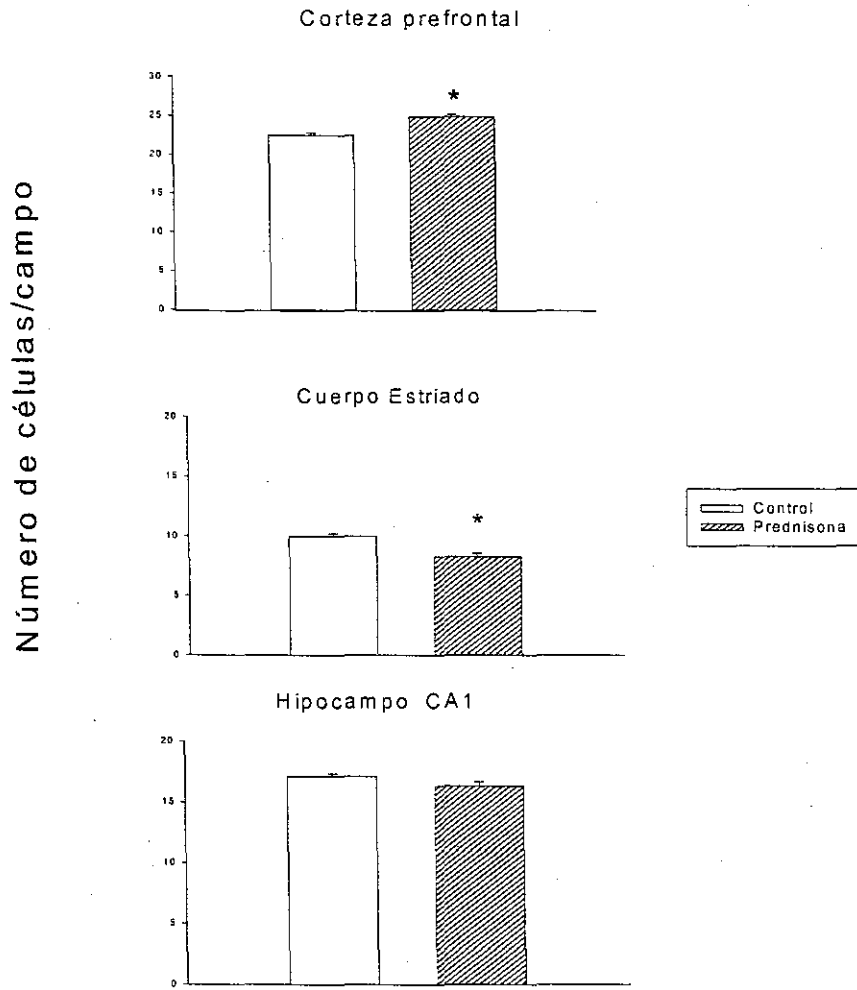


Figura 18. Densidad microglial 90 días post-tratamiento. En la corteza prefrontal de las ratas tratadas con PDN, se observó un incremento en la población de esta estirpe celular comparada con el grupo control; en contraparte, los resultados en el cuerpo estriado del grupo tratado con PDN muestran un decremento del número de células microgliales vs el control. Las barras representan la media \pm E.E.M. (*) $P < 0.05$, t student.

ANÁLISIS DE TRANSFORMACIÓN MICROGLIAL

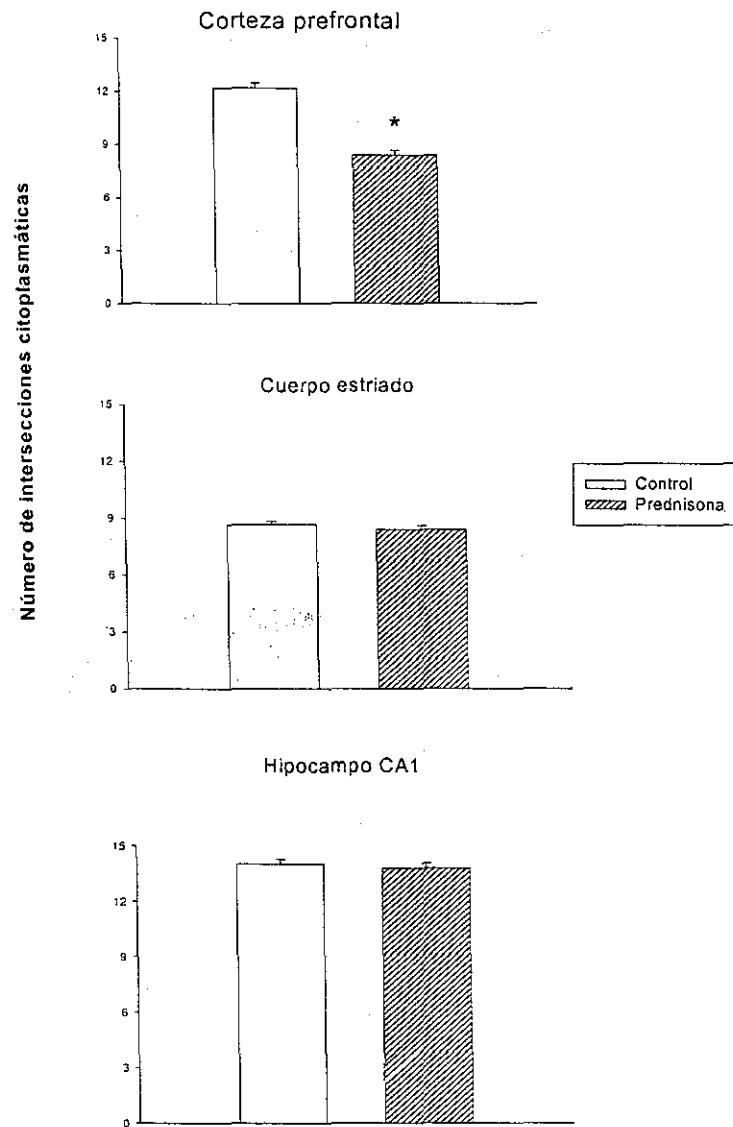


Figura 19. Transformación morfológica microglial. Se encontró mayor grado de transformación en las células microgliales residentes en corteza del grupo tratado con respecto al control. Las barras indican las medias \pm E.E.M. (*) Indica diferencias con significancia estadística $p < 0.05$; *t* de student.

PDN y adquisición de memoria

Existen numerosas pruebas psicofísicas para identificar la presencia de alteraciones cognoscitivas, una de las más representativas y comúnmente utilizadas es el paradigma acuático de Morris. Esta prueba sirve para evaluar la integridad de los circuitos corticales e hipocampales no relacionados con los circuitos espinales de coordinación motora, necesarios para los movimientos de natación. Por lo tanto, el desempeño adecuado para resolver el paradigma acuático de Morris se considera indicativo de la capacidad de aprendizaje espacial y del almacenamiento de memoria temporal. Consecuentemente, la presencia de alteraciones en el desarrollo de esta prueba sugiere fuertemente la presencia de anomalías funcionales a nivel hipocampal (Morris, 1984).

Los resultados observados en nuestro estudio sugieren que la administración crónica de dosis moderadas de PDN produce trastornos significativos en la fase de adquisición y retención de memoria. Dichas alteraciones se observaron principalmente durante los primeros ensayos en la etapa de adquisición de memoria. Lo que indica que la PDN retrasó la velocidad de la adquisición, lo cual posteriormente se vio reflejado en una disminución de la capacidad de retención de memoria. En contraparte, el desempeño locomotor del grupo PDN, evaluado mediante la velocidad de navegación y distancia recorrida, no fue modificado por la administración de este fármaco, lo que sugiere que los resultados no son explicados por efecto sobre la función muscular. La posibilidad

de un error tipo II en el análisis de estas variables es baja; esto quedó demostrado con el cálculo resultante de la estimación del poder de dicha prueba, así como por el escaso traslape de los IC 95% en las variables velocidad de navegación y distancia recorrida.

Nuestros resultados coinciden con algunos reportes clínicos en donde se ha asociado el tratamiento de PDN con disfunción cognitiva en humanos. Por ejemplo, Wolkowitz y colaboradores en 1994, reportaron que la administración aguda de dosis altas de PDN o dexametasona a voluntarios sanos generó un desempeño inadecuado de ciertas funciones cognoscitivas (memoria verbal) e induce la presencia de errores de comisión (Wolkowitz y cols., 1994). En adición, existen reportes clínicos que describen la presencia de alteraciones psiquiátricas subclínicas y déficit selectivo neuropsicológico asociados con el tratamiento con glucocorticoides sintéticos en pacientes con asma, enfermedad de Crohn u otros padecimientos sistémicos (Snyder y cols., 1994). Lupien y colaboradores en 1997, reportaron la presencia de efectos adversos sobre la función y consolidación de la memoria, secundarios a la administración de glucocorticoides exógenos (Lupien y cols., 1997). Otras evidencias encontradas en humanos han relacionado el incremento de los niveles séricos de corticoesteroides con alteraciones en la memoria declarativa, espacial y contextual (McEwen, 2000). Además, en modelos de estrés, se ha demostrado que la administración en dosis altas de glucocorticoides impide la memoria episódica y espacial en roedores, así como en otras especies (McGaugh y cols., 1995). Un mecanismo probable a través del cual los glucocorticoides inducen disfunción cognitiva podría ser la disminución en la síntesis de serotonina (5-Hidroxitriptamina; 5-HT) (Maurel y col., 2000). Este neurotransmisor está asociado con funciones cognitivas; por lo tanto, aquellas alteraciones en su metabolismo pueden generar trastornos en los procesos de atención, aprendizaje y retención de memoria. Es posible que la administración de PDN pueda afectar la

esfera cognitiva a través del mismo mecanismo descrito con los glucocorticoides naturales.

Efecto de la PDN sobre la población celular (neuronas, microglia y astrocitos)

a) Neuronas

La cuantificación de neuronas en la **corteza prefrontal** y **CA1 del hipocampo** mostró un decremento en el número de neuronas por campo y un aumento en el índice de neurodegeneración en el grupo tratado con PDN. En contraste, los datos encontrados en **cuerpo estriado** no revelaron cambios en la población neuronal ni en el índice de degeneración. Estas diferencias regionales podrían indicar una sensibilidad desigual ante los efectos de los glucocorticoides en cada porción cerebral (De Kloet y cols., 1998). La mayor susceptibilidad a daño se encontró en la corteza prefrontal e hipocampo (coincidente con mayores tasas de neurodegeneración); esto se vio reflejado con mayor degeneración neuronal. Ello podría explicar la disminución de la población neuronal cuantificada por campo en ambas regiones. Estas regiones cerebrales que presentaron mayor vulnerabilidad a los efectos de los glucocorticoides poseen a su vez mayor número de aferencias glutamatérgicas (Petrulia y cols., 1996).

Las alteraciones sobre la población de neuronas concuerdan con las descripciones de atrofia dendrítica (Magariños y cols., 1997; Magariños y col., 1995) y pérdida neuronal observados con dosis suprafisiológicas de corticosterona (Issa y cols., 1990). Asimismo, los cambios degenerativos encontrados en el presente trabajo son similares a los descritos en aquellas enfermedades que cursan con niveles elevados de glucocorticoides y pudieran explicar la disminución del volumen hipocampal (Magariños y cols., 1997; McEwen., 1997). La relevancia de

establecer el momento preciso en el cual ocurre la pérdida neuronal es importante por que la atrofia reversible inducida por glucocorticoides (Magariños y cols.,1997; McEwen, 1997) puede ser tratada en el momento en que se descubre, sin embargo la degeneración neuronal tardía no. Uno de los posibles mecanismos por el cual la PDN pudiera generar pérdida neuronal sería a través de la disminución en el transporte activo de glucosa y consecuentemente déficit de ATP y falla en la función mitocondrial (Homer y cols.,1990; Belanoff y cols.,2001;). Esta deficiencia energética retardaría tanto la remoción del glutamato desde las sinapsis como la recaptura del Ca^{++} citosólico y favorece la sucesión de eventos degenerativos calcio-dependientes, tales como la proteólisis citoesquelética (Smith y cols., 1995; Sapolsky, 1996;). Además, estudios realizados con cultivos hipocampales han demostrado que los GCs incrementan los niveles extracelulares de aminoácidos excitatorios (EAA), con ello afectan su recaptura y generan alteraciones morfológicas neuronales (Massieu y col., 1997). Por otra parte, mecanismos alternos no genómicos implican alteraciones directas en la unión de la calmodulina con la membrana sináptica y sobre la función de los canales de Ca^{++} voltaje-dependientes (Sze y cols., 1994).

En contraste, otros mecanismos propuestos de daño neuronal sugieren que la inducción de lesión requiere la participación de una vía genómica con reducción de la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Smith y cols., 1995), que activa el eje HPA (Otten y cols., 1979) y altera la síntesis de moléculas neurotróficas específicas, moduladoras de la síntesis de otras sustancias. Sin embargo, debido al tipo de metodología empleada en el presente estudio, no es posible precisar el mecanismo de daño de la PDN; para ello sería necesario implementar nuevos estudios para esclarecer este rubro.

b) **Astrocitos**

La evaluación de la reactividad astrocitaria se uso como indicador de daño del tejido cerebral; esta respuesta se caracteriza por un incremento rápido de la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (Persson, 1976; Isacson y cols., 1987). Los astrocitos responden activamente ante una lesión transformándose y proliferando, independientemente del mecanismo por el cual se produjo (Topp y cols., 1989; Hozumi y cols., 1990). El incremento en la inmunoreactividad de GFAP, como respuesta a una lesión, generalmente se manifiesta en grandes cantidades y es proporcional a la magnitud de misma (Rosengreen y col., 1989, Topp y cols., 1989). Nuestros hallazgos revelaron que la administración *in vivo* de PDN durante 90 días, indujo astrocitosis reactiva en la **corteza prefrontal** y en la región **CA1 del hipocampo**, manifestada por un incremento significativo de la densidad poblacional y su transformación citoplasmática. En el **cuerpo estriado**, el análisis histológico de astrocitos mostró un incremento de la población celular, no así en su transformación citoplásmica.

Cabe resaltar que los cambios neuronales degenerativos encontrados en este estudio ocurrieron coincidentemente en corteza prefrontal y en la región CA1 del hipocampo. Esto sugiere que la sobre-expresión de GFAP, encontrada en nuestro estudio, puede indicar la presencia de reactividad astrocitaria como respuesta al daño neuronal. De hecho, se ha reportado que los glucocorticoides ejercen una potente influencia sobre la proliferación, diferenciación y función astrocitaria tanto *in vitro* como *in vivo* (Kniss y cols., 1985; Aizenman y cols., 1987). Al respecto, estudios recientes han identificado la participación de los receptores a glucocorticoides tipo II en la activación de esta estirpe celular (Imai y cols, 2001). En situaciones de estrés, los astrocitos responden con un patrón similar al de post-

lesión en tejido nervioso (Lambert y cols., 2000). Otro mecanismo que explicaría el incremento en el inmunomarcaje astrocitario podría ser una sobre-regulación en la expresión de la GFAP como consecuencia de disminución en la síntesis de la enzima triptófano hidroxilasa mRNA (Le Prince y cols., 1990; Clark y col., 1997). En suma, los mecanismos descritos anteriormente pudieran explicar que la magnitud de la respuesta astrocitaria encontrada en corteza e hipocampo podría depender tanto de hiperreactividad secundaria a daño o alteraciones en la bioquímica glial cerebral.

Finalmente, el análisis histológico de astrocitos en **cuerpo estriado**, mostró un incremento de la población celular, no así en su transformación citoplásmica. Como se mencionó anteriormente, esta región cerebral es relativamente pobre en población neuronal y aferencias glutamatérgicas (Petralia y cols., 1996). Asimismo, se ha mencionado que las porciones periventriculares del cuerpo estriado son considerados los "tractos" por los cuales transcurre la migración celular tanto de astrocitos como de neuronas *de novo* (Gritti y cols., 2002). Por lo tanto, los cambios en la celularidad encontrados en nuestro estudio podrían reflejar solamente la presencia de migración celular astrocitaria, sin incremento en la inmunorreactividad global de GFAP, dado que no se demostró la presencia de cambios conformacionales en el citoplasma de estas células.

c) Microglia

La tercer población estudiada fue la microglial ya que también es considerada como indicador de lesión y de manera similar a los astrocitos, ante un evento nocivo se caracteriza por sintetizar mayor cantidad de residuos α -D-galactosa en las glucoproteínas integrales de membrana (Riva-Depati y cols., 1994). El análisis histológico en este estudio mostró una mayor susceptibilidad de esta

estirpe celular, principalmente en **corteza prefrontal** donde se registró un incremento en número y transformación citoplásmica; en contraparte no hubo cambios significativos en la región del **hipocampo** y **cuerpo estriado**. La alta vulnerabilidad de las células microgliales residentes en la corteza prefrontal ha sido reportada previamente con el empleo de dosis subagudas de PDN (González-Pérez y cols., 2001).

La capacidad de los glucocorticoides para modificar la morfología y celularidad glial ha sido descrita en otros estudios, los cuales han utilizado glucocorticoides naturales (corticoesterona) y sintéticos (dexametasona) (McRae y cols., 1996; Wang y cols., 1998). Por otra parte, se ha propuesto que los glucocorticoides *in vivo* no ejercen un efecto directo sobre las células gliales y neuronas residentes en la corteza, sino que actuarían sobre regiones glutamatérgicas ricas en RG, que a su vez modifican la plasticidad celular cortical (Petralia y cols., 1996). Al respecto, se ha demostrado que la administración postnatal de glutamato monosódico modifica la densidad y morfología de las células de microglia en ratas (Martínez y cols., 2002). El mecanismo por el cual ocurre este fenómeno permanece incierto; probablemente sea debido a neuro-excitotoxicidad mediada por glutamato (Reagan y col., 1997). Esta sobre-excitación neuronal prolongada conduciría a alteraciones en la homeostasis de las neuronas y consecuentemente resultaría en transformación de microglia, interpretable como una respuesta celular adaptativa frente a una mayor demanda de recambio con su entorno (Streit y cols., 1995; Gerhmann y cols., 1993; Martín, 1992).

En contraparte, el incremento observado en el número de células de microglia no puede ser explicada por migración de monocitos (precursores sanguíneos de microglia) hacia el SNC, por que los glucocorticoides producen una drástica reducción de éstos (Kaur y cols., 1994). Una explicación más viable para

este fenómeno es la activación de células microgliales, puesto que con la dilución empleada de la isolectina-B4 (1:100) es posible detectar más fácilmente la microglia activada que aquella en reposo (Marty y cols., 1991).

El hipocampo posee una elevada densidad de RGs cerebrales (Morimoto y cols., 1996) y altas concentraciones de la enzima 11 beta-HSD-1; esta cantidad de receptores hacen que el hipocampo sea de las regiones más vulnerables a los efectos neurotóxicos de los glucocorticoides (Seckl, 1997; Reagan y col., 1997, Behl y cols., 1997; Unlap y col., 1997). Por ello parecería contradictoria la ausencia de reactividad microglial en esta región; ello puede deberse a la interacción que otros compuestos ejercen sobre la modulación de células microgliales. Al respecto, está reportado que la PDN incrementa la concentración intracelular de progesterona mediante inhibición de la 5 alfa-tetrahidroprogesterona (Stüremberg y cols., 1997); la importancia de este evento radica en que la progesterona es capaz de modificar la transformación citoplasmática de las células de microglia (Fujita y cols., 1996).

El análisis morfo-métrico en el **cuerpo estriado** mostró una ligera disminución de la densidad microglial sin modificación en su transformación. Esta región cerebral es relativamente pobre en aferencias glutamatérgicas (Petralia y cols., 1996). Por lo tanto, es poco probable que el mecanismo de activación microglial por glutamato (descrito previamente) participe en la reactividad de estas células. Los glucocorticoides pueden producir efectos opuestos, actuando como inhibidores a través de receptores a glucocorticoides o estimuladores a través de receptores a mineralocorticoides (Tanaka y cols., 1997; Raber, 1998). Este mecanismo dual pudiera explicar la reducción de la población celular encontrada en esta región.

En resumen. Los resultados de este estudio coinciden con aquellos encontrados con dosis suprafisiológicas de glucocorticoides endógenos y en modelos de estrés, en los cuales se ha demostrado el efecto adverso de los glucocorticoides sobre las diversas funciones cognitivas (Sapolsky y cols., 1996; Magariños y cols,1998;). Sin embargo, este es el primer reporte que describe los efectos adversos producto de la administración crónica de PDN sobre las funciones cognoscitivas (adquisición y retención de memoria) y la inducción de degeneración neuronal con reactividad glial. Asimismo, estos resultados apoyan la evidencia que señala a los corticoesteroides como la causa de alteración funcional y pérdida de la integridad neuronal en diversas condiciones patológicas, tales como, enfermedad de Cushing, Alzheimer, demencia senil, etc. (McEwen y cols.,1999).

Finalmente, el presente trabajo aporta hallazgos que obligan necesariamente a desarrollar nuevos estudios, en donde se establezca la relación causa-efecto de la administración de esteroides a largo plazo y la presencia de destrucción neuronal, con objeto de determinar la repercusión de los cambios estructurales cerebrales en los seres humanos bajo tratamiento con PDN u otros glucocorticoides.

IX.- Conclusiones

- 1.- La administración crónica de PDN afectó la capacidad de adquisición y retención de memoria.
- 2.- La PDN indujo cambios sugestivos de neurodegeneración y muerte neuronal en la corteza prefrontal y en el hipocampo CA1.
- 3.- La administración de este fármaco se asoció con reactividad astrocitaria en corteza prefrontal, cuerpo estriado e hipocampo CA1. Asimismo, mayor activación microglial, principalmente en la región de la corteza prefrontal.

Aizenman Y, de Vellis J. Synergistic action of thyroid hormone, insulin and hydrocortisone on astrocyte differentiation. *Brain Res* 1987; 414:301-08.

Aron DC, Findling JW, Tyrrell JB. Glucocorticoides y andrógenos suprarrenales. En: *Endocrinología Básica y clínica. Manual Moderno, S.A. México D.F., 1995:353-65.*

Banati R, Gerhmann J, Schubert P. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 1993;7:111-18.

Behl C., Lezoualc'h F., Trapp T., Windmann M., Skutella T., Holsboer F. Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons in vitro. *Endocrinology* 1997;138(1):101-6.

Belanoff JK, Kalehzan M, Sund B, Fleming Ficek, SK, Schatzberg AF. Cortisol activity and cognitive changes in psychotic major depression. *Am J Psychiatry* 2001;158: 1612-16.

Bender B, Lerner J, Poland J. Association between corticosteroids and psychologic change in hospitalized asthmatic children. *Ann Allergy* 1991; 66:424-29.

Bentson J, Reza M, Winter J, Wilson G. Steroid and apparent cerebral atrophy on computed tomography scans. *J Comp Ass Tomograp* 1978;2:16-23.

Bignami A, Dahl D. Astroglial response to staining in immunofluorescence studies with antibodies to the glial fibrillary acidic protein. *Neuropath Appl Neurobiol* 1976;29: 99-110.

Brey RL, Holliday SL, Saklad AR, Navarrete MG, Hermosillo-Romo D, Stallworth CL, Valdez CR, Escalante A, del Rincon I, Gronseth G. Neuropsychiatric

syndromes in lupus: Prevalence using standardized definitions. *Neurology* 2002; 58:1214-20.

Chen T, Mackic J, McComb J, Giannotta S. Cellular uptake and transport of methylprednisolone at the blood-brain barrier. *Neurosurgery* 1996;38:348-54.

Clark MS, Russo AF Tissue-specific glucocorticoid regulation of tryptophan hydroxylase mRNA levels. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 48:346-54.

Coirini H, Flores D, Vega M, González-Deniselle, De Nicola A. Binding of anti-inflammatory steroid deflazacort to glucocorticoid receptor. *J. Steroid Biochem Mol Biol* 1994;46: 43-9.

Cooper C, Kirwan J. The risks of local and systemic corticosteroid administration. *Baillieres Clin Rheumatol* 1990;4:305-32.

Cotton A, Gilbert D. Production of superoxide by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett* 1987; 223:284-88.

Crossin K, Tai M, Krushel L, Mauro V, Edelman G. Glucocorticoid receptor pathways are involved in the inhibition of astrocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2687-92.

Daniel WW. Hypothesis testing. In Daniel WW ed. *Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences.* John Wiley & Sons, Inc. New York, USA, 1995. pp: 201-69

De Kloet E R, van Acker Saskia AB, Sibug Rosana M. Brain mineralocorticoid receptors and centrally regulated functions. *Kidney Int* 2000; 57(4).1329-36.

De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endoc Rev* 1998; 19:269-301.

De Quervain DJ, Roozendaal B, McGaugh JL Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 1998; 94:787-90.

- Eddleston M, Mucke L.** Molecular profile of reactive astrocytes implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 1993;54:15-36.
- Eng L, Shiurba R.** Glial fibrillary acidic protein. A review of structure, function and clinical application. En: *Neurobiological Research, vol 2* (PJ Marangos, I Campell y R Coben eds), New york 1988, Academic Press, pp 635-84.
- Estrada E, Peralta L, Rivas P.** Manual de Técnicas Histológicas. AGT Ed. S.A. México D.F. 1982;pp:63-5.
- Frei K, Sielp C, Grosmith P.** Antigen presentation an tumor cytotoxicity by interferon γ - treated microglia cell. *Eur J Immunol* 1987;12:237-43.
- Fujita H, Tanaka J, Toku K, Tateishi N, Susuki Y, Matsuda S.** Effects of GM-CSF and ordinary supplements on the ramification of microglia in culture: a morphometrical study. *Glia* 1996;18:269-81.
- García EJ, Luquín S, Fernández AM, García SL.** Dehydropiandrosterone, pregnenolone and sex steroids down-regulate reactive astroglia in male rat brain after a penetrating brain injury. *Int J Devl Neuroscience* 1999; 17:145-51.
- García JH, Liu KF, Ho KL.** Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progress at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. *Stroke* 1995; 26(4):636-42.
- Garcia JH, Liu KF, Ye ZR, Gutierrez JA.** Incomplete infarct and delayed neuronal death after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1997;28:2303-09.
- Gerhmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg G.** Microglia intrinsic immunoeffector cell of the brain. *Brain Res Rev* 1995; 20:269-87.
- Gonzalez-Perez O, Ramos Remus C, Garcia-Estrada J, Luquin S.** Prednisone induces anxiety and glial cerebral changes in rats. *J Rheumatol* 2001;28:2529-34.
- Goodman Gilman AS, Goodman L, Gilman A.** Las bases farmacológicas de la terapéutica. ED. Panamericana, Sexta ed. 1982.

Gritti A, Bonfanti L, Doetsch D, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 2002;22(2):437-45.

Haynes R, Murad F. Hormona adrenocorticotrófica, esteroides adrenocorticales y sus análogos sintéticos. En: bases Farmacológicas de la Terapéutica. (Goodman y Gilman eds.) México DF 1986, Panamericana, pp 1384-411.

Hickey W, Kimura H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 1988;239: 290-92.

Horner HC, Packan DR, Salpolsky RM. Glucocorticoids inhibit glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia. *Neuroendocrinology* 1990; 52:57-64.

Hozumi I, Chin F, Norton W. Biochemical and immunocytochemical changes in glial fibrillary acidic protein after stab wounds. *Brain Res* 1990;524:64-71.

Imai H, Nishimura T, Sadamatsu M, Liu Y, Kabuto M, Kato N. Type II glucocorticoid receptors are involved in neuronal death and astrocyte activation induced by trimethyltin in the rat hippocampus. *Exp Neurol* 2001;171(1):22-8.

Isacson, O., Fischer, W., Victorin, K., Dawbarn, D., Bjorklund, A. Astroglial response in the excitotoxically lesioned neostriatum and its projection areas in the rat. *Neuroscience* 1987; 20:1043-56.

Issa AM, Rowe W, Gauthier S, Meany MJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively unimpaired rats. *J Neurosci* 1990;10:3247-54.

Jacobs S, Bootsman A, Willems P, Bar P, Wokke J. Prednisone can protect against exercise-induced muscle damage. *J Neurol* 1996;243(5):410-6.

Joels M. Steroid hormones and excitability in the mammalian brain. *Front Neuroendocrinol* 1997;18: 2-48.

Kaur C, Wu C, Wen C, Ling E. The effects of subcutaneous injections of glucocorticoids and amoeboid microglia in postnatal rats. *Arch Histol Cytol* 1994;57: 449-59.

Keenan P, Jacobson M, Soleymani R, Mayes M, Stress M, Yaladoo D. The effect on memory of chronic prednisone treatment in patients with systemic disease. *Neurology* 1996;47:1396-402.

Kniss DA, Burry RW. Glucocorticoid hormones inhibit DNA synthesis in glial cells cultured in chemically defined medium. *Exp Cell Res* 1985;161:29-40.

Kubli C, Acción neuromoduladora de las hormonas esteroides. En: *Fundamentos de Neuroendocrinología (Zárate A, Moran C, eds.) México DF 1993, Biblioteca de la salud, pp 93-108.*

Lackner C, Daufeldt S, Wildt L, Allera A. Glucocorticoid-recognizing and effector sites in rat liver plasma membrane. Kinetic of corticosterone uptake by isolated membrane vesicles. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998;64: 69-82.

Lambert KG, Gerecke KM, Quadros PS, Doudera E, Jasnow AM, Kinsley CH. Activity-stress increases density of GFAP- immunoreactive astrocytes in the rat hippocampus. *Stress* 2000;3(4):275-84.

Lawson L, Perry V, Drip P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1991;39:151-70.

Le Prince G, Copin MC, Hardin H, Belin MF, Bouilloux JP, Tardy M. Neuron-glia interactions: effect of serotonin on the astroglial expression of GFAP and of its encoding message. *Brain Res Dev Brain Res* 1990; 511:295-98.

Li Y, Jiang N, Powe C, Chopp M. Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated protein 2, growth-associated protein 43, and cyclin 01 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1998;29:1972-81.

Lupien SJ, McEwen BS. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human studies. *Brain Res Rev* 1997;1-27.

Luquín S. Hormonas gonadales y plasticidad neuroglial en la rata adulta. Facultad de Ciencias Biológicas. *Universidad Complutense de Madrid* 1995.

Magariños AM, McEwen BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c Neurons: Comparison of stressors. *Neuroscience* 1995;69:83-8.

Magariños, A.M., Verdugo, J.M. and McEwen, B.S. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:14002-08.

Martin D. Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia* 1992;5:81-94.

Martínez-Contreras A, Huerta M, Lopez-Perez S, García-Estrada J, Luquín S, Beas Zárate C. Astrocytic and Microglia Cells Reactivity Induced by Neonatal Administration of glutamate in cerebral Cortex of the adult rats. *J Neuroscience Res* 2002;67:200-210.

Marty S, Dussart I, Peschanski M. Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS. Microglia/macrophages. *Neuroscience* 1991;45:529-39.

Massieu L., Tapia R. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo. *J Neurochem* 1997;69:1151-60.

Maurel D, Sage D, Mekaouche M, Bosler O. Glucocorticoids up-regulate the expression of glial fibrillary acidic protein in the rat suprachiasmatic nucleus. *Glia* 2000;29:212-221.

Mc Rae A, Bona E, Hagberg H. Microglia-astrocyte interactions after cortisone treatment in a neonatal hypoxia-ischemia model. *Brain Res Dev Brain Res* 1996;94:144-51.

McEwen BS. Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol Psychiat* 2000;48:721-31.

- McEwen BS.** Possible mechanisms for atrophy of human hippocampus. *Mol. Psychiatry* 1997;2:255-62.
- McEwen BS.** The Brain is an important target of adrenal steroid actions. In: Moore and Lahita ed. Neuropsychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus. *The New York Academy of Sciences, NY, USA.* 1997;201-13.
- McGaugh JL, Cahill LP, Parent MB, Mesches MH, Coleman-Mesches K, Salinas JA.** 1995. Involvement of amygdala in the regulation of memory storage.
- McGaugh, J.L. (Ed), Bermudez Rattoni, Federico (Ed), et. al.(1995).** Plasticity in the central nervous system: Learning and memory (pp 17-39) *Mahwah, NJ, USA; Erlbaum.*
- Melcangi R, Magnaghi V, Cavarretta I, Riva M, Martini L.** Corticosteroids effects on gene expression of myelin basic protein in oligodendrocytes and of glial fibrillary acidic protein in type 1 astrocytes. *J Neuroendocrinol* 1997;9(10):729-33.
- Merril J.** Tumor necrosis factor α , interleukin 1 and related cytokines in brain development: normal and pathological. *Dev Neurosci* 1992;14:1-10.
- Miller TP, Taylor J, Rogerson S, Mauricio M, Kennedy Q, Schatzberg A, Tinklenberg J, Yesavage J.** Cognitive and noncognitive symptoms in dementia patients: relationship to cortisol and dehydroepiandrosterone. *Int Psychogeriatr* 1998;10:85-96.
- Morimoto M, Morita N, Ozawa, Yokohama K, Kawata M.** Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience Res* 1996;26(3):235-69.
- Morris, R.** Developments of water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984; 11:47-60.
- Mucke L, Morris N.** Rapid activation of astrocytes-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury. *New Biol* 1991;3:465-74.

Oitzl MS, Fluttert M, de Kloet ER. The effect of corticosterone on reactivity to spatial novelty is mediated by central mineralocorticosteroid receptor. *Eur J. Neurosci* 1994;6:1072-79.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press* 1986, San Diego.

Persson L. Cellular reactions to small cerebral stab wounds in the rat frontal lobe. An ultrastructural study. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1976; 22:21-37.

Petralia R, Wang Y, Niedzielski A, Wenthold R. The metabotropic glutamate receptors mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience* 1996;71(4):949-76.

Raber, J. Detrimental effects of chronic hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. *Mol Neurobiol* 1998; 18:1-22.

Ramos- Remus C, González Castañeda RE, González Pérez O, Luquin S, García Estrada J. Prednisone induces cognitive dysfunction, neuronal degeneration, and reactive gliosis in rats. *J Invest Med* 2002;50(6):458-64.

Reagan L, McEwen B. Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus. *J Chem Neuroanat* 1997;13: 149-67.

Reier P, Houle J. The glial scar: its bearing on axonal elongation and transplantation approaches to CNS repair. En: *Functional recovery in neurological disease* (Sg Waxman ed.), New York 1988, Raven Press, pp 87-138.

Reul JM, Gesing A, Droste S, Stec ISM, Weber A, Bachmann C, Bilang-Bleuel A, Holsboer, Linthorts ACE. The brain mineralocorticoid receptor: greedy for ligand, mysterious in function. *Eur J. Pharmacol* 2000;405:235-249.

Riva-Depaty I, Fardeau C, Mariani J, Bouchard C. Contribution of peripheral macrophages and microglia to the cellular reaction after mechanical or neurotoxin-induced lesions of the rat brain. *Experimental Neurology* 1994;128:77-87.

- Roberts A, Keith L.** Corticosteroid enhance conculsion susceptibility via central mineralocorticoid receptors. *Psychoneuroendocrinology* 1995;20: 891-902.
- Rosengreen L E, Haglid KG.** Long-term neurotoxicity of styrene. Quantitative study of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and s-100. *Br J Ind Med* 1989;46: 316-20.
- Sapolsky RM.** Stress, glucocorticoids, and damage to the nervous systems: the current state of confusion. *Stress* 1996; 1:1-19.
- Schmidt LA, Fox NA, Gooldberg MC, Smith CC, Schulkin J.** Effects of acute prednisone administration on memory, attention and emotion in healthy human adults. *Psychoneuroendocrinology* 1999; 24:461-83.
- Seckl J.** 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action. *Front Neuroendocrinol* 1997;18:49-99.
- Smith MA, Makino S, Knetnansky R , Post RM.** Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin -3 mRNA in the hippocampus. *Journal of Neuroscience* 1995; 15(3):1768-1777.
- Snyder TJ, Ramos-Remus C, Rusell AS, Lien D, Castor W.** Neurobehavioral sequelae of long-term corticosteroid use in the treatment of auto-immune diseases other than SLE. *Arch. Clin. Neuropsychol* 1994;9:188.
- Starkman MN, Gebarski SS, Berent S, Schteingart DE.** Hippocampal formation volume, memory dysfunction, and cortisone levels in patients with Cushing's syndrome. *Biol Psychiatry* 1992; 32:756-65.
- Starkman MN, Giordani B, Gebarski SS, Berent S, Schork MA, Schteingart DE.** Decrease in cortisol reverses human hippocampal atrophy following treatment of Cushing's disease. *Biol Psychiatry* 1999;46:1595-1602.
- Stein CM, Pincus T.** Glucocorticoids. En Kelley's Textbook of Rheumatology. Ruddy S, Harris E, Sledge ed. Sexta Edición. Saunders Philadelphia, 2001.

- Streit W, Kincaid-Colton.** The brain's immune system. *Scientific American* 1995;147:38-43.
- Stürenburg H, Fries U, Kunze K.** Glucocorticoids and anabolic/androgenic steroids inhibit the synthesis of GABAergic steroids in rat cortex. *Neuropsychobiology* 1997;35(3):143-6.
- Sze PY, Igbal Z.** Glucocorticoid action on depolarization-dependent calcium influx in brain synaptosomes. *Neuroendocrinology* 1994;59:457-65.
- Sze PY., Igbal Z.** Regulation of calmodulin content in synaptic plasma membranes by glucocorticoids. *Neurochem Res* 1994;19:1455-61.
- Tanaka J, Fujita H, Matsuda S, Toku K, Sakanaka M.** Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in microglial cells: the two receptors mediate different effects of corticosteroids. *Glia* 1997;20:23-37.
- Topp K, Faddis B, Vijayan V.** Trauma-induced proliferation of astrocytes in the brains of young and aged rats. *Glia* 1989;2:201-11.
- Travis CC, Bowers JC.** Interspecies scaling of anesthetic potency. *Toxicol Ind Health* 1991;7:249-60.
- Trump BF, Berezesky IK, Sato T, Laiho KU, Phelps PC, DeClaris N.** Cell calcium, cell injury and cell death. *Environ Health Perspect* 1984;57:281-87.
- Trump BF.** Significance of mitochondrial conformational changes in injured cells. *Am J Pathol.* 1973;70:83A.
- Unlap M, Jope R.** Dexametasone attenuates NF-kappa B DNA binding activity without inducing 1 kappa B levels in the rat brain in vivo. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;45:83-9.
- Wang CC, Wu CH, Sheih JY, Wen CY, Ling EA.** Effects of dexamethasone on antigen expressions and proliferation of amoeboid microglial cells in fetal rat brain. *J Hirnforsch* 1998;39(2):207-16.

Weibel ER. Stereological methods-1. In: Weibel ER, editor. *Practical methods for biological morphometry*. 1979;London: Academic Press.

Weinstein D, Shelanski M, Lien R. Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. *J Cell Biol* 1991;112:1205-13.

Wolkowitz O, Reus V, Wingartner H, Thompson K, Breier A. Cognitive effects of corticosteroids. *Am J Psychiatry* 1990;147:1297-1303.

Wolkowitz, O.M. Prospective controlled studies of the behavioral and biological effects of exogenous corticosteroids. *Psychoneuroendocrinology* 1994; 19:233-55.

Prednisone Induces Cognitive Dysfunction, Neuronal Degeneration, and Reactive Gliosis in Rats

César Ramos-Remus, Rocio E. González-Castañeda, Oscar González-Perez, Sonia Luquin, and Joaquín García-Estrada

ABSTRACT

Background: High glucocorticoid serum levels and prednisone (PDN) therapy have been associated with depression, posttraumatic stress disorder, and some types of cognitive dysfunction in humans.

Objective: The aim of this study was to assess whether chronic (90 days) PDN administration produces disturbance in learning and memory retention associated with neuronal degeneration and cerebral glial changes.

Methods: Male Wistar rats were studied. Controls received 0.1 ml distilled water vehicle orally. The PDN group was treated orally with 5 mg/kg/d PDN, which is equivalent to moderate doses used in clinical settings. Learning and memory retention were assessed with the Morris water maze. The index of degenerated neurons as well as the number and cytoplasmic transformation of astrocytes and microglia cells were evaluated in the prefrontal cortex and the CA1 hippocampus.

Results: PDN-treated rats showed a significant delay of 20% in learning and memory retention as compared with controls. In addition, in the PDN group, the neuronal degeneration index was two times higher in the prefrontal cortex, and approximately 10 times higher in the CA1 hippocampus, than in control animals. The number and cytoplasmic transformation of astrocytes were also significantly higher in the PDN group than in control animals. In the PDN-treated group, isolectin-B4-labeled microglia cells were higher in the prefrontal cortex but not in the hippocampus.

Conclusion: These results suggest that chronic exposure to PDN produces learning and memory impairment, reduces neural viability, and increases glial reactivity in cerebral regions with these cognitive functions. (*J Investig Med* 2002; 50:458-464) **Key Words:** astrocytes • glucocorticoids • learning • memory • microglia • neural loss

INTRODUCTION

Sixty-six years have passed since Wintersteiner, Pfiffner, and Mason discovered cortisone, and 53 years have gone by since Hench reported its dramatic effect on a patient with rheumatoid arthritis. Even with the dramatic advances in steroid chemistry and biology that have occurred since then, important evidence about the role of

natural and synthetic glucocorticoids on brain physiology and disease is still emerging. For instance, high cortisol levels are associated with reduced hippocampal formation volume and memory dysfunction in patients with Cushing's syndrome.¹ Decreased cortisol level reverses hippocampal atrophy after treatment of Cushing's disease.² Plasma adrenocorticotrophic hormone and cortisol levels are increased and correlated with the severity of hippocampal atrophy and memory impairment in several disorders, including Alzheimer's disease, schizophrenia, depression, and dementia associated with aging.^{3,4}

Prednisone (PDN) is a synthetic glucocorticoid that is used widely to treat patients with many acute and chronic medical conditions. Studies have suggested that PDN may directly affect the brain by participating in the development of cognitive dysfunction, cerebral atrophy, depression, and anxiety, as well as the well-known effect of steroid psychosis. For instance, the acute administration of high-dose PDN or dexamethasone to healthy volunteers produced impairment in some aspects of cognitive functioning.^{5,6} Apparent cerebral atrophy on computed tomo-

Department of Rheumatology, Centro Medico Nacional de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, México (C.R.R.); Laboratory of Neuroendocrinology, Centro de Investigación Biomedica de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, México (R.E.G.C., O.G.P., J.G.E.); Department of Neurosciences, Centro Universitario en Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México (SL).

Address correspondence to: Prof. César Ramos-Remus, MD, MSc, Colomos 2292, Providencia, Guadalajara, Jalisco 44520, México. Email: rramos@udg.serv.cencar.udg.mx

graphic scans has been found in individuals who were taking steroids.⁷ Patients with asthma, Crohn's disease, and other systemic conditions had mild subclinical psychiatric disturbance and selective neuropsychological deficits associated with steroid treatment.^{8,9} Some mood disturbances were also found in PDN-treated children with asthma.¹⁰ It is also known that a subgroup of patients with systemic lupus erythematosus with no history of neurologic involvement may develop cognitive dysfunction after several years with the disease.¹¹ Although controversial,¹² it is our clinical impression that PDN treatment may produce this effect.

In view of obvious ethical and methodologic difficulties, we chose a pharmacologic approach with the use of rats as a first step to evaluate the effect of PDN on cognitive function and brain structure. We previously showed that subacute exposure to PDN induced anxiety-related behavior and reactivity of microglia.¹³ In this study, we assessed the effects of chronic administration of PDN on memory acquisition and retention, neuronal viability, and reactive gliosis in rats. The dose of PDN administered to the study group is equivalent to moderate doses used in clinical settings, according to an interspecies scale. Memory acquisition and retention were assessed with the use of a common behavioral test. The brain regions considered for analysis were those with higher glucocorticoid receptors, such as the CA1 hippocampus and the prefrontal cortex.¹⁴ Histologic assessments of neuronal damage and immunocytochemical analyses of astrocyte and microglial populations were performed in these regions. Astrocytes and microglia cells were selected because they are the first ones to respond to neuronal damage and play an important role in restoring injured nervous tissue.¹⁵⁻¹⁷

METHODS

Experimental Animals

Experiments were performed on 8-week-old male Swiss-Wistar rats weighing 120–140 g. All animals were housed at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ under 12-h light-dark cycle conditions and were allowed free access to food and tap water. Two groups (15 rats/group) were assembled to assess memory acquisition and retention, neuronal degeneration, and glial reactivity. PDN-group received PDN (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) 5 mg/kg/d orally, dissolved in 0.1 ml distilled water, every morning starting at 8:00 AM for 90 days. We used this dosage because we wanted to assess the effects of moderate doses of PDN, similarly to those prescribed for several clinical conditions. According to an interspecies scale, a moderate dose of PDN in humans (45 mg/d) corresponds to 5 mg/kg/d in rats. This interspecies

scaling takes into account mg/kg/U of physiologic time (mg/kg/pt).¹⁸ The control group received 0.1 ml distilled water orally every morning, starting at 8:00 AM, for 90 days. The same person administered PDN and water, and all animals were handled in similar conditions. All experimental procedures were performed in accordance with the institutional guidelines on animal care of the Centro de Investigacion Biomedica de Occidente.

Memory Tests

At the end of the administration period, the Morris water maze was used to assess memory acquisition and retention, as previously described.^{19,20} Briefly, the water maze is a circular tank of 1.80 m diameter and 0.48 m height filled with water (27°C) to a depth of 25 cm. It contained a 10×25 -cm immersed platform placed at the center of a given quadrant. On the first day of the test (learning phase), the animals try to find and remember the correct position of the immersed platform. This phase consisted in eight swimming trials starting from four different positions that were equally distributed around the perimeter of the maze. After the animals found the platform, they were allowed to stay on it for 20 seconds and then placed into a warm cage for 30 seconds, until the start of the next trial. The recorded variables were the time required to localize the escape platform, swimming distance, and navigation velocity. After training, the animals were returned to their home cages. Twenty-four hours later, memory retention was assessed without the platform, allowing rats to swim for a single 60-second trial. The registered variable was the time spent in the quadrant where the platform was located. All tests were videotaped and analyzed by an independent observer who was blinded to group assignment.

After memory assessment, all animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (50 mg/kg) and killed by intravascular perfusion. At this time, blood samples were collected for serum glucose and electrolyte determination (sodium, potassium, and chloride). Afterward, 150 ml saline solution was instilled, followed by 150 ml 0.4% paraformaldehyde fixative in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4). After perfusion, the brains were removed and immersed in the same fixative at 4°C for 24 h.

Degenerated Neurons Assessment

To assess neuronal damage in the prefrontal cortex and the CA1 hippocampus, a technician took five brains from each group at random to be embedded in paraffin, and coronal slides ($4 \mu\text{m}$) were cut at -0.7 to -3.8 mm from bregma²¹ and stained with hematoxylin and eosin. Neuronal degenerative changes were identified by light micros-

copy as exhibiting at least one of the following characteristics: pyknosis, karyolysis, karyorrhexis, and cytoplasmic eosinophilia. Shrunken, dark, and scalloped neurons were also taken into account;²² 120 microscopic fields per brain and per cerebral region were assessed under $\times 400$ magnification. An observer who was blinded to group assignment performed the histologic assessment, counting the number of degenerated neurons and the total number of neurons per field (approximately 0.78 mm^2). The neuronal degeneration index per field was calculated by dividing the number of degenerated neurons by the total number of neurons per field, multiplied by 100.

Astrocytes and Microglial Assessment

Five other brains were processed to identify astrocyte and microglial cells. Brains were cut using a vibratome, and $30\text{-}\mu\text{m}$ coronal sections were obtained at -0.7 to -3.8 mm from the bregma²¹ and kept at 4°C in 0.1 M PBS. Immunocytochemical identification of astrocytes was performed as follows. Washes and incubations were performed on free-floating tissue sections under moderate shaking. Tissue sections were incubated in 1% hydrogen peroxide and 10% methanol for 20 minutes to block endogenous peroxidase staining. Slices were then washed twice for 20 minutes with 0.1% bovine serum albumin and 0.1% Triton X-100 in 0.1 M PBS. This buffer also was used for the following washes and incubations. Sections were then incubated overnight at 4°C with an anti glial fibrillary acidic protein (GFAP) polyclonal antiserum (Dako, Carpinteria, Calif) at a dilution of 1:800. Sections were then washed twice in buffer and incubated 2 hours at 22°C with antirabbit immunoglobulin G (Dako) at a dilution of 1:250. Peroxidase-antiperoxidase system incubation was performed in darkness for 2 hours (Dako) at a dilution of 1:200. Peroxidase activity was revealed with 0.01% hydrogen peroxide using 3'-diaminobenzidine as chromogen. The remaining brains (four controls and two PDN) were kept apart for further ultrastructural analysis.

Histochemical staining of microglia was performed on free-floating sections under gentle shaking. To inhibit endogenous peroxidase activity, sections were incubated for 20 minutes with 10% methanol and 1% H_2O_2 . Tissues were rinsed in 0.1 M PBS and incubated for 10 minutes in a cationic solution (0.1 mM CaCl_2 , 0.1 mM MgCl_2 , and 0.1 mM MnCl in 0.1 M PBS; pH 7.4). Next, they were incubated overnight at 4°C with peroxidase-labeled isolectin-B4 (Sigma Chemical Co.) at a 1:100 dilution. The reaction was revealed with 3'-diaminobenzidine. All sections were processed simultaneously with the use of immunocytochemical and histochemical methods.

Immunostained sections were studied with an imaging analyzer (Leica Q5001W; Leica Imaging Systems, Ltd.,

Cambridge, UK). The astrocyte population was quantified within 120 microscopic fields/rat for each group with the use of $\times 400$ magnification (approximately 0.78 mm^2 /field). To study the cytoplasmic transformation (expressed as the number of intersections), 600 cells per cerebral area for each group were assessed with a stereologic grid according to the Weibel point-counting method²³ and modified as follows: the test grid consisted of five concentric circles with a $90\text{-}\mu\text{m}$ separation between them. The astrocyte nuclei were placed at the center of the circle, and the number of points at which immunoreactive profiles crossed the test grid lines was recorded. Only cells and immunopositive branches seen in the same plane of focus were considered for quantification. Microglial evaluation was performed in the same way as it was for astrocytes. An observer who was blinded to group assignment performed the glial assessment.

Statistical Analysis

The results are expressed as mean \pm SEM. Differences between continuous variables in the morphometric analysis were determined by performing Student's *t* test. Differences between continuous variables in the cognitive assessments were determined by using the Mann-Whitney *U* test. The confidence intervals (CIs) for differences are reported at 95% (i.e., 95% CI). Statistical significance values were set at ≤ 0.05 . Intraobserver variability was assessed with the use of Pearson's correlation in 25 randomly selected fields read twice 3 days apart by the same observer who was blinded to group assignment.

RESULTS

Four rats were excluded from the behavioral tests and histologic analysis: one from the control group because it was unable to swim, and three from the PDN group because they showed incipient bacterial bronchitis during the routine necropsy performed in all studied animals. Serum levels of glucose, sodium chloride, and potassium in the PDN group were not different from those in controls (data not shown).

Memory acquisition and retention results are shown in Table 1. There was a significant delay of 20% in the learning phase, as assessed by the time spent to localize the escape platform, in the PDN exposed rats compared with controls (95% CI for differences -13 to -0.8 seconds). PDN-exposed rats also performed worse in memory retention, as assessed by the time spent in the correct quadrant, compared with controls (95% CI for differences 0.9 – 5 seconds). It seems that locomotor performance, as assessed by navigation velocity (95% CI of means for PDN group 15 – 19 cm/s vs. control group 17 – 22 cm/s) and

Table 1. Acquisition and retention of memory in Morris maze^a

Parameter	Control (n = 14)	PDN (n = 12)	p
Time required to localize escape platform (s)	34 ± 3	41 ± 1	0.02
Time spent in the correct quadrant (s)	16 ± 0.75	13 ± 0.8	0.009
Navigation velocity (cm/s)	20 ± 1.2	18 ± 0.9	0.09
Swimming distance (cm)	692.9 ± 51	723.7 ± 51	NS

^aData are mean ± SEM of all assays per group. PDN, prednisone; NS, no significance; Mann-Whitney *U* test.

swimming distance (95% CI of mean for PDN group 611–836 cm vs. control group 581–802 cm), was not modified by PDN administration. The power of the test²⁴ to assess differences in behavioral variables was 0.83.

Neuronal damage, as assessed by the neuronal degeneration index, was two times higher for the PDN group in the prefrontal cortex (PDN group, 10 ± 0.5, 95% CI, 9–11; control group, 5 ± 0.3, 95% CI, 5–6, *p* < 0.001, 95% CI for differences, –6 to –3), and approximately 10 times higher in the CA1 hippocampus (PDN group, 5 ± 0.5, 95% CI, 4–6; control group, 0.5 ± 0.6, 95% CI, 0.37–0.59, *p* < 0.001; 95% CI for differences, –6 to –4) compared with controls. The neuronal degeneration index was arbitrarily categorized as none, mild, moderate, and severe degeneration based on quartile distribution. The PDN group showed almost two times more severe degeneration in the prefrontal cortex and almost five times more severe degenerations in the hippocampus compared with controls (*p* < 0.001) (Table 2). Intraobserver variability was 0.87. Figure 1 shows neurons with degenerative signs.

The results of the morphometric analysis of astrocytes are illustrated in Table 3. The immunocytochemical reactivity of these cells was increased in the PDN-exposed rats compared with controls. The PDN group had a significantly higher number of astrocytes and cytoplasmic intersections in the prefrontal cortex and the CA1 hippocampus.

Table 4 shows the number of isolectin-B4-stained microglial cells and their cytoplasmic intersections per cerebral region. The PDN group had a significantly higher number of stained microglial cells in the prefrontal cortex (95% CI for differences, –3.3 to –1.4) and a borderline difference in the CA1 hippocampus (95% CI for differences, –0.039–1.6) compared with controls. In addition, microglial cytoplasmic transformation, as assessed by the number of intersections, was significantly higher in the PDN group in the prefrontal cortex (95% CI for differ-

Table 2. Frequency distribution of the indexes of neuronal degeneration^a

Degree of degeneration	No. (%)	
	Control	PDN
Prefrontal cortex		
None	199 (39.2%)	102 (19.8%)
Mild	52 (10.2%)	29 (5.6%)
Moderate	86 (16.9%)	78 (15.2%)
Severe	171 (33.7%)	305 (59.3%)
CA1 hippocampus		
None	346 (80.7%)	276 (59.5%)
Mild	27 (6.3%)	11 (2.4%)
Moderate	23 (5.4%)	16 (3.4%)
Severe	33 (7.7%)	161 (34.7%)

^aQuartile distribution of neuronal degeneration indexes per field at each cerebral region. PDN, prednisone.

ences, 3–4), but not in the CA1 hippocampus, compared with controls.

DISCUSSION

The Morris water maze is a reliable and commonly used test to assess the acquisition and retention of spatial memory in rodents.¹⁹ With the use of this test, we have shown that chronic administration of a moderate dose of PDN impairs learning and memory retention. The locomotor performance in the study group was not impaired, suggesting that PDN did not have an effect on muscle function. The possibility of a Type II error is low, as shown by the power of the test and the overlap of the 95% CIs in the navigation velocity and swimming distance variables.

Our results coincide with those of other clinical reports in which PDN treatment was associated with cognitive dysfunction in humans.^{5–10} PDN could induce these cognitive disturbances through the same mechanism described for natural glucocorticoids. High glucocorticoid levels may affect the synthesis of 5-hydroxytryptamine (i.e., serotonin).²⁵ This neurotransmitter is associated with the adequate performance of cognitive functions such as learning, memory, and attentional processes.²⁶

Our results also showed that neuronal viability in the prefrontal cortex and the CA1 hippocampus was reduced as a consequence of PDN exposure. These degenerative changes are coincident to those found in other conditions that exhibit high glucocorticoid levels and would explain

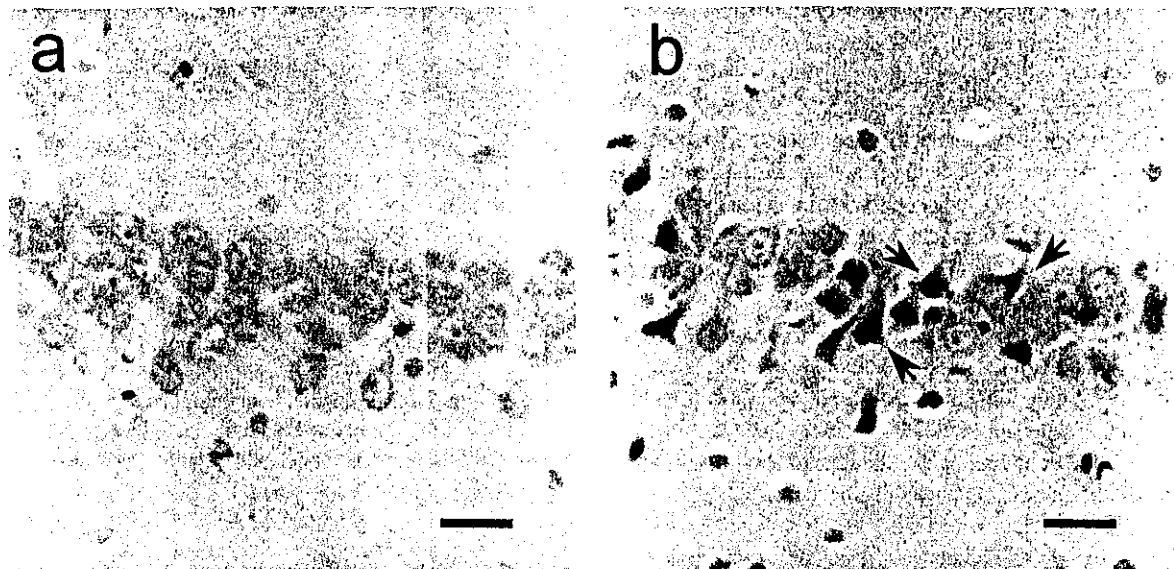


Figure 1. Effects of PDN on neuronal viability. (A) Normal morphology of neurons at CA1 hippocampus from control group. (B) Degenerated neurons (arrows) in the PDN-treated group; these neurons are shrunken, dark, and scalloped. Hematoxylin and eosin; scale bar, 25 μ m.

Table 3. Glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocyte population analysis^a

Parameter	Control (n = 5)	PDN (n = 5)	p
Astrocytes per field			
Prefrontal cortex	26.75 \pm 0.80	30.50 \pm 0.40	<0.001
Hippocampus (CA1)	30.88 \pm 0.41	34.25 \pm 0.35	<0.001
No. of intersections			
Prefrontal cortex	9.64 \pm 0.19	11.70 \pm 0.22	<0.001
Hippocampus (CA1)	13.04 \pm 0.25	16.40 \pm 0.26	<0.001

^aPDN, prednisone; Data are mean \pm SEM at each group; Student's *t* test.

the hippocampal volume reduction.^{27,28} The relevance of establishing the precise moment at which the loss of neurons occurs is very important, because the reversible atrophy induced by glucocorticoids^{27,28} might be treatable at the time it is discovered, but the neuronal degeneration not. The neuronal loss induced by PDN can be due to glucose uptake disturbances.^{29,30} Other possible mechanisms include increasing synaptic glutamate concentrations, neuroexcitotoxicity, and alteration of neurotrophin expression.^{3,31}

Assessment of astrocyte reactivity has been used as an indicator of cerebral tissue damage; this response is characterized by a rapid increase in the expression of

Table 4. Isolectin-B4-labeled microglia population analysis^a

Parameter	Control (n = 5)	PDN (n = 5)	p
Microglia cells per field			
Prefrontal cortex	22.50 \pm 0.4	25 \pm 0.3	<0.001
Hippocampus (CA1)	17 \pm 0.24	16 \pm 0.35	0.06
No. of intersections			
Prefrontal cortex	12 \pm 0.3	8.40 \pm 0.3	<0.001
Hippocampus (CA1)	14 \pm 0.3	14 \pm 0.3	NS

^aData are mean \pm SEM at each group. PDN, prednisone; NS, no significance; Student's *t* test.

GFAP.^{15,16} Our results revealed that PDN increased the GFAP immunoreactivity at prefrontal cortex and CA1 hippocampus. Neuronal degenerative changes were also present in both cerebral regions suggesting that GFAP overexpression can be related to astrocytes reactivity in responding to neural injury. Yet the upregulated expression of GFAP as a consequence of a decreased tryptophan hydroxylase mRNA cannot be excluded.^{32,33}

It has been reported that dexamethasone increases microglia ramification in fetal rat brains.³⁴ In addition, our group previously reported that subacute exposition to PDN produce similar changes.¹³ In this study, chronic exposure

to PDN produced changes in the number and cytoplasmic transformation of isolectin-B4-stained microglia cells in the prefrontal cortex, suggesting an overexpression of galactosyl glycoproteins on microglia.³⁴ This assumption is supported by the fact that the concentration of isolectin B4 used in our study (1:100) stains mainly activated microglia.³⁵ A possible trigger for microglial response could be a neuronal overstimulation produced by glutamate excitotoxicity, as reported with high glucocorticoid levels.^{3,31} Yet other studies have found a downregulation of microglia induced by different glucocorticoids.³⁶ This apparent discrepancy in microglia transformation can be explained by differences in compounds and doses used, which may produce opposite effects, acting as inhibitors through glucocorticoid receptors or stimulators via mineralocorticoid receptors. The regional microglial changes between prefrontal cortex and CA1 hippocampus found in this study may also be due to dissimilar glucocorticoid receptor densities.^{3,14,37}

CONCLUSIONS

Chronic exposure to PDN produced memory impairment and glial reactivity in rats. In addition, this study provides new evidence relating glucocorticoid therapy with neuronal loss. These features support further studies to assess whether PDN may produce similar effects in humans, mainly in light of the twofold increase in PDN and other glucocorticoid sales in North America during the past 5 years (data provided by Undra Farmaceutica, Schering-Plough de México, from IMS Health).

Acknowledgment: The authors were supported by Fondo de Fomento a la Investigación Project FP0038/1191 of the Instituto Mexicano del Seguro Social, México.

REFERENCES

1. Starkman MN, Gebarski SS, Berent S, Scheingart DE. Hippocampal formation volume, memory dysfunction, and cortisone levels in patients with Cushing's syndrome. *Biol Psychiatry* 1992;32:756-765.
2. Starkman MN, Giordani B, Gebarski SS, Berent S, Schork MA, Scheingart DE. Decrease in cortisol reverses human hippocampal atrophy following treatment of Cushing's disease. *Biol Psychiatry* 1999;46:1595-1602.
3. Raber J. Detrimental effects of chronic hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation: From obesity to memory deficits. *Mol Neurobiol* 1998;18:1-22.
4. Miller TP, Taylor J, Rogerson S, Mauricio M, Kennedy Q, Schatzberg A, Tinklenberg J, Yesavage J. Cognitive and noncognitive symptoms in dementia patients: Relationship to cortisol and dehydroepiandrosterone. *Int Psychogeriatr* 1998;10:85-96.
5. Schmidt LA, Fox NA, Goldberg MC, Smith CC, Schulkin J. Effects of acute prednisone administration on memory, attention and emotion in healthy human adults. *Psychoneuroendocrinology* 1999;24:461-483.
6. Wolkowitz OM. Prospective controlled studies of the behavioral and biological effects of exogenous corticosteroids. *Psychoneuroendocrinology* 1994;19:233-255.
7. Bentson J, Reza M, Winter J, Wilson G. Steroids and apparent cerebral atrophy on computed tomography scans. *J Comput Assist Tomogr* 1978;2:16-23.
8. Snyder TJ, Ramos-Remus C, Russell AS, Lien D, Castor W. Neurobehavioral sequelae of long-term corticosteroid use in the treatment of autoimmune diseases other than SLE. *Arch Clin Neuropsychol* 1994;9:188.
9. Keenan PA, Jacobson MW, Soleymani RM, Mayes MD, Stress ME, Yaloo DT. The effect on memory of chronic prednisone treatment in patients with systemic disease. *Neurology* 1996;47:1396-1402.
10. Bender BG, Lerner JA, Poland JE. Association between corticosteroids and psychologic change in hospitalized asthmatic children. *Ann Allergy* 1991;66:414-419.
11. Brey RL, Holliday SL, Saklad AR, Navarrete MG, Hermsillo-Romo D, Stallworth CL, Valdez CR, Escalante A, del Rincon I, Gronseth G, Rhine CB, Padilla P, McGlasson D. Neuropsychiatric syndromes in lupus: Prevalence using standardized definitions. *Neurology* 2002;58:1214-1220.
12. Carbotte RM, Denburg SD, Denburg JA. Cognitive dysfunction in systemic lupus erythematosus is independent of active disease. *J Rheumatol* 1995;22:863-867.
13. Gonzalez-Perez O, Ramos-Remus C, Garcia-Estrada J, Luquin S. Prednisone induces anxiety and glial cerebral changes in rats. *J Rheumatol* 2001;28:2529-2534.
14. Petralia RS, Wang YX, Niedzielski AS, Wenthold RJ. The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience* 1996;71:949-976.
15. Persson L. Cellular reactions to small cerebral stab wounds in the rat frontal lobe: An ultrastructural study. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1976;22:21-37.
16. Isacson O, Fischer W, Victorin K, Dawbarn D, Bjorklund A. Astroglial response in the excitotoxically lesioned neostriatum and its projection areas in the rat. *Neuroscience* 1987;20:1043-1056.
17. Milligan CE, Levitt P, Cunningham TJ. Brain macrophages and microglia respond differently to lesions of the developing and adult visual system. *J Comp Neurol* 1991;314:136-146.
18. Travis CC, Bowers JC. Interspecies scaling of anesthetic potency. *Toxicol Ind Health* 1991;7:249-260.
19. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984;11:47-60.
20. de Quervain DJ, Roozendaal B, McGaugh JL. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 1998;394:787-790.
21. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th ed. San Diego: Academic Press, 1998.
22. García JH, Liu KF, Ye ZR, Gutiérrez JA. Incomplete infarct and delayed neuronal death after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1997;28:2303-2310.
23. Weibel ER. *Stereological Methods for Biological Morphometry: Vol. 1: Practical Methods for Biological Morphometry*. London: Academic Press, 1979.
24. Daniel WW. Hypothesis testing. In: *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*. 6th ed. New York: Wiley, 1995: 201-269.

25. Maurel D, Sage D, Mekaouche M, Bosler O. Glucocorticoids up-regulate the expression of glial fibrillary acidic protein in the rat suprachiasmatic nucleus. *Glia* 2000;29:212-221.
26. Buhot MC, Martin S, Segu L. Role of serotonin in memory impairment. *Ann Med* 2000;32:210-221.
27. Magariños AM, Verdugo JM, McEwen BS. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:14002-14008.
28. McEwen BS. The brain is an important target of adrenal steroid actions. In: Moore PM, Lahita RG, eds. *Neuropsychiatric Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus*. New York: New York Academy of Sciences, 1997:201-213.
29. Belanoff JK, Kalehzan M, Sund B, Fleming Ficek SK, Schatzberg AF. Cortisol activity and cognitive changes in psychotic major depression. *Am J Psychiatry* 2001;158:1612-1616.
30. Horner HC, Packan DR, Sapolsky RM. Glucocorticoids inhibit glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia. *Neuroendocrinology* 1990;52:57-64.
31. Sapolsky RM. Stress, glucocorticoids, and damage to the nervous system: The current state of confusion. *Stress* 1996;1:1-19.
32. Le Prince G, Copin MC, Hardin H, Belin MF, Bouilloux JP, Tardy M. Neuron-glia interactions: Effect of serotonin on the astroglial expression of GFAP and of its encoding message. *Brain Res Dev Brain Res* 1990;51:295-298.
33. Clark MS, Russo AF. Tissue-specific glucocorticoid regulation of tryptophan hydroxylase mRNA levels. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;48:346-354.
34. Wang CC, Wu CH, Shieh JY, Wen CY, Ling EA. Effects of dexamethasone on antigen expressions and proliferation of amoeboid microglial cells in fetal rat brain. *J Hirnforsch* 1998;39:207-216.
35. Marty S, Dusart I, Peschanski M. Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS: I. Microglia/macrophages. *Neuroscience* 1991;45:529-539.
36. Woods AG, Poulsen FR, Gall CM. Dexamethasone selectively suppresses microglial trophic responses to hippocampal deafferentation. *Neuroscience* 1999;91:1277-1289.
37. Tanaka J, Fujita H, Matsuda S, Toku K, Sakanaka M, Maeda N. Glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors in microglial cells: The two receptors mediate differential effects of corticosteroids. *Glia* 1997; 20:23-37.

Congresos.

XXX CONGRESO MEXICANO DE REUMATOLOGÍA. Deterioro cognitivo y daño cerebral inducido por prednisona. González-Castañeda R.E., González-Pérez O., García Estrada J., Luquín S., Ramos-Remus C. 15 al 19 de Febrero del 2002, Mérida, Yucatán.

VII REUNION REGIONAL DE INVESTIGACIÓN DE SALUD, OCCIDENTE. Efectos secundarios al uso crónico de prednisona sobre la adquisición y retención de memoria asociados a reactividad glial en cerebro de ratas adultas. González-Castañeda R.E., Ramos-Remus C., González-Pérez O., Navarro-Ruíz A., Morales-Vázquez ME., Gómez Pinedo U., González-Ballesteros AA., Luquín S., García-Estrada J. 21 y 22 DE Junio del 2001, Puerto Vallarta, Jalisco

XXV ANIVERSARIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMEDICA DE OCCIDENTE. Efectos secundarios al uso crónico de prednisona sobre la adquisición y retención de memoria asociados a reactividad glial en cerebro de ratas adultas. González-Castañeda R.E., Ramos-Remus C., González-Pérez O., Navarro-Ruíz A., Morales-Vázquez ME., Gómez-Pinedo U., González-Ballesteros AA., Luquín S., García-Estrada J. 26 al 30 de noviembre de 2001, Guadalajara, Jal.

XIII SEMANA NACIONAL DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA. La prednisona induce disfunción cognoscitiva y daño estructural del tejido cerebral en ratas adultas. González-Castañeda R.E., Ramos-Remus C., González-Pérez O., Navarro-Ruíz A., Morales-Vázquez ME., Gómez-Pinedo U., González-Ballesteros AA., Luquín S., García-Estrada J. Noviembre 2002, Guadalajara, Jal.